

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**BIOLOŠKI FAKULTET**

**Ana S. Branković**

**Studija asocijacije genetičkih varijanti u  
regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa rizikom  
za razvoj i progresiju karcinoma  
prostate**

---

**- doktorska disertacija -**

**Beograd, 2013**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY**

**Ana S. Branković**

**Association study of common genetic  
variants in regions 7q36, 8q24 and  
17q12 with prostate cancer**

---

**- Doctoral Dissertation -**

**Belgrade, 2013**

## **Mentor**

docent dr Goran Brajušković, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

## **Članovi komisije**

vanredni profesor dr Dušanka Savić Pavićević, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

vanredni profesor dr Vinka Vukotić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

Ova doktorska disertacije urađena je u Centru za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao deo projekta „Analiza promena u strukturi genoma kao dijagnostički i prognostički parametar humanih bolesti“ (OI 173016) čiji je rukovodilac prof. dr Stanka Romac, a pod neposrednim rukovodstvom doc. dr Gorana Brajuškovića. Doktorska disertacija rezultat je saradnje Centra za humanu molekularnu genetiku i Urološke klinike KBC „Dragiša Mišović“ i Odeljenja za urologiju Hirurške klinike KBC „Zvezdara“.

Doc. dr Goranu Brajuškoviću dugujem najveću zahvalnost, kako za pruženu priliku da svoju doktorsku disertaciju radim u okviru Centra za humanu molekularnu genetiku, tako i za savete i sugestije tokom izbora teme, izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Dušanki Savić Pavićević na svim korisnim sugestijama koje su bile od velikog značaja tokom izrade i pisanja ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Vinki Vukotić na saradnji u kliničkom dijagnostikovanju bolesnika i prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka koji su analizirani u okviru ove doktorske disertacije. U dijagnostikovanju i kliničkoj obradi podataka potrebnih za ovu tezu zahvalnost dugujem i dr Nataši Filipović i dr Saši Tomoviću. Zahvalnost dugujem i patologu prof. dr Snežani Cerović.

Zahvalnost dugujem prof. dr Stanki Romac i svim saradnicima Centra za humanu molekularnu genetiku Biološkog fakulteta na svakoj vrsti pomoći i ugodnoj atmosferi timskog rada koja krasi ovaj Centar. Posebno bih istakla pomoć Zorane Nikolić, mastera biologa, na velikoj pomoći tokom statističke obrade rezultata. Pored Zorane, zahvalnost dugujem i kolegama iz grupe „prostatičara“ Biljani Petrićević, Brankici Rašković, Miši Vreći, Jovanu Mirčetiću, Mihailu Mirkoviću, Ivanu Stankoviću i Predragu Kalabi.

Porodici zahvaljujem na bezuslovnoj podršci i dobroti bez koje bi rad na ovoj tezi bio gotovo nemoguć. Zato ovu tezu posvećujem svojim roditeljima i bratu.

## **Studija asocijacije genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa rizikom za razvoj i progresiju karcinoma prostate**

### **Rezime**

Karcinom prostate je drugi najčešće dijagnostikovani maligni tumor muškaraca u svetu, i šesti po broju smrtnih slučajeva. Standardni dijagnostički i prognostički parametri KP su serumski vrednost prostata specifičnog antigena (PSA), Gleasonov gradus sistem (GGS), i klinički stadijum KP. Studije asocijacije na čitavom genomu identifikovale su preko 30 SNP asocijiranih sa rizikom za razvoj i progresiju KP. Genetičke varijante predstavljaju potencijalne genetičke markere koji bi se pored standardnih prognostičkih parametara koristili u dijagnostici i praćenju bolesnika sa KP. Rezultati replikativnih studija slučajeva i kontrola potvrdili su da pojedinačne genetičke varijante mogu imati različit stepen asocijacije sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP u različitim populacijama.

Ova studija imala je za cilj da proceni moguću asocijaciju genotipova i alela genetičkih varijanti u regionu 7q36 (rs1799983, rs2070744, *NOS3* -764A>G, *NOS3* -714G>T, rs3918226, *NOS3* -649G>A), regionu 8q24 (rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300, rs7837688) i regionu 17q12 (rs3760511, rs7501939) sa rizikom za razvoj i progresiju KP.

Studija je obuhvatala 150 bolesnika sa KP, 150 bolesnika sa benignom hiperplazijom prostate (BPH) i 100 muškaraca bez kliničkih znakova bolesti prostate (kontrolna grupa). Genotipizacija genetičkih varijanti vršena je metodom RFLP i metodom automatskog sekvenciranja.

Za svih pet SNP u regionu 8q24 (rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300 i rs7837688), kao i za rs7501939 iz regiona 17q12 pokazana je asocijacija sa rizikom za razvoj KP. U našoj studiji, od 13 analiziranih genetičkih varijanti, za samo dve, rs3760511 (region 17q12) i rs1799983 (region 7q36), pokazana je asocijacija sa standardnim prognostičkim parametrima KP. Rezultati naše studije pokazali su

asocijaciju genetičkih varijanti rs3760511 (region 17q12) i rs3198266 (region 7q36) sa rizikom za progresiju KP.

Rezultati ove studije pokazali su naučnu opravdanost studije slučajeva i kontrola u populaciji Srbije. Doprinos nastavka istraživanja asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i progresiju KP je u definisanju panela minimalnog broja SNV koji bi se koristili kao nestandardni prognostički parametri u dijagnostici i kliničkom praćenju bolesnika sa KP.

**Ključne reči:** studija asocijacije, genetičke varijante, karcinom prostate.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biohemija i molekularna biologija

**UDK broj:** 577.21 : [616-006.6 : 611.637] (043.3)

## **Association study of common genetic variants in regions 7q36, 8q24 and 17q12 with prostate cancer**

### **Abstract**

Prostate cancer (PCa) is the second most frequently diagnosed malignant tumor, and the sixth leading cause of cancer-related deaths among men worldwide. Standard diagnostic and prognostic parameters are serum PSA level, Gleason gradus score, and the clinical stage of PCa. Genome-wide association studies (GWAS) have identified over 30 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with human PCa. Genetic variants have emerged as potential genetic markers that could be used along with standard prognostic parameters in PCa diagnostics and outcome prediction.

This study aimed to evaluate possible association between genotypes and alleles of genetic variants at 7q36 (rs1799983, rs2070744, *NOS3* -764A>G, *NOS3* -714G>T, rs3918226, and *NOS3* -649G>A), 8q24 (rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300, rs7837688) and 17q12 (rs3760511, rs7501939) with PCa risk and progression.

150 patients with PCa, 150 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH), and 100 men without clinical signs of prostate diseases (control group) were recruited as study participants. The genotyping was performed by using PCR-RFLP analysis and bi-directional DNA sequencing.

Our study has shown association for all five analyzed variants in the region 8q24 (rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300 and rs7837688) and rs7501939 in the 17q12 region with the risk of PCa. Among 13 variants analyzed in our study, two (rs3760511 at 17q12 and rs1799983 at 7q36) have shown evidence of association with standard prognostic parameters of PCa. Our study yielded evidence of association of rs3760511 (17q12) and rs3198266 (7q36) with the risk of PCa progression.

The results of our study have shown the scientific rationale for conducting case-control studies in Serbian population. The primal contribution of continuing reasearch

regarding association between genetic variants and PCa risk and progression is in defining the minimal panel of single nucleotide variants which would be used as non-standard prognostic parameters in PCa diagnostics and outcome prediction.

**Keywords:** association study, genetic variants, prostate cancer.

**Scientific field:** Biology

**Special topic:** Biochemistry and Molecular Biology

**UDC number:** 577.21 : [616-006.6 : 611.637] (043.3)



## Skraćenice

**95%CI** – interval poverenja (eng. *95% confidence interval*)

**A** – adenin

**AIC**– Akaike informacijski kriterijum (eng. *Akaike information criterion*)

**AJCC / UICC** – Američki komitet za maligne bolesti (eng. *American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer*)

**ANRIL** – duga nekodirajuća RNK u lokusu INK4 (eng. *Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus*)

**AR** – androgeni receptor

**bp** – bazni par

**BPH** – benigna hiperplazija prostate

**C** – citozin

**ddNTP** – 2',3'- didezoksiribonukleozidtrifosfat

**DNK** – dezoksiribonukleinska kiselina

**DRE** – digitorektalni pregled (eng. *digital rectal examination*)

**EAU**– Evropsko udruženje urologa (eng. *European Association of Urology*)

**EDTA** – etilen diamin tetra sirćetna kiselina

**EtBr** – etidijum-bromid

**Fw** – uzvodni prajmer

**G** – guanin

**GGS** – Glison gradus sistem

**GSTP1**– Glutation S-transferaza pi 1 (eng. *glutathione S-transferase pi 1*)

**GWAS** – studija asocijacije na čitavom genomu (eng. *Genome Wide Association Study*)

**H&E** – hematoksilin-eozin

**H3** – histon 3

**H3K27me3** – trimetilacija lizina na poziciji 27 histona H3

**H3K4me1** – metilacija lizina na poziciji 4 histona H3

**HGPIN** – prostatična intraepitelna neoplazija visokog gradusa (eng. *high grade prostatic intraepithelial neoplasia*)

**Hi-Di<sup>TM</sup> formamid** – visoko deionizovani formamid (eng. *high deionized formamide*)

**ICGC** – međunarodni konzorcijum za genomska istraživanja malignih bolesti (eng. *International Cancer Genome Consortium*)

**kb** – kilo baza

**KP** – karcinom prostate

**LGPIN** – prostatična intraepitelna neoplazija niskog gradusa (eng. *low grade prostatic intraepithelial neoplasia*)

**LUTS** – simptomi donjeg urinarnog trakta (eng. *lower urinary tract symptoms*)

**Mb** – mega baza

**NGS** – nova generacija sekvenciranja (eng. *next generation sequencing*)

**NO** – azot oksid

**NOS3** – azot oksid sintetaza 3

**OR** – odnos verovatnoća (eng. *Odds Ratio*)

**p** – kratki krak hromozoma

**p53** – protein 53

**PAP** – prostatična kisela fosfataza (eng. *prostate acid phosphatase*)

**PBP** – prostata vezujući protein (eng. *prostate binding protein*)

**PCA3** – antigen karcinoma prostate 3 (eng. *Prostate Cancer Antigen 3*)

**PCR** – lančana reakcija polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*)

**PIN** – prostatična intraepitelna neoplazija

**POP4** – polimer za automatsko sekvenciranje (eng. *Performance Optimized Polymer-4*)

**PSA** – prostata specifični antigen (eng. *prostate specific antigen*)

**q** – dugi krak hromozoma

**RFLP** – polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

**RNK** – ribonukleinska kiselina

**RPA1** – replikacioni protein A1 (eng. *replication protein A1*)

**Rv** – nizvodni prajmer

**SNP** – polimorfizam pojedinačnih nukleotida ili tačkasti polimorfizam (eng. *single nucleotide polymorphism*)

**SNV** – tačkasta varijanta (eng. *Single Nucleotide Variant*)

**T** – timin

**TBE** pufer – TRIS-Borat-EDTA-Pufer

**TNM**– sistem za određivanje kliničkog stadijuma karcinoma prostate koji opisuje primarni tumor (T), status limfnih čvorova (N) i prisustvo ili odsustvo metastaza (M) (eng. *Tumour Node Metastasis*)

**TRUS** – transrektalni ultrazvuk prostate (eng. *transrectal ultrasound*)

**UV** – ultraljubičasta svetlost

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	1
1.1. Prostata.....	1
1.2. Bolesti prostate.....	2
1.2.1. Prostatitis.....	2
1.2.2. Benigna hiperplazija prostate.....	3
1.2.3. Premaligne lezije prostate.....	4
1.3. Karcinom prostate.....	5
1.3.1. Epidemiologija KP.....	5
1.3.2. Dijagnostika KP.....	6
1.3.3. Lečenje KP.....	7
1.4. Standardni dijagnostički i prognostički parametri KP.....	8
1.4.1. Prostata specifični antigen.....	8
1.4.2. Klinički stadijum bolesti.....	9
1.4.3. Glison gradus sistem.....	10
1.5. Molekularna osnova karcinoma prostate.....	12
1.5.1. Protein-kodirajući proto-onkogeni i KP.....	13
1.5.2. Protein-kodirajući tumor-supresorni geni i KP.....	14
1.5.3. Androgeni hormoni i KP.....	15
1.5.4. Regulatorne RNK i KP.....	16
1.5.5. Epigenetičko utišavanje gena kod KP.....	17
1.6. Genetičke varijante asocirane sa KP.....	18
1.6.1. Nasledna predispozicija KP.....	18
1.6.2. Studije asocijacije na čitavom genomu u istraživanju KP.....	19
1.6.3. Genetičke varijante u regionu 8q24 asocirane sa KP.....	20
1.6.4. Genetičke varijante u regionu 17q12 asocirane sa KP.....	22
1.6.5. Genetičke varijante u regionu 7q36 asocirane sa KP.....	23
1.7. Ciljevi rada.....	25
<b>2. Materijal i metode.....</b>	<b>26</b>
2.1. Materijal.....	26
2.2. Metode.....	27

2.2.1. Selekcija bolesnika sa KP na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara KP.....	27
2.2.2. Izolacija genomske DNK iz krvi i brisa bukalne sluznice.....	28
2.2.3. Genotipizacija genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12.....	30
2.2.3.1. Umnožavanje analiziranih fragmenata DNK lančanom reakcijom polimeraze.....	31
2.2.3.2. Analiza genetičkih varijanti metodom RFLP.....	33
2.2.3.3. Analiza genetičkih varijanti metodom automatskog sekvenciranja.....	34
2.2.4. Statistička obrada rezultata.....	37
<b>3. Rezultati.....</b>	<b>39</b>
3.1. Rezultati selekcije bolesnika sa KP na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara KP.....	39
3.2. Provera količine i kvaliteta izolovane genomske DNK elektroforezom u agaroznom gelu.....	40
3.3. Provera specifičnosti PCR amplifikacije fragmenata molekula DNK koji okružuju analizirane genetičke varijante elektroforezom u agaroznom gelu.....	40
3.4. Rezultati analiza genetičkih varijanti metodom RFLP.....	43
3.5. Rezultati analiza genetičkih varijanti metodom automatskog sekvenciranja.....	46
3.6. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP.....	49
3.6.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 8q24 sa rizikom za razvoj KP.....	50
3.6.1.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1447295 sa rizikom za razvoj KP.....	50
3.6.1.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za razvoj KP.....	52
3.6.1.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za razvoj KP.....	54
3.6.1.4. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7017300 sa rizikom za razvoj KP.....	56
3.6.1.5. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za razvoj KP.....	59
3.6.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 17q12 sa rizikom za razvoj KP.....	61
3.6.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7501939 sa	

rizikom za razvoj KP.....	61
3.6.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za razvoj KP.....	63
3.6.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 7q36 sa rizikom za razvoj KP.....	65
3.6.3.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za razvoj KP.....	65
3.6.3.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u promotorskom regionu gena <i>NOS3</i> sa rizikom za razvoj KP.....	67
3.6.3.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za razvoj KP.....	67
3.6.3.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za razvoj KP.....	69
3.7. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	71
3.7.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 8q24 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	71
3.7.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 17q12 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	75
3.7.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7501939 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	75
3.7.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3760511 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	75
3.7.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 7q36 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	78
3.7.3.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1799983 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	78
3.7.3.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u promotorskom regionu gena <i>NOS3</i> sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	81
3.7.3.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs2070744 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	81
3.7.3.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3918226 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.....	81
3.8. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti sa rizikom za progresiju KP.....	82
3.8.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti	

u regionu 8q24 sa rizikom za progresiju KP.....	83
3.8.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 17q12 sa rizikom za progresiju KP.....	86
3.8.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za progresiju KP.....	86
3.8.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za progresiju KP.....	86
3.8.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 7q36 sa rizikom za progresiju KP.....	88
3.8.3.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za progresiju KP.....	88
3.8.3.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u promotorskom regionu gena <i>NOS3</i> sa rizikom za progresiju KP.....	89
3.8.3.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za progresiju KP.....	89
3.8.3.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za progresiju KP.....	89
<b>4. Diskusija.....</b>	<b>93</b>
<b>5. Zaključci.....</b>	<b>110</b>
<b>6. Literatura.....</b>	<b>111</b>
<b>7. Prilozi .....</b>	<b>144</b>
Prilog A.....	144
P A.1. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs1447295	144
P A.2. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs4242382	144
P A.3. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs6983267	145
P A.4. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs7017300	145
P A.5. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs7837688	146
P A.6. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs7501939	146
P A.7. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs3760511	147
P A.8. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs1799983	147
P A.9. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičke varijante u promotorskom regionu gena <i>NOS3</i>	148

Prilog B.....	149
P B.1. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs1447295 metodom RFLP	149
P B.2. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs4242382 metodom RFLP	149
P B.3. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs6983267 metodom RFLP	149
P B.4. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs7017300 metodom RFLP	150
P B.5. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs7837688 metodom RFLP	150
P B.6. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs7501939 metodom RFLP	150
P B.7. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs3760511 metodom RFLP	151
P B.8. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs1799983 metodom RFLP	151

Dozvola Etičkog komiteta KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“, Beograd

Dozvola Etičkog komiteta KBC „Zvezdara“, Beograd

Stručna biografija

Reprinti objavljenih radova sa rezultatima doktorske disertacije

Prilog 1. Izjava o autorstvu

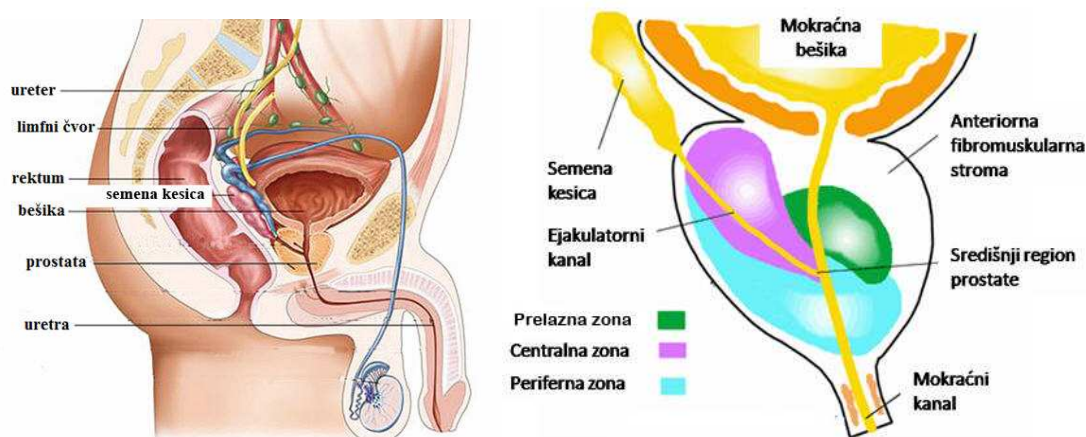
Prilog 2. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije dokorskog rada

Prilog 3. Izjava o korišćenju

# 1. Uvod

## 1.1. Prostata

Prostata (lat. *prostata*, kestenjača) je mišićno-žlezdani organ koji okružuje početni deo mokraćnog kanala (lat. *urethra*) kod muškaraca. Nalazi se na dnu male karlice, ispod mokraćne bešike, ispred rektuma i iza simfize (slika 1) (1). Prostata zdravih muškaraca je oblika kestena i veličine kivija. Težina prostate varira od 7 do 16 g, a volumen od 10 do 80 ml (2). Anatomski, prostata se sastoji od dva režnja (lat. *lobus prostatae dexter et sinister*) i jednog suženja (lat. *isthmus prostatae*) (1). Nema pravu fibroznu kapsulu, već je obavijena visceralnim omotačem (lat. *capsula prostatica*).



Slika 1. Prostata. Shematski prikazi anatomskog položaja prostate u maloj karlici (levo)<sup>1</sup> i podele žlezdanog tkiva prostate u tri zone (desno)<sup>2</sup>

Histološki, prostata ima izgled razgranate duktalne žlezde i čine je dva osnovna dela: tubuloalveolarne žlezde i fibromuskularna stroma. Tubuloalveolarne žlezde organizovane su kružno, oko mokraćnog kanala u tri nepravilna sloja. U neposrednoj blizini mokraćnog kanala nalaze se mukozne žlezde na koje se naslanjaju submukozne. Žlezde koje se nalaze periferno najveće su i označavaju se kao glavne prostatične žlezde. Žlezdano tkivo sastoji se od brojnih folikula koji se otvaraju u izdužene kanale. Kanali se udružuju da bi formirali 12-20 izvodnih kanala koji se izlivaju u prostatični deo mokraćnog kanala (3).

<sup>1</sup> Slika dostupna na URL: <http://www.alanwakelintrading-health-physical-fitness.com/images/Prostate.jpg>

<sup>2</sup> Slika dostupna na URL: [http://www.websystem2.com/articles/6w\\_Prostate.htm](http://www.websystem2.com/articles/6w_Prostate.htm)



Žlezdano tkivo prostate može se podeliti na tri zone: centralnu, prelaznu i perifernu (slika 1). Periferna zona je peharastog oblika, čini oko 70% ukupne mase prostate, i otvara se u distalni kraj prostatičnog dela mokraćnog kanala. Centralna zona, koja predstavlja četvrtinu volumena prostate, okružuje ejakulatorne kanaliće, a njeni izvodni kanali se najvećim delom izlivaju u sredinu prostatičnog dela mokraćnog kanala. Najmanja je prelazna zona (5% volumena) koja zauzima središnji deo prostate. Njeni izvodni kanali izlivaju se u proksimalni kraj prostatičnog dela mokraćnog kanala (4). Zonalna podela prostate ima klinički značaj jer se adenokarcinom prostate (KP) najčešće dijagnostikuje u perifernoj zoni, dok se benigna hiperplazija prostate (eng. *Benign Prostatic Hyperplasia*, BPH) najčešće dijagnostikuje u prelaznoj zoni (5).

Prostata ima egzokrinu funkciju i produkuje vodenasto-beličastu, blago kiselu, semenu tečnost. Ona sadrži preko 100 proteina, od kojih su najzastupljeniji prostatična kiselina fosfataza (eng. *prostate acid phosphatase*, PAP), prostata specifični antigen (eng. *prostate specific antigen*, PSA) i prostata vezujući protein (eng. *prostate binding protein*, PBP). Pored proteina, tečnost sadži lipide, fruktozu, limunsku kiselinu, jone cinka i druge komponente (6). Semena tečnost potpomaže kretanje spermatozoida i istovremeno ih štiti od kiselog okruženja ženskog polnog sistema (7).

## **1.2. Bolesti prostate**

Sa kliničkog aspekta, bolesti prostate mogu se svrstati u dve osnovne grupe, zapaljenske (inflamatorne) i tumorske. Tumori prostate dele se na benigne i maligne. Najučestalije bolesti prostate su protatitis, BPH i KP (8).

### **1.2.1. Prostatitis**

Prostatitis predstavlja zapaljensku bolest prostate (9). Klinički simptomi prostatitisa su nelagodnost i bol, a ponekad su ove smetnje povezane i sa seksualnom disfunkcijom (10). Predstavlja najčešću urološku dijagnozu kod muškaraca mlađih od 50 godina i treću po učestalosti kod starijih od 50 godina (11). Po važećem sistemu klasifikacije Nacionalnog instituta za javno zdravlje Sjedinjenih Američkih Država

razlikuju se četiri tipa prostatitisa (10). Akutni bakterijski prostatitis (tip I) posledica je akutne infekcije najčešće izazvane bakterijom *E. coli* (12). Hronični bakterijski prostatitis (tip II) izazivaju bakterije iz rodova *Escherichia*, *Klebsiella* i *Proteus*, ređe *Enterococcus*, *Staphylococcus* i *Streptococcus* (11). Etiologija prostatitisa tipa III je nejasna. Kao mogući uzroci izdvajaju se infekcije, imunološke disfunkcije i intersticijalni cistitis (11). Asimptomatski prostatitis svrstani su u IV tip bolesti. Zbog izostanka simptoma ova vrsta prostatitisa otkriva se ili biopsijom prostate, ili tokom lečenja neplodnosti (13). Rezultati epidemiološke studije pokazali su da muškarci sa preležanim prostatitisom imaju povećan rizik za razvoj BPH i KP (14).

### **1.2.2. Benigna hiperplazija prostate**

Benigna hiperplazija prostate najčešće je oboljenje prostate. Predstavlja nemaligno hronično uvećanje prostate usled hiperplazije tkiva prelazne zone prostate (15, 16). Ovu bolest karakteriše palpabilno uvećanje prostate i kolekcija urinarnih simptoma koji se označavaju kao simptomi donjeg urinarnog trakta (eng. *lower urinary tract symptoms*, LUTS) (17). Otežano mokrenje (opstrukcija) kod bolesnika sa BPH posledica je kako uvećanja (mehanička komponenta), tako i povećanog tonusa glatko-mišićnih vlakana prostate (dinamička komponenta) (18). Ako se ne leči, BPH može izazvati ozbiljne komplikacije, kao što su kompletna retencija urina, infekcija urinarnog trakta, pojava kamena u mokraćnoj bešici i insuficijencija bubrega (19).

Etiologija BPH nije poznata. Do danas su samo dva čionioca nesporno vezana za pojavu BPH, a to su starost i uticaj androgenih hormona (20). Eksperimentalna istraživanja pokazala su da, pored proliferacije tkiva, u molekularnoj patogenezi BPH ulogu ima i inhibicija ćelijskog umiranja po tipu apoptoze (21,22).

Dijagnostika BPH obuhvata fizikalni i digitorektalni pregled (eng. *digital rectal examination*, DRE), određivanje serumske vrednosti PSA i dodatne urodinamske testove, kao što je merenje brzine protoka urina (23). Tokom dijagnostikovanja BPH, važno je isključiti moguće postojanje KP.

Uvećanje prostate, koje ne daje smetnje, nije potrebno lečiti. Preporučuje se samo redovno klinično praćenje bolesnika kroz polugodišnje ili godišnje lekarske preglede. Lečenje BPH može biti medikamentozno ili hirurško (24, 25). Najčešće medikamentozno lečenje obuhvata primenu alfa adrenergičkih blokatora ili inhibitora 5-alfa reduktaze (enzima koji učesvuje u pretvaranju testosterona u dihidrotestosteron). Hirurško lečenje može biti endoskopsko (transuretralna resekcija prostate) ili otvoreno hirurško lečenje (transvezikalna prostatektomija) (24). S obzirom da se razvija u prelaznoj zoni prostate i ima različitu etiologiju, BPH se definiše kao benigni tumor prostate i nije premaligna lezija KP (16).

### **1.2.3. Premaligne lezije prostate**

Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN) premaligna je lezija tkiva prostate (26). Na osnovu morfoloških izmena žlezdanih ćelija prostate, razlikuju se dve klase PIN-a: PIN niskog gradusa (eng. *low grade prostatic intraepithelial neoplasia*, LGPIN) i PIN visokog gradusa (eng. *high grade prostatic intraepithelial neoplasia*, HGPIN) (27).

Fenotipske i morfološke izmene koje karakterišu HGPIN definišu se kao intermedijerne promene između neizmenjenog i maligno transformisanog tkiva prostate. HGPIN je u preko 80% slučajeva, kao i KP, lokalizovan u perifernoj zoni prostate (28). U uzorcima tkiva prostate dobijenih nakon prostatektomija učinjenih zbog KP, HGPIN se dijagnostikuje u preko 70% slučajeva (29). U velikoj autopsijskoj studiji McNeal i Bostwick zastupljenost HGPIN iznosila je 82% u prostatama sa KP i 43% u prostatama bez KP (30, 31). Takođe, rezultati epidemioloških studija pokazali su da bolesnici kod kojih je dijagnostikovao HGPIN imaju 15 puta veći rizik za razvoj KP u odnosu na zdravu populaciju (32).

Bolesnici koji imaju HGPIN rutinski se ne leče. U poslednje vreme, preporučuje se upotreba dijetetskih suplemenata i vitamina koji deluju preventivno na razvoj KP (hemoprevencija) (33).

### **1.3. Karcinom prostate**

Prostata predstavlja složenu žlezdu čiju stromu čini vezivno tkivo, a parenhim epitel, sastavljen od žlezdanih i skvamoznih ćelija (3). Proces neoplastične transformacije pogađa sve tipove ćelija prostate, ali sa različitom učestalošću. Naime, neoplastična transformacija žlezdanog tkiva (adenokarcinom prostate) daleko je češći i od sarkoma (malignog tumora vezivnog tkiva) i od karcinoma skvamoznih ćelija prostate (9). Procenjuje se da adenokarcinomi prostate čine 95% svih malignih tumora prostate (34).

#### **1.3.1. Epidemiologija KP**

Adenokarcinom prostate predstavlja zdravstveni problem širom sveta, posebno u razvijenim zemljama koje imaju sve stariju populaciju i u kojima kontinuirano raste incidenca ove bolesti (35). Karcinom prostate je drugi najčešće dijagnostikovani maligni tumor muškaraca u svetu, i šesti po broju smrtnih slučajeva (36). Prema podacima Instituta za javno zdravlje Republike Srbije „Milan Jovanović Batut“, KP u Srbiji pokazuje rastući trend novodijagnostikovanih slučajeva, od 662 u 1999. godini, do 1.673 u 2009. godini (37).

Etiologija KP je nepoznata. Karakteriše ga veliki maligni potencijal i heterogeno ispoljavanje. Jedini čvrsto ustanovljeni faktori rizika za pojavu KP su životna dob i porodična istorija bolesti (38, 39). Stopa incidence KP raste sa godinama a posebno nakon 60. godine života, te se do skoro ovaj karcinom smatrao bolešću starijeg životnog doba (37). Nažalost, poslednjih decenija od KP oboljevaju i muškarci u tridesetim i četrdesetim godinama (40). Pored toga, studije na uzorcima tkiva prostate zdravih muškaraca u mlađoj životnoj dobi (od 20 do 40 godina) pokazale su često prisustvo histoloških centara KP. Ovi rezultati potvrđuju hipotezu da je inicijacija KP dugotrajan proces i da neoplastična transformacija tkiva prostate započinje u ranom životnom dobu (41).

Porodična anamneza znatno povećava rizik za pojavu KP. Porodična anamneza brata ili oca sa KP dva do tri puta povećava rizik oboljevanja, i to 6 do 7 godina ranije od životne dobi oboljevanja člana porodice (42). Istovremeno, sve više je dokaza za postojanje naslednog i brzo napredujućeg oblika KP koji se pojavljuje u ranoj životnoj dobi nezavisno od ostalih faktora rizika. Ova otkrića upozorila su na važnost naslednih genetičkih faktora u razvoju KP (43).

Epidemiološke studije pokazuju da od KP najčešće oboljevaju Afro-Amerikanci, a najređe Azijati (44). Takođe, epidemiološke studije pokazale su i značaj faktora povezanih sa načinom života u razvoju KP. Pušenje, gojaznost, konzumiranje alkohola i određeni načini ishrane su neki od njih (45).

I pored dosadašnjih saznanja o faktorima rizika za razvoj KP, perspektive za primarnu prevenciju ove bolesti su slabe. Ipak, brojni autori preporučuju promenu u načinu ishrane (prelazak na mediteranski način ishrane) i fizičku aktivnost kao mere prevencije KP (46).

### **1.3.2. Dijagnostika KP**

Dijagnostika KP podrazmeva nekoliko procedura. Klinički pregled obuhvata DRE i transrektalni ultrazvuk prostate (eng. *transrectal ultrasound*, TRUS) koji omogućava vizuelizaciju prostate sa semenim kesicama, korišćenjem ultrazvučne rektalne sonde. Dijagnostikovano uvećanje prostate je medicinska indikacija za određivanje nivoa PSA u serumu bolesnika. Uvećanje prostate i povećan nivo serumske vrednosti PSA ukazuje na moguće prisustvo KP koji se definitivno potvrđuje biopsijom. Danas se preporučuje TRUS-om vođena biopsija prostate, kao metoda za definitivnu potvrdu dijagnoze KP (47).

Dijagnostikovanje KP otežano je usled činjenice da su simptomi ove bolesti nespecifični i slični onima koji karakterišu BPH (simptomi subvezikularne opstrukcije). Svaki peti bolesnik sa KP, javi se lekaru zbog bolova u kostima ili patoloških fraktura, koji su simptomi metastaza KP u koštanom tkivu (48).

Postoje tri različite forme KP: klinički (manifestni), okultni i latentni. Manifestni KP su oni koje je moguće klinički dijagnosticirati na osnovu izraženih simptoma, dok se okultni KP definiše kao mala lezija prostate sa manifestnim metastazama. Latentna forma KP je klinički neprepoznatljiva (asimptomatski KP) (49). Najveći broj latentnih formi nikada neće progredirati ka obliku koji može da ugrozi život bolesnika a njegovo lečenje može dovesti do komplikacija koje utiču na kvalitet života. Ovo je dovelo do nastanka kovanice preterane dijagnoze (eng. *overdiagnosis*) (50). Prema poslednjim procenama, od 23 do 42% dijagnostikovanih slučajeva KP u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama moglo bi biti rezultat preterane dijagnoze (51). Nije mali broj autora koji preteranu dijagnozu vide kao značajan problem u savremenoj dijagnostici KP imajući u vidu komplikacije koje mogu nastati kao posledica lečenja ove bolesti (52).

### **1.3.3. Lečenje KP**

Lečenje KP zavisi od stadijuma bolesti, starosti bolesnika i njegovog opšteg stanja. Terapija KP može biti hirurška, zračna ili medikamentozna (53).

Aktivno praćenje bolesnika predstavlja način lečenja latentne forme KP, a u cilju ranog otkrivanja moguće progresije bolesti. Kod bolesnika sa lokalizovanim manifestnim KP dobrog opšteg stanja i u životnoj dobi do 70 godina, optimalna terapija je hirurška (radikalna prostatektomija, npr.). Stariji bolesnici sa lokalizovanom bolešću podvrgavaju se radikalnoj zračnoj terapiji. Primenom adekvatne terapije, lokalizovani KP danas su izlečivi (53).

Kod bolesnika sa metastatskim KP, svrha lečenja je da se spreči napredovanje bolesti, a terapija izbora je hormonska terapija koja podrazumeva hiruršku ili medikamentoznu kastraciju. Međutim, hormonska terapija dovodi do razvoja hormonske rezistencije. Hormonski rezistentni KP leče se sekundarnom hormonskom terapijom koja podrazumeva primenu antiandrogena, lekova koji blokiraju androgene receptore (AR) i njegove signalne puteve. Poslednja linija lečenja KP je hemioterapija, ali efekat primenjenih citostatika obično je kratkotrajan (53).

## **1.4. Standardni dijagnostički i prognostički parametri KP**

Standardni dijagnostički i prognostički parametri KP su serumska vrednost PSA, Gleason gradus sistem (GGS), i klinički stadijum KP (54).

### **1.4.1. Prostata specifični antigen**

Prostata specifični antigen je glikoprotein veličine oko 33 kDa, koga sekretuju epitelijalne ćelije prostate. To je kalikreinu slična serinska proteaza i ima ulogu u utečnjavanju (likvefakciji) semene tečnosti (55). Prvi test za određivanje serumske vrednosti PSA iz uzoraka periferne krvi muškaraca uveden je u kliničku praksu osamdesetih godina prošlog veka (56). Uvođenje PSA testa u kliničku praksu omogućilo je da se KP dijagnostikuju u ranoj fazi bez obzira na starost bolesnika (57).

Fiziološke vrednosti PSA u serumu, kreću se u granicama od 0,1 do 4 ng/ml. Porast nivoa PSA u cirkulaciji posledica je oštećenja bazalnih membrana žlezda i povećane vaskularizacije tkiva prostate, te nije isključivo uslovljena povećanom aktivnošću sekretornih ćelija (54). Sve ove promene za posledicu imaju pojavu PSA u vanćelijskom prostoru žlezdanog tkiva odakle putem limfe dospevaju u krvotok. Povišena serumska vrednost PSA predstavlja biohemijski pokazatelj kako trauma tako i bolesti prostate (prostatitis, BPH, KP) (58). Takođe, povišeni nivoi PSA u serumu detektovani su i kod retencije urina, nakon ejakulacije, prekomerne fizičke aktivnosti i stresa. I pored toga što povećanje serumske vrednosti PSA nije specifična samo za KP, njegovo određivanje i dalje predstavlja zlatni standard kako u dijagnostici tako i u praćenju progresije KP (59).

U cilju povećanja specifičnosti, uvedene su modifikacije PSA testa koje uključuju određivanje koncentracije inaktivnih prekursora PSA i odnosa slobodnog i ukupnog PSA u serumu. PSA u serumu može biti slobodan ili vezan za proteine inhibitore proteaza. Što je manja količina slobodnog PSA to je veća verovatnoća da je povećana serumska vrednost PSA biohemijski marker KP a ne neke druge bolesti prostate (60). Pored toga, vrše se i merenja: brzine porasta koncentracije PSA i

udvostručenja koncentracije PSA u serumu, gustine PSA (odnos količine PSA i volumena prostate) i gustine PSA u prelaznoj zoni (odnos količine PSA i volumena prelazne zone). Predlaže se i korišćenje dobno prilagođenih graničnih vrednosti PSA (61, 62).

#### 1.4.2. Klinički stadijum bolesti

Klinički stadijum bolesti, koji se određuje na osnovu kliničkog pregleda, predstavlja vodeći prognostički parametar KP. Za određivanje kliničkog stadijuma KP koriste se brojni sistemi klasifikacije. Danas je TNM (eng. *Tumour Node Metastasis*, TNM) sistem, preporučen od strane Evropske asocijacije urologa (eng. *European Association of Urology*, EAU), najčešće korišćen (63). TNM sistem opisuje primarni tumor (T), status limfnih čvorova (N) i prisustvo ili odsustvo metastaza (M) (tabela 1).

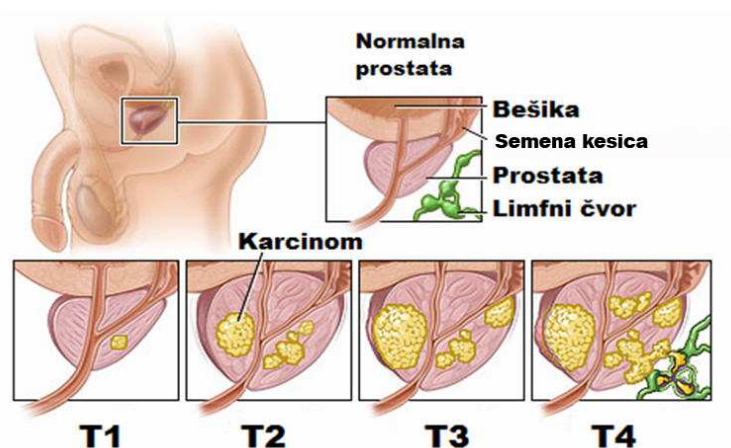
Tabela 1. TNM sistem koji se koristi u dijagnostici KP

Stadijum	Karakteristike stadijuma KP
<b>T stadijum</b>	<b>Opisuje primarni tumor</b>
<b>T0</b>	Nema detektabilnih primarnih tumora u okviru tkiva prostate
<b>T1</b>	Tumor nije klinički detektabilan ni kliničkim pregledom ni ultrazvukom
<b>T2</b>	Tumor ograničen na tkivo prostate
<b>T2a</b>	Tumor zahvata do 50% tkiva jednog lobusa prostate
<b>T2b</b>	Tumor zahvata više od 50% tkiva jednog lobusa, ali ne i drugi lobus
<b>T2c</b>	Tumor zahvata oba lobusa
<b>T3</b>	Tumor probija kapsulu prostate i/ili vrši invaziju na semene kanaliće
<b>T4</b>	Tumor vrši invaziju na druge organe
<b>N stadijum</b>	<b>Opisuje status limfnih čvorova</b>
<b>N0</b>	Lokalne metastaze u limfnim čvorovima nisu prisutne
<b>N1</b>	Prisutne su lokalne metastaze u limfnim čvorovima
<b>M stadijum</b>	<b>Opisuje prisustvo metastaza u kostima i udaljenim organima</b>
<b>M0</b>	Metastaze u kostima i udaljenim organima nisu prisutne
<b>M1</b>	Prisutne su metastaze u kostima i udaljenim organima

Stadijumi koji se dodeljuju primarnim malignim tumorima prostate su T stadijumi (slika 2). U T0 stadijumu nema detektabilnih primarnih tumora u okviru tkiva



prostate, dok se T1 stadijum odnosi na tumore koji nisu klinički detektabilni. Stadijum T2 odnosi se na KP koji su ograničeni na tkivo prostate, pri čemu tumori opisani T2a stadijumom zahvataju do polovine jednog lobusa, dok se T2b stadijumom opisuju tumori koji zahvataju više od polovine jednog lobusa, a T2c stadijumom tumori koji zahvataju oba lobusa prostate. Tumori koji probijaju kapsulu prostate i vrše invaziju na semene kanalice svrstavaju se u stadijum T3, dok se stadijum T4 odnosi na ekstrakapsularnu formu kada KP vrši invaziju drugih tkiva i organa (64) (slika 2).



Slika 2. T stadijumi KP po TNM sistemu klasifikacije.<sup>3</sup>

N stadijum određuje se analizom lokalnih limfnih čvorova u smislu prisustva ili odsustva malignih ćelija (N0 ili N1), a M stadijum opisuje postojanje metastaza KP u kostima i drugim udaljenim organima (M0 ili M1) (64). Metode koje se koriste prilikom procene stadijuma po TNM sistemu uključuju DRE, TRUS, magnetnu rezonanciju i rentgensko snimanje (65, 66).

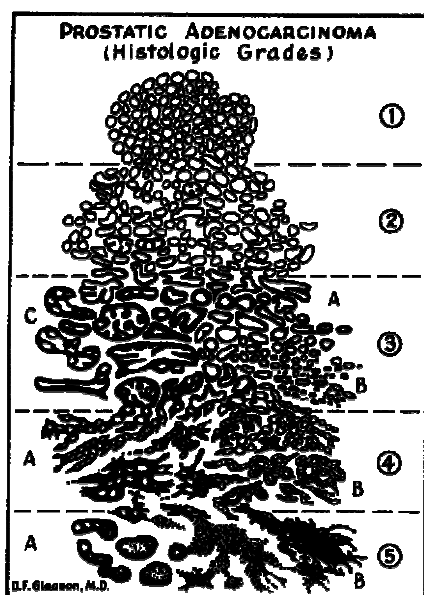
### 1.4.3. Glison gradus sistem

Gradus karcinoma definisan je kao pokazatelj njegovog biološkog potencijala, istovremeno određujući ukupno i specifično malignom bolešću uslovljeno preživljavanje bolesnika. Glavni sistem za određivanje gradusa KP je Glison gradus sistem (GGS). GGS nastao je iz zajedničkog iskustva patologa širom sveta, koji su, u

<sup>3</sup> Slika dostupna na URL: <http://www.prostatecancer.ca/Files/Diagrams-and-Images/Prostate-Cancer-diagram.aspx>

više od 50% mikroskopski analiziranih uzoraka KP, uočili najmanje dve različite slike tumorskog rasta (67).

Osnovu ovog sistema predstavlja pet histoloških slika ili Glison gradusa od 1 do 5 koje se uočavaju tokom mikroskopske analize tkiva KP i to korišćenjem malog uvećanja mikroskopa (10-40x). Glison gradusi opisuju poremećaje žlezdane arhitekture: njen oblik, veličinu i stepen žlezdane diferencijacije kao i stromalnu invaziju KP (slika 3). Primarni gradus definiše histološka slika koja se uočava u više od 50% analiziranog karcinoma u uzorku a sekundarni gradus histološka slika u manje od 50% analiziranog tkiva ali više od 5% njegovog volumena.



Slika 3. Glison gradus sistem. Pet histoloških slika koji opisuju poremećaj žlezdane arhitekture u KP<sup>4</sup>.

Iz zbira dve najzastupljenije histološke slike tumorskog rasta izvodi se zbirni Glison gradusa koji može imati vrednost od 2 do 10 (68). Zbirni Glisonovi gradusi od 2 do 4 odgovaraju dobro diferentovanom KP, od 5 do 7 srednje do slabo diferentovanom KP a od 8 do 10 slabo diferentovanom KP. Zbirni Glison gradus 7 može se uvrstiti u srednje diferentovane tumore ako je primarna slika 3 (3+4) ili u slabo diferentovane ako je primarna slika 4 (4+3) (69).

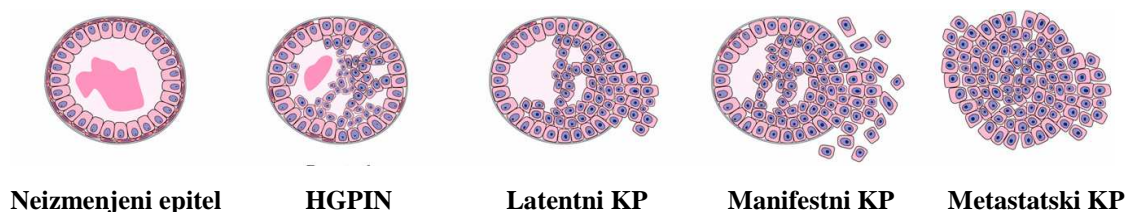
<sup>4</sup> Slika dostupna na URL: [http://supportgroup.org/gleason-score\\_58.htm](http://supportgroup.org/gleason-score_58.htm)

Više vrednosti GGS ukazuju na veći stepen promena žlezdanog tkiva prostate usled razvoja karcinoma, odnosno manju diferenciranost žlezda, što je u korelaciji sa većom agresivnošću KP (70). Dosadašnja primena GGS pokazala je njegov prognostički značaj koji se odnosi na očekujuću progresiju KP nezavisno od terapijskog postupka. Istovremeno, GGS ima i prediktivni značaj i to kao pokazatelj dobrog odgovora ili rezistencije KP na hormonsku terapiju (68).

Maligni potencijal KP procenjuje se i na osnovu patološkog stadijuma bolesti. Patološki stadijum određuje se nakon patohistološkog ispitivanja hirurški odstranjenih karličnih limfnih čvorova i prostate sa semenim kesicama. On daje precizan uvidu u proširenost tumora u prostati i izvan nje, precizira volumen tumora, zahvaćenost hirurških i anatomskih margina, ekstrakapsularno širenje kao i zahvaćenost semenih kesica i limfnih čvorova (54).

### 1.5. Molekularna osnova karcinoma prostate

Sa aspekta molekularne biologije maligne bolesti su bolesti gena. Progresivna akumulacija genetičkih oštećenja i mutacija dovodi do neoplastične transformacije tkiva (71). Neoplastična transformacija je proces narušavanja tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane deobe ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Dve glavne kategorije gena uključenih u proces neoplastične transformacije su protein-kodirajući proto-onkogeni i protein-kodirajući tumor-supresorni geni (antionkogeni). Neoplastična transformacija žlezdanog tkiva prostate podrazumeva veći broj genetičkih izmena koje su odgovorne za konverziju neizmenjenih epitelnih ćelija prostate, preko premaligne lezije HGPIN, u KP sa sposobnošću invazije (slika 4) (72).



Slika 4. Shematski prikaz neoplastične transformacije žlezdanog tkiva prostate. Histološku progresiju KP karakteriše progresivna akumulacija genetičkih izmena u proto-onkogenima, antionkogenima i genima koji kodiraju za RNK (Modifikovano Shen & Abate-Shen, 2010) (41).

Pored mutacija u protein-kodirajućim genima, u fokusu savremenih istraživanja patogeneze KP su i epigenetičke promene i mutacije u genima koji kodiraju regulatorne RNK (41, 73).

### 1.5.1. Protein-kodirajući proto-onkogeni i KP

Proto-onkogeni su geni čiji proteinski produkti stimulišu ćelijski rast i deobu u vremenski i prostorno strogo kontrolisanim uslovima, najčešće tokom embrionalnog razvića. Mutacijom, proto-onkogeni prelaze u formu onkogeni koji nekontrolisano ekspimiraju svoj proteinski produkt. Onkogeni imaju dominantnu funkciju u odnosu na malignitet, tj. dovoljna je jedna kopija aktiviranog onkogeni da bi se ekspimirao njegov efekat na proces neoplastične transformacije (72).

Za veliki broj protein-kodirajućih proto-onkogeni pokazano je da su aktivirani mutacijama u KP, a među najzastupljenijim su *c-myc* (eng. *cellular - Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*), *bcl-2* (eng. *B-cell Lymphoma 2*), kao i članovi familije gena za transkripcione faktore *ETS* (eng. *E-Twenty Six*) (74).

Gen *c-myc* lokalizovan je u hromozomskom regionu 8q24. U ovom regionu nalazi se i veći broj genetičkih varijanti za koje je u studijama genetičke asocijacije na čitavom genomu (eng. *Genome Wide Association Studies*, GWAS) pokazana asocijacija sa KP (75-77). Povećan nivo ekspresije ovog gena detektovan je u analiziranom tkivu HGPIN-a i KP u odnosu na onaj detektovan u neizmenjenom žlezdanom epitelu prostate i BHP (78). Mutacija gena *c-myc* rani je događaj u neoplastičnoj transformaciji tkiva prostate koji je odgovoran za inicijaciju i ranu progresiju KP (79). Koliki je značaj mutacije gena *c-myc* u procesu neoplastične transformacije tkiva prostate potvrđuju i eksperimentalne studije rađene na životinjskim modelima. Svi transgeni miševi sa prekomernom ekspresijom gena *c-myc* razvijali su HGPIN i/ili KP (80).

Povećan nivo ekspresije gena *bcl-2*, čiji je proteinski produkt antiapoptotski član istoimene familije regulatora apoptoze, detektovan je u velikom broju slučajeva KP.

Prekomerna ekspresija gena *bcl-2* dovodi se u vezu sa razvojem KP nezavisnog od androgenih hormona i povezana je sa lošijom prognozom bolesti (81).

Aktivacija proto-onkogenih značajnih za molekularnu patogenezu KP mogu biti posledica i hromozomski rearanžirani po tipu translokacije. Najčešći hromozomski rearanžirani u KP je genska fuzija 5' netranslatirajućeg regiona gena *TMPRSS2* (eng. *Transmembrane Protease, Serine 2*) sa genom *ERG* (*ETS Related Gene*) ili *ETV1* (eng. *Ets Variant 1*). Geni *ERG* i *ETV1* pripadaju porodici transkripcionih faktora *ETS*. Do danas, ovaj genetički rearanžirani detektovan je isključivo u uzorcima tkiva KP (82, 83). Zbog toga, genska fuzija *TMPRSS2/ERG* može predstavljati kako potencijalni genetički marker u dijagnostici tako i target biološke terapije KP (84). Eksperimentalne studije pokazale su da se genetički rearanžirani koji uključuju gene porodice *ETS* češće detektuju u uzorcima KP obolelih muškaraca evropskog porekla u odnosu na obolele Amerikance afričkog porekla ili Azijate (85).

### 1.5.2. Protein-kodirajući tumor-supresorni geni i KP

Tumor-supresorni geni su geni čiji proteinski produkti imaju sposobnost inhibicije ili supresije neoplastične transformacije. Biološka uloga antionkogenih ogleda se i u kontroli ćelijskog ciklusa. Zato se poremećaji u ekspresiji ovih gena smatraju kritičnim događajima u molekularnoj patogenezu malignih tumora uključujući i KP (72). U KP relativno često detektuju se mutacije u tumor-supresorskim genima *p53* (eng. *Protein 53*), *Rb* (eng. *Retinoblastoma*) i *PTEN* (eng. *Phosphatase and Tensin Homolog*) (86, 87).

Antionkogen *p53* jedan je od najčešće mutiranih gena u procesu neoplastične transformacije (88). Gen *p53* kodira za regulatorni protein koji reguliše ekspresiju većeg broja gena. Neki od tih gena kodiraju proteine koji su uključeni u procese regulacije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze i u kontroli propagacije ćelija kroz ćelijski ciklus (89). Rezultati analize zastupljenosti mutiranih formi proteina *p53* u HGPIN i u različitim stadijumima KP ukazali su na značaj inaktivacije gena *p53* u progresiji ovog malignog tumora (74).

Gen *Rb* je prvootkriveni tumor-supersorski gen. Protein *Rb* ima ulogu u procesima regulacije ekspresije gena i to kao protein koji maskira regulatorni protein *E2F*. Svoju biološku ulogu ostvaruje u procesima DNK replikacije, ćelijskog umiranja po tipu apoptoze i kontroli ćelijskog ciklusa (90). Deleciona ili mutaciona inaktivacija gena *Rb* detektovana je u 20% do 50% slučajeva KP i predstavlja negativan prognostički parametar (91).

Proteinski produkt gena *PTEN* je lipidna fosfataza koja predstavlja regulator signalnog puta posredovanog fosfatidilinozitol -3,4,5 trifosfat (PIP3) fosfatazom sa biološkom ulogom u kontroli ćelijskog ciklusa (92). Inaktivacija gena *PTEN* rezultira akumulacijom PIP3 fosfataze koja za posledicu ima inhibiciju procesa apoptoze i povećanje nivoa ćelijske proliferacije (93). Mutacije u genu *PTEN* detektovani su u 35% primarnih i preko 60% metastatskih KP (94).

Gubitak heterozigotnosti u hromozomskom regionu 8q21.2 detektuje se u preko 85% slučajeva KP. U ovom regionu nalazi se gen *NKX3.1*. Proteinski produkt ovog gena je regulatorni protein transkripcije koji se gotovo jedino eksprimira u tkivu prostate. Mutacija u genu *NKX3.1* vezana je za progresiju KP (95, 96). Druga istraživanja inaktivaciju gena *NKX3.1* promovišu i kao rani događaj tokom razvoja KP (97).

### **1.5.3. Androgeni hormoni i KP**

Prisustvo i delovanje androgenih hormona neophodno je za razviće i normalno funkcionisanje prostate. U prostati, tri androgena hormona, testosteron (sintetisan u testisima), androstenedion i dehidroepiandrosteron (sintetisani u nadbubrežnim žlezdama) prevode se u dihidrotestosteron. Dihidrotestosteron predstavlja ligand koji se vezuje za AR u citoplazmi ćelija prostate. Kompleks ligand-AR premešta se u jedro i vezuje za elemente odgovora u molekulu DNK (98). Na ovaj način, aktiviraju se geni čiji su proteinski produkti odgovorni za održavanje tkivne homeostaze strome i žlezdanog parenhima prostate (99). Pokazano je da u odsustvu androgenih hormona, ćelije parenhima sintetišu proapoptoske signale koji indukuju apoptozu žlezdanog

epitela što za posledicu ima smanjenje volumena prostate (100). To je razlog što je jedan od često primenjivanih pristupa u lečenju KP androgena ablacija, odnosno smanjenje količine androgenih hormona dostupnih ćelijama žlezdanog epitela prostate. Ovaj vid hormonske terapije dovodi do apoptoze malignih ćelija i posledičnog smanjenja veličine tumora. Posle duže primene, hormonska terapija prestaje da bude delotvorna usled progresije KP u vrlo invazivnu formu nezavisnu od androgenih hormona (101, 102).

Smatra se da promene u testikularnoj diferencijaciji indukovanoj androgenim hormonima imaju ključnu ulogu u progresiju primarnog u metastatski KP (103). Istovremeno, i razvoj hormonske rezistencije povezan je sa mutacijama u genu za AR. Do danas, opisano je oko 660 mutacija gena koji kodira AR od kojih većina izaziva sindrom androgenske nesenzitivnosti (104). U KP najčešće se detektuju tačkaste mutacije i amplifikacija gena za AR i smatraju se značajnim za progresiju bolesti (105). Tačkaste mutacije dovode do izmena u strukturi ligand-vezujućeg domena ovog receptora i time proširuju spektar potencijalnih liganada (102). Amplifikacije ili mutacije gena za AR detektuju se u preko polovine metastatskih KP, tako da promene u ekspresiji gena za AR predstavljaju negativan prognostički parametar u lečenju KP (106).

#### **1.5.4. Regulatorne RNK i KP**

Sve veći značaj u istraživanjima molekularne patogeneze malignih tumora pridaje se nekodirajućim molekulima RNK (mikroRNK i dugim nekodirajućim RNK). Kao i produkti protein-kodirajućih gena, ovi molekuli RNK mogu posedovati tumor-supresorske ili onkogene karakteristike (41, 107). Kod KP detektovane su promene u strukturi ili nivou ekspresije brojnih nekodirajućih RNK (108).

Antigen karcinoma prostate 3 (eng. *Prostate Cancer Antigen 3*, PCA3) je duga nekodirajuća RNK koja se tkivno – specifično eksprimira u prostati (55). Korišćenjem većeg broja metoda za detekciju molekula RNK pokazano je da je koncentracija PCA3 u neizmenjenom ili benigno transformisanom tkivu 60 puta manja od one detektovane u

malignom tkivu prostate. Istovremeno, ekspresija PCA3 nije detektovana u drugim neizmenjenim ili maligno transformisanim tkivima čoveka. Zato, detekcija ekspresije molekula PCA3 predstavlja potencijalno vrlo specifičan biološki marker za dijagnostikovanje KP (109). Iako je primena detekcije molekula PCA3 u dijagnostičke svhe i dalje u fazi kliničkog ispitivanja, komercijalni kitovi za detekciju PCA3 iz urina dostupni su preko pet godina (110, 111).

Rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazali su da je ekspresija tumor-supresornog gena *PTEN* negativno regulisana od strane mikroRNK *miR-21* (112). Pokazano je i da je smanjena ekspresija tumor-supresorskih mikroRNK *miR-101* povezana sa progresijom KP (108).

Pored PCA 3, i druge duge nekodirajuće RNK učestvuju u patogenezi KP. Među njima je i *PTENP1* (eng. *phosphatase and tensin homolog pseudogene 1*). Poremećaj u ekspresiji ove duge nekodirajuće RNK u korelaciji je sa smanjenom ekspresijom tumor-supresornog gena *PTEN* (113). Istraživanja su pokazala da ulogu u patogenezi KP ima i *ANRIL* (eng. *Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus*) čija je aktivnost povezana sa represijom inhibitora kinaza *p15*, *p16* i *p19* uključenih u procese kontrole ćelijskog ciklusa (114).

### **1.5.5. Epigenetičko utišavanje gena kod KP**

Ključni procesi koji su odgovorni za epigenetičko utišavanje gena su metilacija molekula DNK i posttranslacione modifikacije proteina histona (115). Kao i kod drugih malignih tumora, promene u mehanizmima epigenetičkog utišavanja gena smatraju se važnim molekularnim događajima u patogenezi KP (107, 116).

Ekspresija tumor-supresorskih gena često je utišana metilacijom CpG ostrvaca u okviru promotorskih regiona ovih gena koja se najčešće odvija u inicijalnim fazama neoplastične transformacije (117, 118). Prvi gen za koji je pokazano da mu je promotor epigenetički utišan metilacijom u KP je gen za glutation S-transferazu pi 1 (eng.



*glutathione S-transferase pi 1, GSTP1*), koja učestvuje u odgovoru ćelije na oksidativni stres (41).

U KP detektovane su i promene u obrascima posttranslacione modifikacije histonskih proteina. Povećan nivo trimetilacije lizina na poziciji 27 histona H3 (H3K27me3) predstavlja epigenetičku modifikaciju asociranu sa progresijom KP. Histon metil-transferaza EZH2 koja katalizuje ovu metilaciju, povišeno je eksprimirana u većini analiziranih uzoraka malignog tkiva prostate (119). Prekomerna ekspresija ovog enzima odgovorna je i za povećan nivo metilacije lizina na poziciji 4 histona H3 (H3K4me1) koji se detektuje u uzorcima molekula DNK izolovanih iz tkiva metastatskih KP (120). Dosadašnja istraživanja pokazala su i smanjen nivo acetilacije N-krajeva proteina histona H3 i histona H4 u maligno transformisanom tkivu u odnosu na nivo detektovan u neizmenjenom žlezdanom epitelu prostate (121).

## **1.6. Genetičke varijante asocirane sa KP**

Ista sekvenca molekula DNK između individua može se razlikovati u samo jednom baznom paru. Ova razlika naziva se polimorfizam pojedinačnih nukleotida ili tačkasti polimorfizam (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP), sada često poznat kao tačkasta varijanta (eng. *Single Nucleotide Variant*, SNV). U genomu čoveka nalazi preko 10 miliona tačkastih polimorfizama. Tačkasti polimorfizam definiše se kao genetička varijanta jednog nukleotida koja se u opštoj populaciji javlja sa učestalošću većom od 1% (122). Ove razlike u sekvenci najveći su izvor razlika u genomima između pojedinaca. Sredinom devedesetih godina prošlog veka počela su istraživanja uloge ovih razlika u patogenezi kompleksnih bolesti uključujući i maligne tumore (123).

### **1.6.1. Nasledna predispozicija KP**

Na značaj genetičke osnove u razvoju KP ukazali su rezultati epidemioloških studija koji porodičnu istoriju ovog karcinoma svrstavaju među najznačajnije faktore rizika. Na osnovu porodične istorije, KP grupišu se u sporadični i familijarni tip, pri čemu se naslednim KP označava podtip familijarnog KP kod kojeg je izražen Mendelovski

obrazac nasleđivanja (124). Procenjuje se da do 5% svih dijagnostikovanih KP pripadaju naslednom tipu (125).

Analize vezanosti (eng. *Linkage analyses*) kod naslednog tipa KP dovele su do identifikacije prvih lokusa asociranih sa razvojem KP. To su: *HPC1* (eng. *Hereditary Prostate Cancer 1*) mapiran u hromozomskom regionu 1q24-25, *PCAP* (eng. *Predisposing for Cancer Prostate*) mapiran u regionu 1q42.2-43 i *HPCX* (eng. *Hereditary Prostate Cancer on X Chromosome*) mapiran u regionu Xq27-28. Kasnije je identifikovano još 4 lokusa asociranih sa razvojem naslednih KP (126).

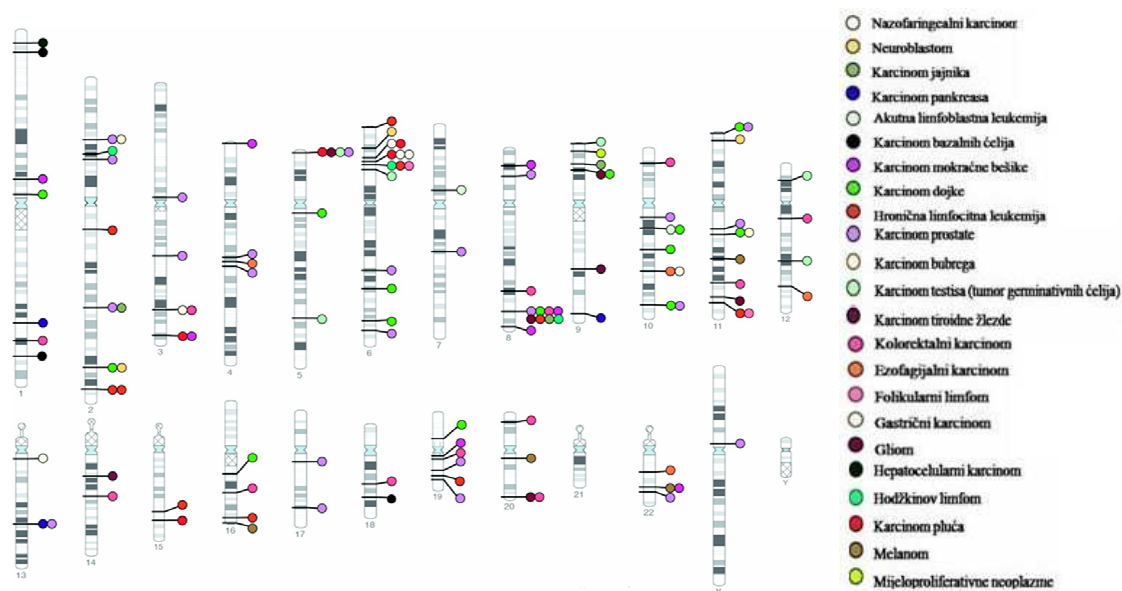
Korišćenjem analiza vezanosti mapirani su regioni asocirani sa razvojem naslednih KP na genetičkoj mapi genoma čoveka. Ova istraživanja obuhvatala su veliki broj porodica u kojima je pojava bolesti bila česta i podrazumevala su analizu ogromnog broja uzoraka (mejoza) kako bi se rezolucija mapiranog regiona svela na relativno prihvatljive okvire (najčešće desetine miliona baza). Pristupom baziranim na analizi vezanosti identifikovani su lokusi sa većom penetrabilnošću asocirani sa razvojem naslednog KP. Jasno je da su ovi pokušaji doveli do ograničenog broja rezultata s obzirom da je KP kompleksna i poligeniski determinisana bolest (127, 128).

Kasnije studije fokusirale su se na identifikaciju lokusa sa malom penetrabilnošću asociranih sa sporadičnim KP, a za koje se smatra da doprinose razvoju i familijarnih formi. Poseban značaj u identifikaciji ovih lokusa imaju GWAS (129).

### **1.6.2. Studije asocijacije na čitavom genomu u istraživanju KP**

GWAS predstavljaju značajan pristup u identifikaciji lokusa sa malom penetrabilnošću asociranih sa KP koji ne uključuje prethodno definisanje gena kandidata (130). Strategija GWAS zasniva se na uporednoj analizi gotovo kompletnih genoma bolesnika sa KP i mušakraca kod kojih nije dijagnostikovano KP (kontrolna grupa). U cilju ove analize koriste se posebno dizajnirani genski čipovi koji detektuju razlike u pojedinačnim nukleotidima između dve grupe uzoraka (131). Tako, GWAS

podrazumevaju simultanu genotipizaciju velikog broja SNP (132, 133). Zahvaljujući ovom pristupu identifikovano je više od 30 SNP asociiranih sa KP (slika 5) (134).



Slika 5. Lokusi asociirani sa malignim tumorima kod čoveka identifikovani u GWAS (lokusi asociirani sa različitim malignim bolestima obeleženi su različitim bojama, lokusi asociirani sa KP obeleženi su ljubičastim kružićem) (Modifikovano Hindorff LA et al., 2011) (129).

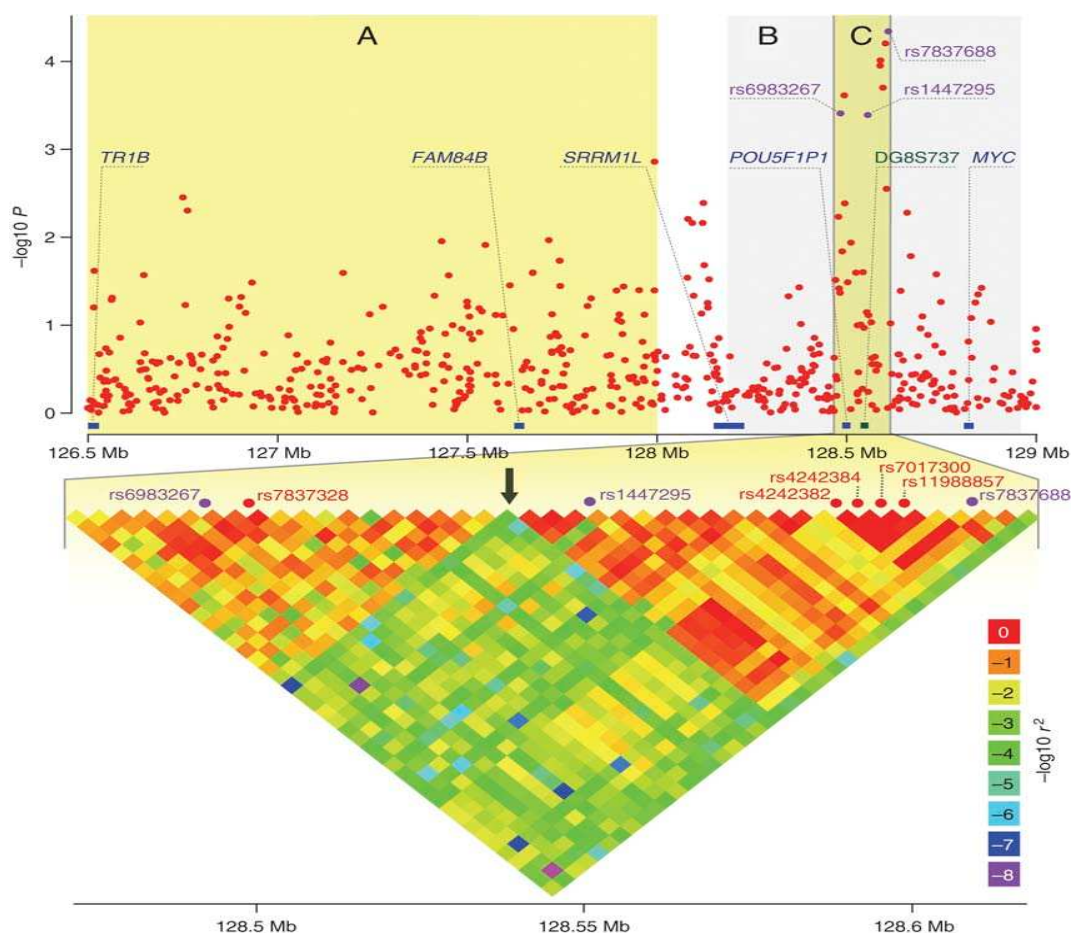
Ovi SNP razlikuju se u doprinosu riziku za razvoj KP, a njihova asocijacija sa bolešću može da varira između populacija (130, 135). Neke od identifikovanih SNP pokazali su asocijaciju sa rizikom za razvoj dok su druge pokazale asocijaciju sa rizikom za progresiju KP. Istraživanja su pokazala da neki SNP pokazuju kumulativni efekat koji ima jaču asocijaciju sa rizikom za razvoj ili progresiju KP (136).

### 1.6.3. Genetičke varijante u regionu 8q24 asociirane sa KP

Studije asocijacije su, kao prvi hromozomski region doveden u vezu sa povišenim rizikom za razvoj KP, identifikovale region q24 na hromozomu 8 (137, 138). U ovom regionu, veličine oko 1 Mb, koji je genska pustinja, uočeno je preko 10 genetičkih varijanti za koje je pokazano postojanje asocijacije sa KP (76, 139, 140). Kao i za genetičke varijante u drugim regionima i GWAS koje su razmatrale ovaj region za uzorak su imale geografski i „rasno“ manje ili više homogene populacije. Zbog toga se

u poslednjih par godina javio veliki interes da se asocijacija SNP u regionu 8q24 proveri i u većem broju različitih populacija, u okviru sve tri „rase“.

U replikativnim studijama potvrđena je jaka asocijacija pet SNP u regionu 8q24 sa rizikom za razvoj KP. To su rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300 i rs7837688 (139, 141-143). Ovih pet genetičkih varijanti nalaze se u regionu dužine od 126 kb. Varijante rs1447295, rs4242382, rs7017300 i rs7837688 nalaze se u prvih 50 kb regiona, dok je rs6983267 od njih udaljen oko 70 kb (139) (slika 6). Meta-analiza genetičkih varijanti regiona 8q24 pokazala je da svi analizirani SNP doprinose povećanju rizika za pojavu KP i to za 25-50% (144).



Slika 6. Shematski prikaz pozicija genetičkih varijanti asociranih sa rizikom za razvoj KP na fizičkoj mapi regiona 8q24. Prikazan je negativni logaritam kvadrata koeficijenta korelacije ( $-\log_{10} r^2$ ). Koeficijent korelacije predstavlja meru verovatnoće da se dve genetičke varijante vezano nasleđuju. Što je vrednost  $-\log_{10} r^2$  niža, verovatnoća da se dve genetičke varijante vezano nasleđuju je slabija. Izuzetno jaka veza između dva SNP predstavljena je crvenom bojom, dok ljubičasta boja označava da nema povezanosti. (Yeager M et al., 2007) (77).

Molekularna osnova asocijacije analiziranih SNP u regionu 8q24 sa pojavom KP još uvek nije poznata (136). Poslednja istraživanja pokazuju da se u okviru ovog regiona nalaze veći broj pojačivača koji učestvuju u regulaciji ekspresije gena *c-myc* (145). Genetičke varijante rs1447295 i rs6983267 upravo su locirane unutar ovih regulatornih elemenata (146, 147). Istovremeno, u analiziranom regionu 8q24 do danas je kompjuterski detektovano preko 10 mikroRNK što takođe ukazuje na značaj ovog regiona u regulaciji ekspresije gena (148).

Pored KP, pokazano je da su genetičke varijante u regionu 8q24 asocirane i sa rizikom za razvoj kancera kolona i karcinoma dojke i jajnika (140, 149, 150).

#### **1.6.4. Genetičke varijante u regionu 17q12 asocirane sa KP**

Pored genetičkih varijanti u regionu 8q24, GWAS identifikovale su i dve genetičke varijante u regionu 17q12 koje su snažno asocirane sa KP. To su genetičke varijante rs7501939 i rs3760511 (151). Veći broj replikativnih studija u evropskim, afro-američkim i azijskim populacijama potvrdile su asocijaciju ova dva SNP sa KP (139, 152-157). Dosadašnja istraživanja pokazuju da je asocijacija rs7501939 i rs3760511 sa rizikom za razvoj KP naročito izražena kod bolesnika u mlađem životnom dobu (152). Za genetičku varijantu rs7501939 pokazana je inverzna korelacija asocijacije sa rizikom za pojavu KP i rizikom za razvoj dijabetesa tipa 2 (153, 158).

Genetička varijanta rs7501939 nalazi se u prvom intronu, a genetička varijanta rs3760511 u promotoru gena koji kodira jedarni protein HNF1B (eng. *hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B*). Protenski produkt gena *HNF1B* reguliše ekspresiju gena albumin i alfa-fetoprotein u hepatocitama (159-161). U drugim tkivima (pankreas i bubrezi, npr.), proteinski produkt gena *HNF1B* ima ulogu u regulaciji glukoze homeostaze (162). Do danas nije pokazana ekspresija gena *HNF1B* u tkivu prostate. Zbog toga, molekularna osnova asocijacije SNP u regionu 17q12 sa rizikom za pojavu i/ili progresiju KP još uvek nije poznata.

Dosadašnje GWAS pokazale su asocijaciju SNV u regionu 17q12 sa karcinomima jajnika (163) i materice (164), skvamoznim karcinomom pluća (165) kao i sa kompleksnim bolestima kao što su astma (166) i IgA nefropatija (167).

#### **1.6.5. Genetičke varijante u regionu 7q36 asociirane sa KP**

Studije asocijacije pokazale su povezanost nekoliko genetičkih varijanti u okviru regiona 7q36 sa pojavom i/ili progresijom KP. Većina njih se nalazi u okviru promotora gena *NOS3* (eng. *Nitric oxide synthase 3*) (168).

Gen *NOS3* kodira endotelijalnu formu enzima azot oksid sintaze, koji pripada familiji enzima koji katalizuju sintezu azot oksida (NO) iz L-arginina i L-citulina (169). Endotelijalna izoforma predstavlja primarni signal za kontrolu sekrecije insulina, vaskularnog tonusa i tonusa disajnih puteva, a uključen je i u regulaciju srčane funkcije i angiogeneze (170).

Već 40 godina postoje eksperimentalni dokazi da rast malignog tumora i pojava metastaza kritički zavise od neovaskularizacije (angiogeneze) tumorskog tkiva. Formiranje novih krvnih sudova malih dimenzija koji okružuju tumor omogućava migraciju malignih ćelija (171). Značaj angiogeneze za rast i metastaziranje tumora pokazan je i kod KP (172). Ranija istraživanja pružaju dokaze da NO ima ulogu u angiogenezi tokom neoplastične transformacije (173). Istovremeno, rezultati ekspresionalnih studija pokazali su značaj endogenog NO u procesima inhibicije ćelijskog umiranja po tipu apoptoze tumorskih ćelija (174). Poslednja istraživanja pokazuju da efekat NO na proces apoptoze malignih ćelija KP zavisi i od stadijuma tumora. Smanjen nivo NO, u inicijalnoj fazi i u kasnim metastatskim stadijumima, ima antiapoptotsku ulogu, dok povišen nivo NO karakteriše fazu tumorskog rasta kada su procesi angiogeneze najintenzivniji (175).

U dosadašnjim istraživanjima asocijacije SNP u genu za *NOS3* sa KP analizirano je pet SNP u okviru promotora (*NOS3* -786T>C, *NOS3* -764A>G, *NOS3* -714G>T, *NOS3* -690C>T, *NOS3* -649G>A) i rs1799983 u egzonu 7 (176-179).

Pojava alela T u genetičkoj varijanti *NOS3* 894G>T (rs1799983) rezultira aminokiselinskom zamenom na poziciji 298 (Glu298Asp) koja utiče na smanjene stabilnosti proteina (180). Postoje eksperimentalni dokazi da pojava alela C genetičke varijante *NOS3* -786T>C (rs2070744) formira mesto za vezivanje proteina *RPA1* (eng. *replication protein A1*) (181) i smanjuje promotorsku aktivnost (176).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je genetička varijanta rs1799983 asocirana sa rizikom za progresiju KP, kao i sa pojavom metastaza (182). Studija sprovedena u Brazilu pokazala je da su genetičke varijante rs2070744 i *NOS3* -690C>T (rs3918226) promotorskog regiona gena *NOS3* u asocijaciji sa rizikom za progresiju KP, ali ne i sa rizikom za razvoj (178). Asocijacija rs2070744 sa rizikom za razvoj KP pokazana je u studiji rađenoj u populaciji Irana (183).

Pored KP, pokazana je asocijacija genetičkih varijanti regiona 7q36 sa patogenezom moždanog udara (184), hipertenzijom (185), dijabetesom (186), nefropatijom (187), koronarnim spazmom (176), erektilnom disfunkcijom (188), infertilitetom muškaraca (189) i karcinomom dojke (190).

Zaključno sa 30. septembrom 2013. godine publikovano je 27 GWAS koje su za temu imale asocijaciju SNP sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP. Rezultati ovih studija pokazali su da se analizirane genetičke varijante razlikuju u doprinosu rizika za razvoj ili progresiju KP, a njihova asocijacija sa bolešću može da varira između populacija. Rezultati replikativnih studija slučajeva i kontrola potvrdili su da pojedinačne genetičke varijante mogu imati različit stepen asocijacije sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP u različitim populacijama. Pored toga, studije su pokazale da određena genetička varijanta u jednoj populaciji povećava a drugoj smanjuje rizik za razvoj i/ili progresiju KP (191). Zbog toga je tema ove doktorske disertacije utvrđivanje moguće asocijacije alela i genotipova 13 genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa rizikom za razvoj i progresiju KP u grupi bolesnika sa teritorije Republike Srbije.

### **1.7. Ciljevi rada**

1. Utvrditi moguću asocijaciju alela i genotipova 13 genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa rizikom za razvoj KP kod muškaraca iz populacije Srbije.
2. Utvrditi moguću asocijaciju učestalosti alela i genotipova 13 genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa vrednostima standardnih dijagnostičkih i prognostičkih parametara KP u grupi bolesnika iz populacije Srbije.
3. Utvrditi moguću asocijaciju alela i genotipova 13 genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa rizikom za progresiju KP u grupi bolesnika iz populacije Srbije.



## 2. Materijal i metode

### 2.1. Materijal

Analiza povezanosti genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24, i 17q12 sa rizikom za pojavu i progresiju KP rađena je na uzorcima periferne krvi bolesnika koji su u periodu od februara 2009. do aprila 2012. godine lečeni na Klinici za urologiju Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ i Odeljenju za urologiju Hirurške klinike Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“. Istraživanje je obavljeno uz saglasnost Etičkih komiteta Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ i Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ u Beogradu.

Dijagnostika KP i BPH sprovedena je prema standardnom kliničkom protokolu koji uključuje klinički pregled, određivanje serumske vrednosti PSA i biopsiju prostate. Klinički pregled obuhvatao je ultrazvuk karlice, abdomena, DRE i TRUS. Serumske vrednosti PSA utvrđivane su monoklonskim imunoesejom *Hybritech* metodom (*Beckman Hybritech assay; Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, SAD*). Kod svih bolesnika sa KP učinjena je ultrazvukom navođena biopsija prostate. Patohistološkim izveštajem bili su objedinjeni standardni parametri prema protokolu za prijavljivanje KP. Klinički stadijum KP utvrđivan je po TNM sistemu, a iz parafinskih kalupa obrađenog tkiva prostate, korišćenjem standardnog bojenja hematoksilin-eozinom (H&E) određivan je histološki tip, Glison gradus sistem i patohistološki stadijum KP.

Analizirano je 150 uzoraka periferne krvi bolesnika sa KP i 150 uzoraka periferne krvi bolesnika sa BPH. Kontrolnu grupu činilo je 100 uzoraka brisa bukalne sluznice muškaraca kod kojih nisu dijagnostikovane bolesti prostate. Bolesnicima sa KP i BPH uzorkovano je po 5 ml periferne krvi sa natrijum-citratom kao antikoagulansom, u finalnoj koncentraciji od 0,38%, a uzorci su čuvani na  $-20^{\circ}$  C.

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Selekcija bolesnika sa KP na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara KP

Bolesnici sa KP prvo su selektovani prema standardnim dijagnostičkim i prognostičkim parametrima KP prema preporukama EAU (66).

Formirane su tri grupe bolesnika sa KP na osnovu vrednosti serumskog PSA: prvu grupu činili su bolesnici sa serumskim vrednostima PSA manjim od 10 ng/ml, drugu grupu činili su bolesnici sa serumskim vrednostima PSA u granicama od 10 do 20 ng/ml i treću grupu bolesnici sa serumskim vrednostima PSA većim od 20 ng/ml. Takođe, bolesnici sa KP podeljeni su u tri grupe na osnovu vrednosti GGS: prvu sa GGS <7, drugu sa GGS =7 i treću sa GGS >7. Na osnovu kliničkog stadijuma KP, bolesnici su, takođe, svrstavani u tri grupe: grupu sa stadijumom T1, grupu sa stadijumom T2 i grupu sa stadijumima T3 i T4. Na osnovu prisustva, odnosno odsustva metastaza KP, bolesnici su svrstavani u dve grupe (66).

Bolesnici sa KP podeljeni su i grupe prema riziku za progresiju bolesti. Podela je pratila preporuke D`Amico i saradnika (192), kao i preporuke Medeiros-a i saradnika (182).

Prema D`Amico i saradnicima bolesnici sa KP podeljeni su u tri grupe: grupa bolesnika sa niskim (PSA  $\leq$ 10 ng/ml, klinički stadijum  $\leq$  T2a, i GGS  $\leq$ 6), srednjim (PSA od 10 do 20 ng/ml ili klinički stadijum T2b-c, ili GGS 7) i visokim rizikom za progresiju bolesti (PSA  $\geq$ 20 ng/ml, ili klinički stadijum  $\geq$  T3, ili GGS  $\geq$ 8) (192). Prema kriterijumima Medeiros-a i saradnika bolesnici sa KP podeljeni su u dve grupe sa: niskim (GGS  $\leq$ 6, klinički stadijum T1 i T2 i odsustvo metastaza na kostima) i visokim (GGS  $\geq$ 7, ili klinički stadijum T3 i T4, ili prisustvo metastaza na kostima) rizikom za progresiju KP (182).

## 2.2.2. Izolacija genomske DNK iz krvi i brisa bukalne sluznice

Izolacija genomske DNK iz uzoraka pune periferne krvi i bukalnih briseva vršena je pomoću *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*, Hilden, Nemačka), prema uputstvu proizvođača.

Procedura izolovanja DNK iz periferne krvi:

1. U mikrotube od 1,5 ml dodavano je: 200 µl pune periferne krvi, 200 µl AL pufera i 20 µl proteinaze K;
2. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i inkubirana 10 minuta na 56° C;
3. Dodavano je 200 µl 96% etanola, vorteksovano 15 sekundi i centrifugirano na 8000 rpm (eng. *rotation per minute*, rpm) 1 minut (*Labofuge 400R*, rotor 3324, *Heraus instruments*, Hanau, Nemačka);
4. U kolonice je dodavano po 620 µl inkubirane smeše. Kolonice su centrifugirane na 8000 rpm 1 minut;
5. Kolonice su smeštane u novu kolektorsku tubu, dodavano je 500 µl AW1 pufera i centrifugirane su na 8000 rpm 1 minut;
6. Kolonice su smeštane u novu kolektorsku tubu, dodavano je 500 µl AW2 pufera i centrifugirane su na 13000 rpm 3 minuta;
7. Kolonice su smeštane u nove mikrotube od 1,5 ml i DNK sa membrane kolonice eluirana je sa 200 µl dejonizovane vode (*Nuclease-Free Water*, *Qiagen*, Hilden, Nemačka);
8. Smeša je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirana na 13000 rpm 1 minut;
9. Izolovana DNK čuvana je na + 4° C.

Procedura izolovanja DNK iz briseva bukalne sluznice:

1. Vrhovi drvenih štapića sa vatom na kojoj su se nalazili uzorci bukalne sluznice isecan su i stavljeni u mikrotube zapremine 1,5 ml;
2. U mikrotube sa brisevima dodavano je 300 µl pufera TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8.0), 300 µl AL pufera i 20 µl proteinaze K;
3. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i inkubirana 30 minuta na 56° C;

4. Dodavano je 200  $\mu$ l 96% etanola, vorteksovano 15 sekundi i centrifugirano na 8000 rpm (eng. *rotation per minute*, rpm) 1 minut;
5. U kolonice je dodavano po 620  $\mu$ l uspostavljene smeše. Kolonice su centrifugirane na 8000 rpm 1 minut;
6. Kolonice su smeštane u novu kolektorsku tubu, dodavano je 500  $\mu$ l AW1 pufera i centrifugirane su na 8000 rpm 1 minut;
7. Kolonice su smeštane u novu kolektorsku tubu, dodavano je 500  $\mu$ l AW2 pufera i centrifugirane su na 13000 rpm 3 minuta;
8. Kolonice su smeštane u nove mikrotube od 1,5 ml i DNK sa membrane kolonice je eluirana sa 100  $\mu$ l dejonizovane vode (*Nuclease-Free Water, Qiagen, Hilden, Nemačka*);
9. Smeša je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi i potom centrifugirana na 13000 rpm 1 minut;
10. Izolovana DNK čuvana je na + 4° C.

Količina i kvalitet izolovane DNK proveravani su elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu. Vizuelizacija uzoraka vršena je dodavanjem etidijum-bromida (EtBr) u gel. Kvalitet izolovane DNK određivan je posmatranjem DNK na agaroznom gelu na transiluminatorom. Prisustvo jedne diskretne trake ukazivalo je na to da je izolovana DNK nativna, dok je prisustvo razmaza ukazivalo da je izolovana DNK bila delimično ili potpuno degradovana (193). Kvantifikacija izolovane genomske DNK vršena je poređenjem intenziteta fluorescencije analiziranih DNK i standarda DNK.

Kvantifikacija izolovane genomske DNK vršena je prema sledećem protokolu:

1. 0,8% rastvor agaroze (*Serva, Heidelberg, Nemačka*) zagrejava se do ključanja u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris – borat, 1 mM EDTA, pH 8);
2. Dodavan je EtBr u finalnoj koncentraciji 0,5  $\mu$ g/ ml, a gel je hlađen do 40° C;
3. Ohlađen rastvor nalivan je u kadicu za elektroforezu i ostavljan je da polimerizuje 30 do 45 minuta na sobnoj temperaturi;
4. Uzorci DNK (5  $\mu$ l) mešani su sa puferom za nalivanje uzoraka (0,25% bromfenol plavo (w/v) 30% glicerol) u odnosu 5:1 i nalivani na gel;

5. Za kvantifikaciju izolovane genomske DNK korišćen je marker K562 (*Promega*, Madison, WI, SAD), a pri nanošenju na gel tretiran je jednako kao i DNK uzorci;
6. Elektroforeza je vršena u 0,5xTBE puferu, pri konstantnom naponu od 100 V u sistemu za elektroforezu (*Mini-sub Cell GT* ili *Wide Mini-sub Cell GT*, *BioRad*, Hercules, CA, SAD);
7. Po završetku elektroforeze, gel je preuziman iz sistema i izlagan UV svetlu ( $\lambda = 254$  nm) na transiluminatoru (*Mini-transilluminator*, *BioRad*, Hercules, CA, SAD).

### **2.2.3. Genotipizacija genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12**

Analiza genetičkih varijanti u regionima 8q24 i 17q12, kao i varijante rs1799983 u regionu 7q36 vršena je primenom metode analize polimorfizama u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Fragmenti DNK u okviru kojih su se nalazile ispitivane genetičke varijante umnožavani su lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR), a zatim je vršena restrikciona digestija PCR produkata. Produkti restrikcione digestije razdvajani su elektroforezom u 3% agaroznom gelu, a sam genotip je određivan interpretacijom rezultata. U cilju provere rezultata restrikcione digestije, slučajno odabrani uzorci analizirani su metodom automatskog sekvenciranja.

Analiza genetičkih varijanti u promotoru gena *NOS3* koji se nalazi u regionu 7q36 vršena je primenom metode automatskog sekvenciranja. Ispitivani fragmenti DNK najpre su umnoženi PCR reakcijom, zatim prečišćeni i pripremljeni za automatsko sekvenciranje. Analiza očitanih sekvenci vršena je upotrebom softvera *BioEdit Sequence Alignment Editor* (*Ibis Biosciences*, Abbott Park, IL, SAD).

### 2.2.3.1. Umnožavanje analiziranih fragmenata DNK lančanom reakcijom polimeraze

PCR je selektivna *in vitro* amplifikacija određenog fragmenta DNK. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom, a selektivnost reakcije ogleda se u upotrebi prajmera, oligonukleotida dužine 14-40 nukleotida, koji hibridizuju sa komplementarnim sekvencama u molekulu DNK. PCR reakcija odvija se u mikrotubama koje se podvrgavaju preciznim, cikličnim promenama temperature (194).

Za izvođenje PCR reakcija korišćeni su prajmeri identični onima korišćenim i u drugim studijama koje su za cilj imale analizu istih genetičkih varijanti (tabela 2). Komponente PCR smeša kao i njihove početne i krajnje koncentracije nalaze se u Dodatku 1, dok se temperaturni profili PCR reakcija nalaze u tabeli 3.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama za amplifikaciju fragmenata molekula DNK koji sadrže analizirane genetičke varijante

Genetička varijanta	Region		Prajmeri	Proizvođač	Ref.
SNV u promotoru NOS3	7q36	Fw	5'-ATG CTG CCA CCA GGG CAT CA-3'	Metabion Int AG	176
		Rv	5'-GTC CTT GAC TCT GAC ATT AGG G-3'		
rs1799983	7q36	Fw	5`-CAT GAG GCT CAG CCC CAG AAC-3`	Metabion Int AG	195
		Rv	5`-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3`		
rs1447295	8q24	Fw	5`-ATTGAGGAAGTGCCATTGGG-3`	Eurofins MWG Operon	139
		Rv	5`-AAAAATGCTGGTGGGGGTAG-3`		
rs4242382	8q24	Fw	5`-CACAGAGAACCTAGGAACAC-3`	Eurofins MWG Operon	139
		Rv	5`-CAGGGAACATTTTGTCCCTC-3`		
rs7017300	8q24	Fw	5`-CAGGGCAGTTGCAGTGATTT-3`	Eurofins MWG Operon	139
		Rv	5`-GACCATGAACAATGAGATTTCG-3`		
rs7837688	8q24	Fw	5`-TTCACAGCCTCCCTCATTAC-3`	Eurofins MWG Operon	139
		Rv	5`-TGACGTGTCAACATAGACCC-3`		
rs6983267	8q24	Fw	5`-CTCCCTCCCCACATAAAAT-3`	Eurofins MWG Operon	139
		Rv	5`-TCATCGTCCTTTGAGCTCAG-3`		
rs7501939	17q12	Fw	5'-GGGAAAACCTCGTTTCAGGTGAA-3'	Eurofins MWG Operon	139
		Rv	5'-GACATATTTAAAGGCGCCATTTAG-3'		
rs3760511	17q12	Fw	5'-GCACTATTGGAGTTTCACCTGCTT-3'	Eurofins MWG Operon	139
		Rv	5'-AGCAAAGAAGCCCCTTCCCCTGTT-3'		

Specifičnost PCR amplifikacije proveravana je elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Prisustvo jedne diskretne trake očekivane dužine ukazivao je na specifičnu amplifikaciju željenog fragmenta molekula DNK (193).

Tabela 3. Temperaturni profili PCR reakcija i dužine sintetisanih DNK fragmenata

Genetička varijanta	Temperaturni profil PCR reakcije			Dužina fragmenta
	1x	30x	1x	
<b>SNV u promotoru NOS3</b>	97°C/3 min	95°C/60s 51°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	236 bp
<b>rs1799983</b>	97°C/3 min	95°C/60s 54°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	206 bp
<b>rs1447295, rs7017300, rs7837688 i rs7501939</b>	97°C/3 min	95°C/60s 52°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	95 bp 81 bp 77 bp 113 bp
<b>rs4242382 i rs6983267</b>	97°C/3 min	95°C/60s 55°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	92 bp 98 bp
<b>rs3760511</b>	97°C/3 min	95°C/60s 56°C/60s 72°C/60s	72°C/10 min 20°C/20 min	125 bp

Vizuelizacija PCR produkata vršena je po sledećem protokolu:

1. 2% rastvor agaroze zagrevan je do ključanja u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris – borat, 1 mM EDTA, pH 8);
2. Dodavan je EtBr u finalnoj koncentraciji 0,5 µg/ml;
3. Ohlađen rastvor nalivan je u kadicu oblepljenu lepljivom trakom i ostavljan je da polimerizuje 30 – 45 minuta na sobnoj temperaturi;
4. PCR uzorci (5 µl) mešani su sa puferom za nalivanje uzoraka (0,25% bromfenol plavo (w/v), 30% glicerol) u odnosu 5:1 i nalivani na gel;
5. Za proveru očekivane veličine PCR produkata korišćeni su markeri *pUC19 DNA/MspI Marker* ili *50 bp DNA ladder (Fermentas, Vilnius, Litvanija)* (1 µl), a pri nanošenju na gel tretirani su jednako kao i uzorci DNK.
6. Elektroforeza je vršena u 0,5xTBE puferu, pri konstantnom naponu od 100 V u sistemu za elektroforezu (*Mini-sub Cell GT* ili *Wide Mini-sub Cell GT, BioRad, Hercules, CA, SAD*);
7. Po završetku elektroforeze, gel je izlagan UV svetlu ( $\lambda = 254$  nm) na transiluminatoru (*Mini-transilluminator, BioRad, Hercules, CA, SAD*).

### 2.2.3.2. Analiza genetičkih varijanti metodom RFLP

Enzimi restrikcione endonukleaze tipa II katalizuju hidrolizu fosfodiesterarskih veza unutar molekula DNK. Za svaki od njih karakteristično je da specifično prepoznaje određeni niz nukleotida, dugačak od 4 do 8 bp, i na tom mestu presecaju molekul DNK (196). Ukoliko restirkciono mesto obuhvata SNV od interesa samo jedna varijanta biće prepoznata od strane restikcionog enzima. Tako se varijante u sekvenci DNK prevode u RFLP koji se mogu razlikovati na agaroznom gelu (197).

Osnovne karakteristike enzima korišćenih u analizi SNV nalaze se u tabeli 4, dok se sastav smeša za restrikcionu digestiju nalaze u Dodatku 2.

Tabela 4. Karakteristike restrikcionih enzima korišćenih za digestiju PCR produkata

Enzim	Genetička varijanta	Sekvenca koju enzim prepoznaje <sup>a</sup>	Temp (°C)	Dužina RFLP	Proizvođač
<b>MboI</b>	rs1799983 (G/T)	5`-GATC-3` 3`-CTAG-5`	37	119 i 87 bp	Fermentas
<b>HpyCH4IV</b>	rs1447295 (C/A)	5`-ACGT-3` 3`-TGCA-5`	37	62 i 33 bp	New England Biolabs
<b>Cac8I</b>	rs4242382 (G/A)	5`-GCAGGC-3` 3`-CGGACG-5`	37	56 i 36 bp	New England Biolabs
<b>BseYI</b>	rs7017300 (A/C)	5`-CCCAGC-3` 3`-GGGTCG-5`	37	54 i 27 bp	New England Biolabs
<b>TatI</b>	rs7837688 (G/T)	5`-TGTACA-3` 3`-ACATGT-5`	65	49 i 28 bp	Fermentas
<b>Tsp45I</b>	rs6983267 (G/T)	5`-GTCAC-3` 3`-CAGTG-5`	65	69 i 29 bp	New England Biolabs
<b>TaaI</b>	rs7501939 (C/T)	5`-ACNGT-3` 3`-TGNCA-5`	37	60 i 53 bp	Fermentas
<b>HpyCH4V</b>	rs3760511 (T/G)	5`-TGCA-3` 3`-ACGT-5`	37	76 i 49 bp	New England Biolabs

<sup>a</sup> alelske varijante koje kreiraju mesto restrikcije prikazane su podebljanim slovima

Enzimski digestija PCR produkata proveravana je elektroforezom u 3 % agaroznom gelu (po proceduri opisanoj u poglavlju 2.2.3.1.).



### 2.2.3.3. Analiza genetičkih varijanti metodom automatskog sekvenciranja

PCR produkti koji su dalje korišćeni u pripremi za automatsko sekvenciranje kapilarnom elektroforezom, prečišćeni su korišćenjem kita za prečišćavanje *Qia Quick PCR Purification Kit* (*Qiagen, GmbH*, Hilden, Nemačka).

Protokol za prečišćavanje PCR produkata:

1. U kolonicu za prečišćavanje dodavano je 50  $\mu$ l PCR produkata i 5x veća zapremina PBI pufera;
2. Ako je boja dobijenog rastvora bila narandžasta ili ljubičasta (što je pokazatelj  $\text{pH} > 7.5$ ), dodavano je 10  $\mu$ l 3M Na-acetata; zbog snižavanja pH (efikasnost prečišćavanja najveća je kada je  $\text{pH} \leq 7.5$ );
3. Sadržaj je centrifugiran 1 minut na 13 000 rpm (22-25 °C);
4. Posle pražnjenja kolektora, u kolonicu je dodavano 600  $\mu$ l PE pufera;
5. Sadržaj je centrifugiran 1 minut na 13 000 rpm;
6. DNK sa membrane kolonice je eluirana sa 50  $\mu$ l dejonizovane vode (*Nuclease-Free Water, Qiagen*, Hilden, Nemačka);
7. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, sadržaj je centrifugiran 1 minut na 13 000 rpm;
8. Kolonice su odbacivane, a mikrotube inkubirane 3 minuta na 72 °C;
9. Prečišćeni PCR produkti čuvani su na 4 °C.

Prečišćeni PCR produkti analizirani su u 2% agaroznom gelu (po proceduri opisanoj u poglavlju 2.2.3.1.).

Metoda sekvenciranja u ponovljenim ciklusima zasniva se na sposobnosti DNK polimeraze da ugradi 2',3'- didezoksiribonukleozidtrifosfate (ddNTP) u rastući novosintetisani lanac DNK vezivanjem za 3'-OH grupu poslednjeg nukleotida u lancu. Nakon ugradnje ddNTP-ova, elongacija rastućeg lanca DNK prekida se usled odsustva OH grupe na 3' kraju koja bi omogućila vezivanje sledećeg nukleotida. Svaki ddNTP obeležen je na C3' atomu različitom fluorescentnom bojom, tako da se tokom reakcije

sekvenciranja sintetišu četiri grupe fragmenata različite dužine koje se usled prisustva ddNTP-a na 3' kraju odlikuju različitim talasnim dužinama emisije fluorescentne svetlosti (199).

Priprema prečišćenih produkata za automatsko sekvenciranje vršena je korišćenjem kita Big Dye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD) i odgovarajućeg prajmera. Korišćeni reagensi dati su u tabeli 5, a reakcija sekvenciranja vršena je u mašini Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD). Temperaturni profil reakcije prikazan je u tabeli 6.

Tabela 5. Komponente za pripremu prečišćenih PCR produkata za automatsko sekvenciranje

Komponente	Zapremina (μl)
<b>BDT</b>	2
<b>PCR produkt</b>	1
<b>Odgovarajući prajmer</b>	0,8
<b>Dejonizovana voda</b>	1,2
<b>Ukupno</b>	5

Tabela 6. Temperaturni profil reakcije sekvenciranja

1x	30x	1x
	96°C/10s	
96°C/1 min	50°C/5s	4°C/∞
	60°C/4min	

Prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja sprovedeno je u cilju uklanjanja slobodnih fluorescentno obeleženih ddNTP-ova. Korišćena je metoda precipitacije DNK fragmenata pomoću etanola i EDTA. Prečišćeni produkti reakcije sekvenciranja rastvarani su u Hi-Di<sup>™</sup> formamidu, koji snižava tačku topljenja DNK molekula i na taj način olakšava njihovu denaturaciju (200).

Protokol za precipitaciju fragmenata DNK:

1. U smešu nakon reakcije sekvenciranja dodavano je 5μl 125mM EDTA,
2. Dodavano je 60 μl 95% etanola;

3. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 15 minuta;
4. Uzorci su centrifugirani na 6000 rpm 30 minuta na temperaturi od 4°C, a supernatant je odlivan;
5. Dodavano je 60 µl 70% etanola;
6. Uzorci su centrifugirani na 5 000 rpm 15 minuta na temperaturi od 4°C, a supernatant je odlivan;
7. Talog je sušen 2 minuta na temperaturi od 90°C;
8. Talogu je dodavano 15µl Hi-Di™ formamida (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD), nakon čega je kratko vorteksovan.

Sekvencirani fragmenati DNK razdvajani su kapilarnom gel elektroforezom u automatskom sekvenatoru. Upotreba ovog sistema omogućila je razdvajanje produkata reakcije sekvenciranja sa ugrađenim fluorescentno obeleženim ddNTP-om kapilarnom elektroforezom, kao i diskriminaciju ddNTP-ova u okviru DNK fragmenata pobuđivanjem fluorescencije boja pomoću lasera i detekcije talasne dužine emitovane svetlosti. Detektovani signali prevedeni su pomoću hemometrijskog algoritma u elektroforegrame i skladišteni u memoriji računara u digitalnoj formi.

Uzorci za kapilarnu elektroforezu pripremani su prema sledećem protokolu:

1. U bunariće na ploči sa 96 bunarića (*MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD) nalivano je po 10 µl prečišćenih produkata reakcije sekvenciranja rastvorenih u formamidu;
2. Uzorci su denaturisani inkubiranjem ploče na temperaturi od 95 °C 5 minuta;
3. Ploča je hladena stavljanjem na led nekoliko minuta;
4. Ploča je stavljena u automatski sekvenator i kreiran je dokument koji odgovara ploči pomoću softvera *GeneMapper* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD);
5. Kapilarna elektroforeza izvođena je u automatskom sekvenatoru ABI PRISM® 310 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD) u kapilari dužine 36 cm koja je ispunjena polimerom POP4 (eng. *Performance Optimized Polymer™-4*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, SAD). Uslovi za kapilarnu elektroforezu bili su: injektiranja uzorka u trajanju od 10s pri naponu od 1,2 kV i elektroforetsko

razdvajanje DNK fragmenata pri naponu od 15 kV i temperaturi od 55°C tokom 1700 sekundi.

Digitalni zapisi automatskog očitavanja sekvenci tokom kapilarne elektroforeze obrađivani su korišćenjem softvera *Sequencing Analysis v5.2* (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Ibis Biosciences, Abbott Park, IL, SAD). Dobijene sekvence DNK upoređivane su sa referentnim sekvencama upotrebom programa iz familije programa BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST) koji se koristi za poređenja nukleotidnih sekvenci.

#### **2.2.4. Statistička obrada rezultata**

Provera kvaliteta rezultata genotipizacije, kao i pravilne selekcije i genetičke strukture kontrolne grupe podrazumevala je analizu prisustva Hardy-Vainbergove ravnoteže u različitim grupama ispitanika. Analiza prisustva Hardy-Vajnbergove ravnoteže sprovedena je zasebno za grupu uzoraka poreklom od bolesnika sa KP, grupu uzoraka poreklom od bolesnika sa BHP i grupu uzoraka poreklom od osoba kod kojih nisu dijagnostikovana oboljenja prostate (kontrolna grupa) (201). Za navedene analize korišćen je egzaktni test u okviru softverskog paketa SNPStats (*Catalan Institute of Oncology*, Barcelona, Spain) (202,203).

Nakon provere potencijalnog odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže, testirana je genetička asocijacija varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa KP. Ova procedura podrazumevala je testiranje asocijacije posedovanja određenog alela ili genotipa ispitivane genetičke varijante i pripadnosti populaciji bolesnika sa KP, populaciji bolesnika sa BPH ili populaciji osoba kod kojih nisu dijagnostikovana oboljenja prostate. Sprovedena su tri nezavisna testiranja od kojih je svako podrazumevalo poređenje rezultata genotipizacije genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 uzoraka dveju različitih grupa. Statistički test primenjivan u tu svrhu je logistička regresija, a kao mera asocijacije određenog alela ili genotipa sa rizikom za razvoj KP korišćen je OR (eng. *Odds Ratio*, OR). Ova veličina pokazuje koliko je veća verovatnoća pojave KP kod osoba koji poseduju određeni alel ili genotip

u odnosu na osobe koje ovaj alel ne poseduju ili imaju neki drugi genotip iste genetičke varijante (204). U analizi asocijacije alela i genotipova genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa standardnim prognostičkim parametrima i rizikom za progresiju KP korišćen je Fišerov egzaktni test. U slučajevima kada je u navedenim analizama dobijena statistička značajnost, logističkom regresijom vršena su tri nezavisna poređenja koja su uključivala po dve grupe bolesnika formiranih na osnovu vrednosti ispitivanog parametra. Za statističku obradu rezultata genotipizacije korišćeni su programi SNPStats (*Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain*) (202,203) i SPSS 17.0 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*).

Prilikom procene asocijacije analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP testirani su različiti genetički modeli: dominantni, recesivni, overdominantni, kodominantni ili log-aditivni model. U slučaju analiza asocijacije navedenih varijanti sa standardnim prognostičkim parametrima i rizikom za progresiju KP, testirani su kodominantni, dominantni i recesivni genetički model. Procena najadekvatnijeg genetičkog modela za ustanovljene asocijacije vršena je na osnovu Akaike informacionog kriterijuma (eng. *Akaike information criterion, AIC*) (203).

### 3. Rezultati

#### 3.1. Rezultati selekcije bolesnika sa KP na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara KP

Studija je uključivala grupu od 150 bolesnika kojima je, prema standardnom kliničkom protokolu, dijagnostikovan KP i 150 bolesnika sa kliničkom dijagnozom BPH. Prosečna starosna dob u grupi bolesnika sa KP bila je 69 godina i 10 meseci, a u grupi bolesnika sa BPH 68 godina i 8 meseci. Na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara bolesnici sa KP, prema preporukama EAU, svrstavani su u tri grupe prema serumskim vrednostima PSA, GGS i kliničkom T stadijumu (tabela 7). Podela bolesnika sa KP prema riziku za progresiju bolesti izvršena je prema kriterijumima D'Amico i saradnika (192), kao i Medeirosa i saradnika (182) (tabela 8). U analiziranoj grupi bolesnika sa KP, kod njih 55 (36.67%) detektovane su metastaze.

Tabela 7. Selekcija bolesnika KP prema standardnim prognostičkim parametrima KP

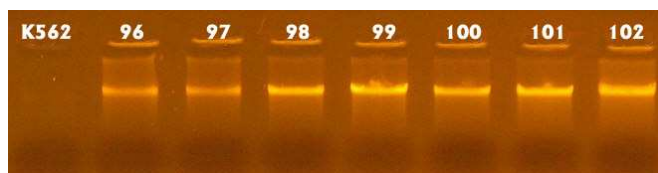
<b>Parametar</b>		<b>Bolesnici sa KP</b>
Serumski PSA	≤ 10 ng/ml	49
	10 – 20 ng/ml	39
	≥ 20 ng/ml	62
T stadijum	T1	28
	T2	72
	T3 i T4	50
GGS	GGS < 7	71
	GGS = 7	56
	GGS > 7	22

Tabela 8. Selekcija bolesnika sa KP prema riziku za progresiju bolesti

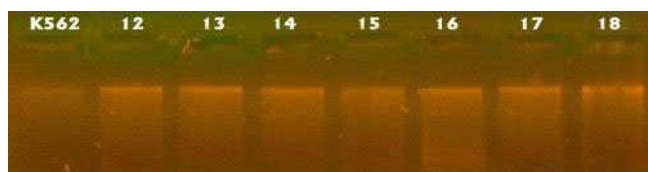
<b>Rizik za progresiju</b>		<b>Bolesnici sa KP</b>
Rizik za progresiju (D'Amico et al.)	Visok	14
	Srednji	55
	Nizak	81
Rizik za progresiju (Medeiros et al.)	Visok	95
	Nizak	55
Metastaze	Odsutne	95
	Prisutne	55

### 3.2. Provera količine i kvaliteta izolovane genomske DNK elektroforezom u agaroznom gelu

Količina i kvalitet izolovane genomske DNK proveravani su elektroforezom na 0,8% agaroznom gelu. Prisustvo diskretnih traka na gelu ukazivalo je na nativnu, a difuzni razmaz na parcijalno degradovanu genomsku DNK. Poređenjem intenziteta fluorescencije traka koje odgovaraju uzorcima i različitim količinama standarda za količinu DNK ustanovljeno je da je koncentracija izolovane DNK bila veća od 1 ng/ $\mu$ l (slike 7 i 8).



Slika 7. Provera količine i kvaliteta genomske DNK, izolovane iz pune periferne krvi bolesnika, elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu bojenom EtBr (0,5 $\mu$ g/ml). (K562 – DNK standard količine 5 ng, brojevima 96 do 103 obeleženi su uzorci izolovane genomske DNK bolesnika sa KP i BPH).

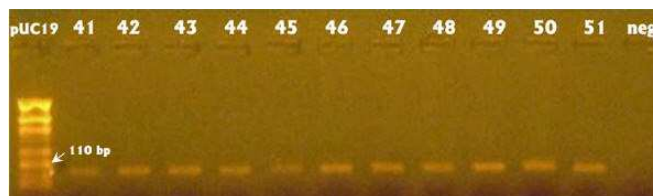


Slika 8. Provera količine i kvaliteta genomske DNK izolovane iz briseva bukalne sluznice, elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu bojenom EtBr (0,5 $\mu$ g/ml). (K562 – DNK standard količine 5 ng, brojevima 12 do 18 obeleženi su uzorci izolovane genomske DNK kontrola).

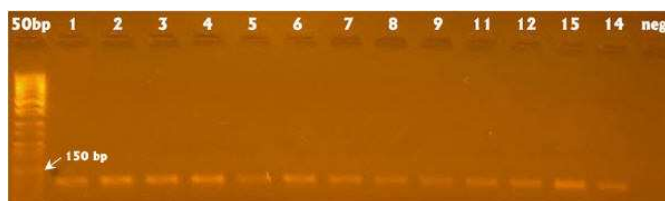
### 3.3. Provera specifičnosti PCR amplifikacije fragmenata molekula DNK koji okružuju analizirane genetičke varijante elektroforezom u agaroznom gelu

Specifičnost PCR amplifikacije fragmenata molekula DNK koji okružuju ispitivane genetičke varijante: rs1447295 (slika 9), rs4242382 (slika 10), rs6983267 (slika 11), rs7017300 (slika 12), rs7837688 (slika 13), rs7501939 (slika 14), rs3760511 (slika 15), rs1799983 (slika 16) i genetičkih varijanti u promotorskom regionu gena *NOS3* (rs2070744, *NOS3* -764A>G, *NOS3* -714G>T, rs3918226 i *NOS3* -649G>A)

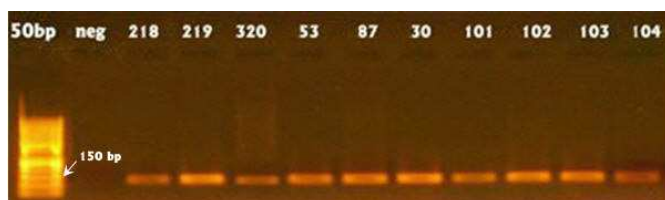
(slika 17) proveravana je elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Prisustvo jedne diskretne trake očekivane dužine ukazivalo je na specifičnu amplifikaciju željenog fragmenta molekula DNK.



Slika 9. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs1447295 elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom pUC19 označen je standard za dužinu fragmenata DNK *pUC19 DNA/MspI Marker*, brojevima 17 do 27 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 95 bp.

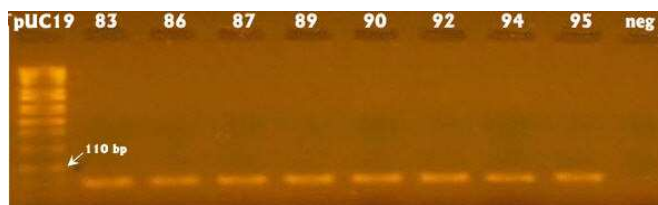


Slika 10. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs4242382 elektroforezom elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (50bp - standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler 50bp*; brojevima 1 do 14 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 92 bp.

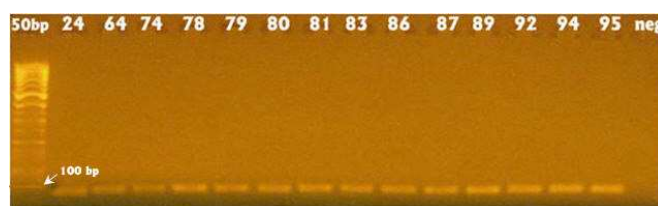


Slika 11. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs6983267 elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler 50 bp*; brojevima 218, 219 i 320 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, brojevima 53, 87, 30 i 101- 104 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK kontrola, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 98 bp.

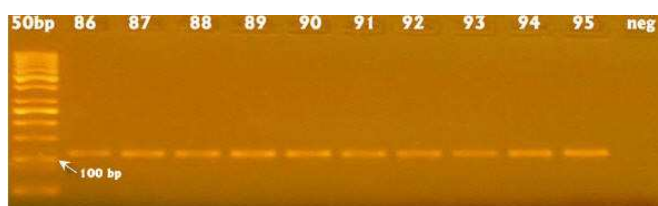




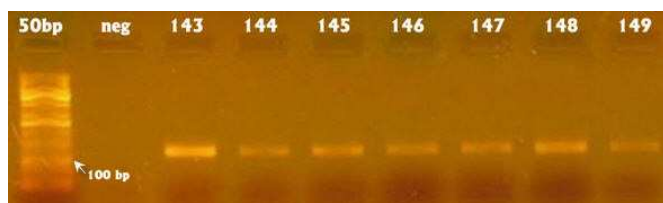
Slika 12. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs7017300 elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp, brojevima 83 do 95 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 81 bp.



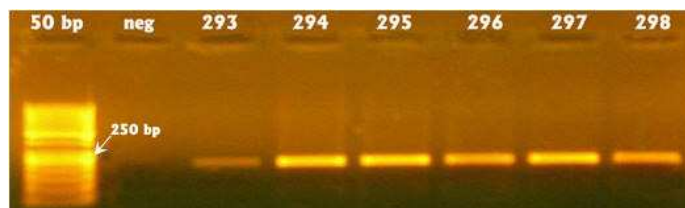
Slika 13. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs7837688 elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp, brojevima 24 do 95 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 77 bp.



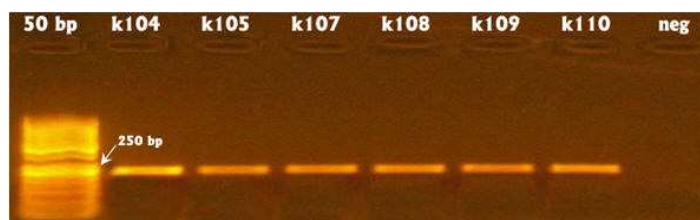
Slika 14. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs7501939 elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp, brojevima 86 do 95 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 113 bp.



Slika 15. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs3760511 elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp, brojevima 143 do 149 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 125 bp.



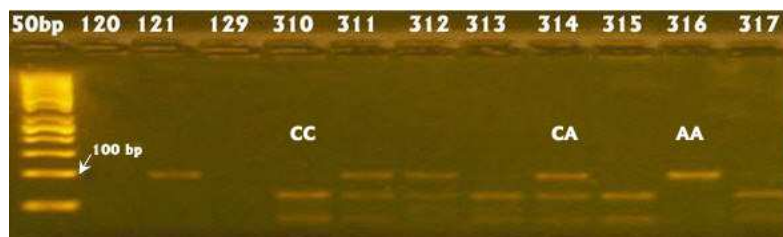
Slika 16. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji okružuje genetičku varijantu rs1799983 elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp, brojevima 293 do 298 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK bolesnika sa KP i BPH, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 206 bp.



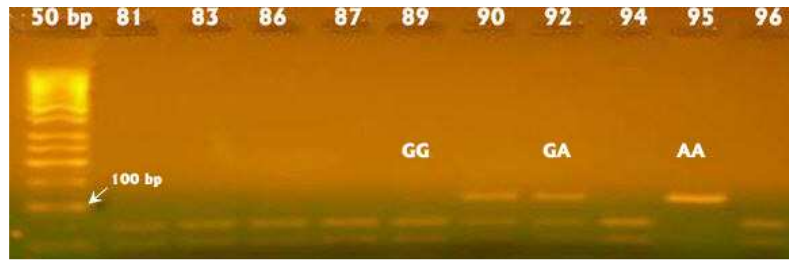
Slika 17. Provera uspešnosti PCR amplifikacije fragmenta koji čini deo promotorskog regiona gena *NOS3* elektroforezom u 2% agaroznom gelu bojenom EtBr (0.5µg/ml). (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp, brojevima 104 do 110 obeleženi su uzorci amplifikovanih fragmenata DNK kontrola, neg – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata molekula DNK iznosila je 236 bp.

### 3.4. Rezultati analiza genetičkih varijanti metodom RFLP

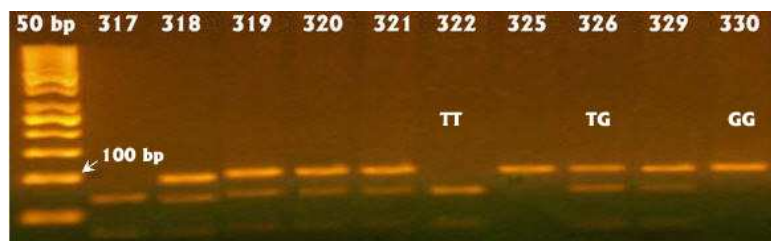
Genotipizacija genetičkih varijanti rs1447295 (slika 18), rs4242382 (slika 19), rs6983267 (slika 20), rs7017300 (slika 21), rs7837688 (slika 22), rs7501939 (slika 23), rs3760511 (slika 24) i rs1799983 (slika 25) vršena je RFLP metodom. Rezultati metode RFLP analizirani su u 3% agaroznom gelu.



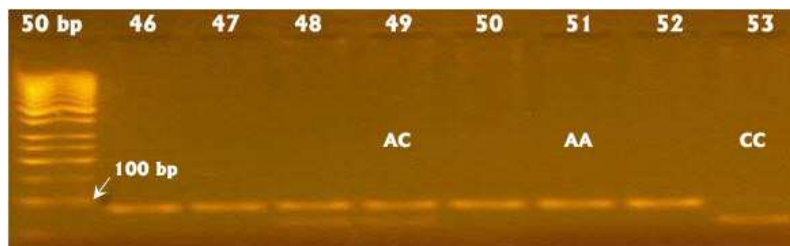
Slika 18. Fragmenti dobijeni restrikcijom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs1447295 (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp, 120-317 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigoti CC detektovani su prisustvom dve trake veličine 62 bp i 33 bp (uzorci 310, 313, 315 i 317); heterozigoti CA detektovani su prisustvom tri trake veličine 95 bp, 62 bp i 33 bp (uzorci 311, 312 i 314); homozigoti AA detektovani su prisustvom trake veličine 95 bp (uzorci 121 i 316).



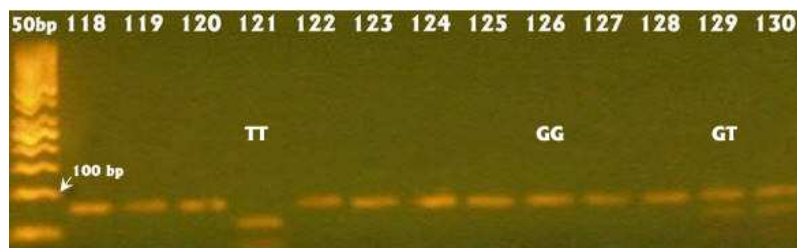
Slika 19. Fragmenti dobijeni restrikcijom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs4242382 (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50 bp; 81-96 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigot AA detektovan je prisustvom trake veličine 92 bp (uzorak 95); heterozigoti GA detektovani su prisustvom tri trake veličine 92 bp, 56 bp i 36 bp (uzorci 90 i 92); homozigoti GG detektovani su prisustvom dve trake veličine 56 bp i 36 bp (uzorci 81, 83, 86, 87, 89, 94 i 96).



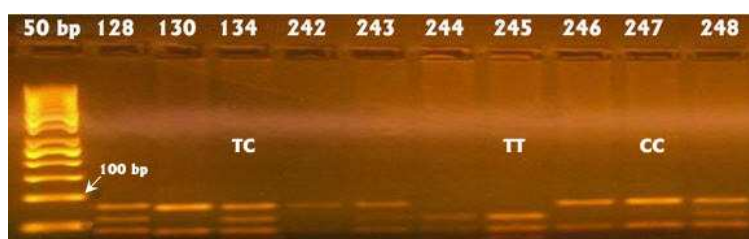
Slika 20. Fragmenti molekuli DNK dobijeni restrikcijom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs6983267 (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50 bp, 317-330 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigoti TT detektovani su prisustvom dve trake veličine 69 bp i 29 bp (uzorci 317 i 322); heterozigoti TG detektovani su prisustvom tri trake veličine 98 bp, 69 bp i 29 bp (uzorci 318, 319, 320, 321, 326, 329); homozigoti GG detektovani su prisustvom trake veličine 98 bp (uzorci 325 i 330).



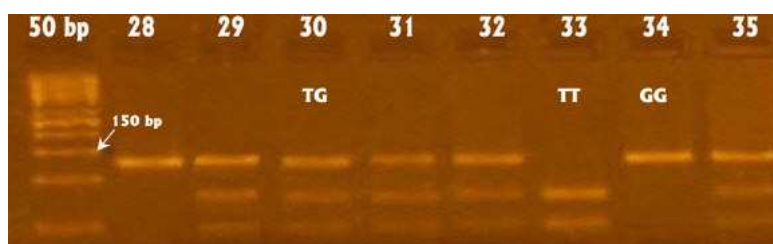
Slika 21. Fragmenti dobijeni restrikcijom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs7017300 (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50 bp, 46-53 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigoti AA detektovani su prisustvom trake veličine 81 bp (uzorci 46, 47, 50, 51, 52); heterozigoti AC detektovani su prisustvom tri trake veličine 81 bp, 54 bp i 27 bp (uzorci 48 i 49); homozigot CC detektovan je prisustvom dve trake veličine 54 bp i 27 bp (uzorak 53).



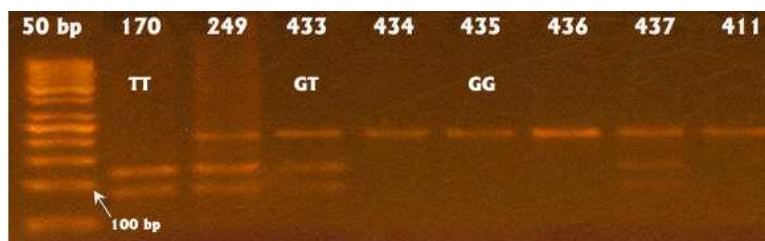
Slika 22. Fragmenti dobijeni restrikcionom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs7837688 (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50 bp, 118-130 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigoti GG detektovani su prisustvom trake veličine 77 bp (uzorci 118, 119, 120, 122, 123, 124, 125, 126, 127 i 128); heterozigoti GT detektovani su prisustvom tri trake veličine 77 bp, 49 bp i 28 bp (uzorci 129 i 130); homozigot TT detektovan je prisustvom dve trake veličine 49 bp i 28 bp (uzorak 121).



Slika 23. Fragmenti dobijeni restrikcionom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs7501939 (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50 bp, 128-248 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigoti CC detektovani su prisustvom trake veličine 77 bp (uzorci 130, 242, 246 i 247); heterozigoti TC detektovani su prisustvom tri trake veličine 77 bp, 53 bp i 24 bp (uzorci 134, 243 i 248); homozigoti TT detektovani su prisustvom dve trake veličine 53 bp i 24 bp (uzorci 244 i 245). Traka veličine 36 bp dobijena je restrikcionom digestijom svih analiziranih uzoraka umnoženih fragmenata DNK usled prisustva drugog retriencionog mesta koje ne uključuje genetičku varijantu rs7501939.



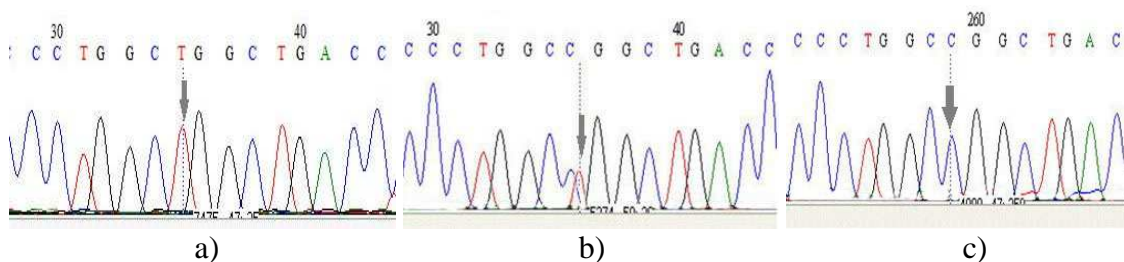
Slika 24. Fragmenti dobijeni restrikcionom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs3760511 (oznakom 50bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50 bp, 28-35 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigoti GG detektovani su prisustvom trake veličine 125 bp (uzorci 28 i 34); heterozigoti TG detektovani su prisustvom tri trake veličine 125 bp, 76 bp i 49 bp (uzorci 29-32 i 35); homozigot TT detektovan je prisustvom dve trake veličine 76 bp i 49 bp (uzorak 33).



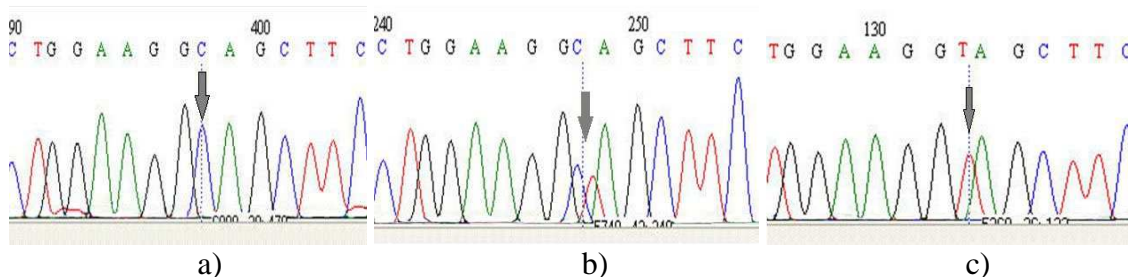
Slika 25. Fragmenti dobijeni restrikcijom digestijom segmenta DNK koji obuhvata genetičku varijantu rs1799983 (oznakom 50 bp označen je standard za dužinu fragmenata DNK GeneRuler 50 bp, 170-411 – oznake uzoraka). RFLP metodom: homozigoti GG detektovani su prisustvom trake veličine 206 bp (uzorci 411, 434, 435 i 436); heterozigoti GT detektovani su prisustvom tri trake veličine 206 bp, 119 bp i 87 bp (uzorci 249, 433 i 437); homozigot TT detektovan je prisustvom dve trake veličine 119 bp i 87 bp (uzorak 170).

### 3.5. Rezultati analiza genetičkih varijanti metodom automatskog sekvenciranja

Genotipizacija genetičkih varijanti u okviru promotorskog regiona gena *NOS3* vršena je automatskim sekvenciranjem (slike 26-30).

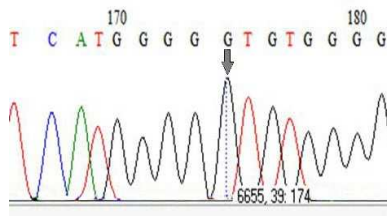


Slika 26. Elektroforegrami sekvence molekula DNK koja okružuje genetičku varijantu rs2070744: a) strelicom obeležen homozigot TT za ispitivanu genetičku varijantu, b) strelicom obeležen heterozigot TC za ispitivanu genetičku varijantu, c) strelicom obeležen homozigot CC za ispitivanu genetičku varijantu.

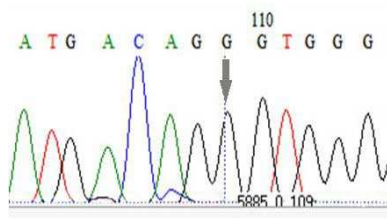


Slika 27. Elektroforegrami sekvence molekula DNK koja okružuje genetičku varijantu rs3918226: a) strelicom obeležen homozigot CC za ispitivanu genetičku varijantu, b) strelicom obeležen heterozigot CT za ispitivanu genetičku varijantu, c) strelicom obeležen homozigot TT za ispitivanu genetičku varijantu.

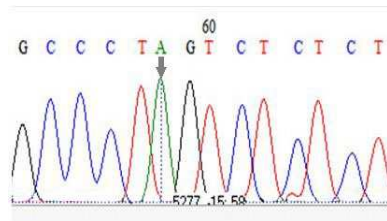
Genetičke varijante *NOS3* -649G>A (slika 28), *NOS3* -714G>T (slika 29) i *NOS3* -764A>G (slika 30) bile su monomorfne kod svih analiziranih uzoraka bolesnika i kontrola.



Slika 28. Elektroforegram sekvenca molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu *NOS3* -649G>A (strelicom obeležen homozigot GG za ispitivanu genetičku varijantu).

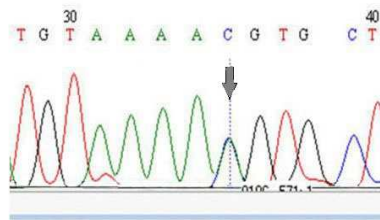


Slika 29. Elektroforegram sekvenca molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu *NOS3* -714G>T (strelicom obeležen homozigot GG za ispitivanu genetičku varijantu).

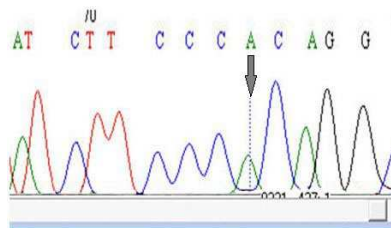


Slika 30. Elektroforegram sekvenca molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu *NOS3* -764A>G (strelicom obeležen homozigot AA za ispitivanu genetičku varijantu).

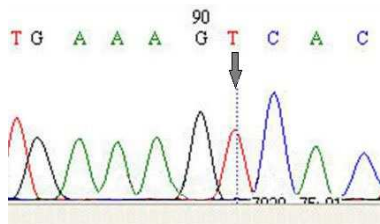
Istovremeno, automatskim sekvenciranjem vršena je provera rezultata genotipizacije genetičkih varijanti rs1447295 (slika 29), rs4242382 (slika 30), rs6983267 (slika 31), rs7017300 (slika 32), rs7837688 (slika 33), rs7501939 (slika 34), rs3760511 (slika 35) i rs1799983 (slika 36) korišćenjem metode RFLP. Za svaku, metodom RFLP analiziranu genetičku varijantu, nasumično je izabrano po 10 uzoraka bolesnika i kontrola.



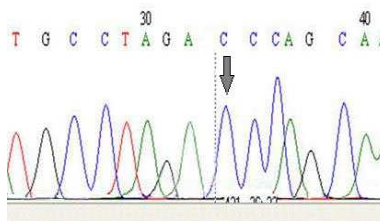
Slika 31. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs1447295 (strelicom obeležen heterozigot CA za ispitivanu genetičku varijantu).



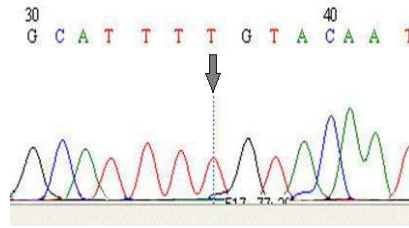
Slika 32. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs4242382 (strelicom obeležen homozigot AA za ispitivanu genetičku varijantu).



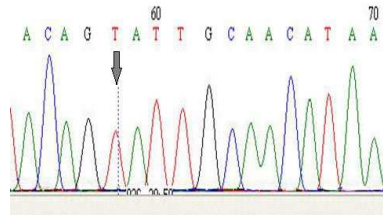
Slika 33. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs6983267 (strelicom obeležen homozigot TT za ispitivanu genetičku varijantu).



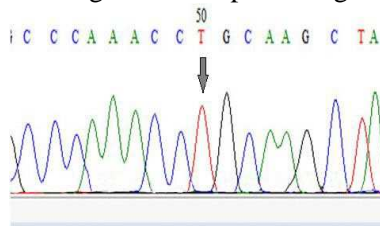
Slika 34. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs7017300 (strelicom obeležen homozigot CC za ispitivanu genetičku varijantu).



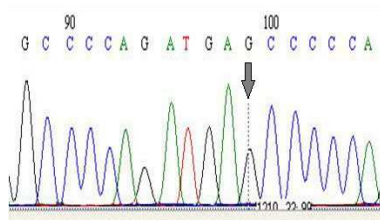
Slika 35. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs7837688 (strelicom obeležen homozigot TT za ispitivanu genetičku varijantu).



Slika 36. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs7501939 (strelicom obeležen homozigot TT za ispitivanu genetičku varijantu).



Slika 37. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs3760511 (strelicom obeležen homozigot TT za ispitivanu genetičku varijantu).



Slika 38. Elektroforegram sekvence molekula DNK koji okružuje genetičku varijantu rs1799983 (strelicom obeležen homozigot GG za ispitivanu genetičku varijantu).

### 3.6. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP

Na osnovu rezultata GWAS, koje su se odnosile na evropske populacije, izabrano je 13 genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 za koje je izvršena analiza



asocijacije alela i genotipova sa rizikom za razvoj KP u grupi bolesnika sa teritorije Republike Srbije.

### 3.6.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 8q24 sa rizikom za razvoj KP

#### 3.6.1.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1447295 sa rizikom za razvoj KP

Ispitivanje postojanja Hardi-Vajnbergove ravnoteže rađeno je odvojeno za sve tri grupe uzoraka (KP, BPH, kontrole). Uočeno je odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže za grupu bolesnika sa BPH kao i za kontrolnu grupu.

U tabeli 9 prikazane su učestalosti genotipova genetičke varijante rs1447295 kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe, kao i rezultati testa asocijacije ove genetičke varijante sa rizikom za razvoj KP.

Tabela 9. Asocijacija genetičke varijante rs1447295 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
CC	86 (57.3)	11 (11)	1		
CA	61 (40.7)	82 (82)	0.10 (0.05-0.19)	<0.0001	282
AA	3 (2.0)	7 (7)	0.05 (0.01-0.24)		
<b>Dominantni</b>					
CC	86 (57.3)	11 (11.0)	1		
CA + AA	64 (42.7)	89 (89.0)	0.09 (0.05-0.19)	<0.0001	280.6
<b>Recesivni</b>					
CC + CA	147 (98)	93 (93)	1		
AA	3 (2)	7 (7)	0.27 (0.07-1.07)	0.05	336.7
<b>Overdominantni</b>					
CC + AA	89 (59.3)	18 (18)	1		
CA	61 (40.7)	82 (82)	0.15 (0.08-0.28)	<0.0001	296.1
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	0.13 (0.07-0.24)	<0.0001	284

Prema AIC skoru, genetički model koji najbolje opisuje uočene razlike je dominantni model ( $P < 0.0001$ ). Ukoliko se podrazumeva ovaj model nasleđivanja,

nosioci alela A imaju oko 10 puta manji rizik za razvoj KP u odnosu na osobe sa genotipom CC.

Poređenjem učestalosti genotipova kod bolesnika sa KP i BPH, nije ustanovljena asocijacija genetičke varijante rs1447295 sa rizikom za razvoj KP (tabela 10).

Učestalosti genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrola, kao i rezultati testa asocijacije genetičke varijante rs1447295 sa rizikom za razvoj BPH prikazani su u Tabeli 11. Poređenjem raspodela genotipova genetičke varijante rs1447295 u grupi bolesnika sa BPH i kontrolne grupe, pokazana je asocijacija manje učestalog alela A sa smanjenim rizikom za razvoj BPH, kada je podrazumevan log-aditivni genetički model koji, prema AIC skor, najbolje opisuje uočene razlike u učestalostima genotipova između analiziranih grupa ( $P < 0.0001$ , OR=0.08, 95% CI 0.04-0.16).

Tabela 10. Asocijacija rs1447295 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
Kodominantni					
CC	86 (57.3)	96 (64.0)	1	0.34	419.7
CA	61 (40.7)	53 (35.3)	1.28 (0.80-2.05)		
AA	3 (2.0)	1 (0.7)	3.35 (0.34-32.8)		
Dominantni					
CC	86 (57.3)	96 (64.0)	1	0.24	418.5
CA + AA	64 (42.7)	54 (36.0)	1.32 (0.83-2.11)		
Recesivni					
CC + CA	147 (98)	149 (99.3)	1	0.3	418.8
AA	3 (2)	1 (0.7)	3.04 (0.31-29.57)		
Overdominantni					
CC + AA	89 (59.3)	97 (64.7)	1	0.34	419
CA	61 (40.7)	53 (35.3)	1.25 (0.79-2.00)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.35 (0.87-2.10)	0.18	418.1

Tabela 11. Asocijacija genetičke varijante rs1447295 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
CC	96 (64.0)	11 (11)	1		
CA	53 (35.3)	82 (82)	0.07 (0.04-0.15)	<0.0001	263.8
AA	1 (0.7)	7 (7)	0.02 (0.00-0.15)		
<b>Dominantni</b>					
CC	96 (64.0)	11 (11.0)	1		
CA + AA	54 (36.0)	89 (89.0)	0.07 (0.03-0.14)	<0.0001	264.5
<b>Recesivni</b>					
CC + CA	149 (99.3)	93 (93)	1	0.0045	332.4
AA	1 (0.7)	7 (7)	0.09 (0.01-0.74)		
<b>Overdominantni</b>					
CC + AA	97 (64.7)	18 (18)	1		
CA	53 (35.3)	82 (82)	0.12 (0.07-0.22)	<0.0001	284.7
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	0.08 (0.04-0.16)	<0.0001	262.5

### 3.6.1.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za razvoj KP

Ispitivanje postojanja Hardy-Vajnbergove ravnoteže među genotipovima rađeno je odvojeno za sve tri kategorije uzoraka (KP, BPH, kontrole). Dobijene raspodele genotipova su u skladu sa Hardy-Vajnbergovim principom.

Poređenje učestalosti genotipova genetičke varijante rs4242382 bolesnika sa KP i kontrolne grupe nije pokazalo statistički značajnu asocijaciju ove genetičke varijante sa rizikom za razvoj KP ni za jedan od testiranih modela (tabela 12). Genetički model koji najbolje opisuje uočene razlike u učestalostima genotipova između analiziranih grupa je log-aditivni model, za koji je pokazan statistički trend ( $0.05 < P < 0.1$ ) značajnosti pomenute asocijacije ( $P = 0.068$ , OR = 1.70, 95%CI 0.95-3.05).

Tabela 12. Asocijacija genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
GG	106 (70.7)	80 (80)	1	0.11	338.2
GA	42 (28.0)	20 (20)	1.58 (0.86-2.91)		
AA	2 (1.3)	0 (0.0)	NA (0.00-NA)		
<b>Dominantni</b>					
GG	106 (70.7)	80 (80.0)	1	0.094	337.7
GA + AA	44 (29.3)	20 (20.0)	1.66 (0.91-3.03)		
<b>Recesivni</b>					
GG + GA	148 (98.7)	100 (100)	1	0.15	338.5
AA	2 (1.3)	0 (0)	NA (0.00-NA)		
<b>Overdominantni</b>					
GG + AA	108 (72)	80 (80)	1	0.15	338.4
GA	42 (28)	20 (20)	1.56 (0.85-2.85)		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	1.70 (0.95-3.05)	0.068	337.2

Kada su upoređene raspodele genotipova kod bolesnika sa KP i BPH pokazana je statistički značajna asocijacija genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za razvoj KP. Ukoliko se podrazumeva da je dominantni genetički model, koji najbolje opisuje uočene razlike, u osnovi asocijacije, nosioci A alela imaju 1.98 puta veći rizik za razvoj KP ( $P = 0.014$ ; 95%CI 1.14-3.43) u odnosu na osobe sa genotipom GG (tabela 13).

Tabela 13. Asocijacija genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
GG	106 (70.7)	124 (82.7)	1	0.047	415.8
GA	42 (28.0)	25 (16.7)	1.97 (1.12-3.44)		
AA	2 (1.3)	1 (0.7)	2.34 (0.21-26.17)		
<b>Dominantni</b>					
GG	106 (70.7)	124 (82.7)	1	0.014	413.8
GA + AA	44 (29.3)	26 (17.3)	1.98 (1.14-3.43)		
<b>Recesivni</b>					
GG + GA	148 (98.7)	149 (99.3)	1	0.56	419.5
AA	2 (1.3)	1 (0.7)	2.01 (0.18-22.45)		
<b>Overdominantni</b>					
GG + AA	108 (72)	125 (83.3)	1	0.018	414.3
GA	42 (28)	25 (16.7)	1.94 (1.11-3.40)		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	1.89 (1.12-3.19)	0.014	413.9

Ustanovljeni rezultati ukazuju na odsustvo asocijacije genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za razvoj BPH ( $P = 0.31$ , za recesivni model) (tabela 14).

Tabela 14. Asocijacija genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
Kodominantni					
GG	124 (82.7)	80 (80)	1	0.49	341.1
GA	25 (16.7)	20 (20)	0.81 (0.42-1.55)		
AA	1 (0.7)	0 (0.0)	NA (0.00-NA)		
Dominantni					
GG	124 (82.7)	80 (80.0)	1	0.6	340.2
GA + AA	26 (17.3)	20 (20.0)	0.84 (0.44-1.60)		
Recesivni					
GG + GA	149 (99.3)	100 (100)	1	0.31	339.5
AA	1 (0.7)	0 (0)	NA (0.00-NA)		
Overdominantni					
GG + AA	125 (83.3)	80 (80)	1	0.5	340.1
GA	25 (16.7)	20 (20)	0.80 (0.42-1.53)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.88 (0.47-1.65)	0.7	340.4

### 3.6.1.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za razvoj KP

Raspodela genotipova u okviru sve tri analizirane grupe ispitanika je u skladu sa Hardi Vajnbergovom ravnotežom.

Prema recesivnom modelu, koji najbolje opisuje uočene razlike u distribucijama genotipova između bolesnika sa KP i kontrolne grupe i način nasleđivanja predispozicije za razvoj KP asociirane sa genetičkom varijantom rs6983267, OR iznosi 0.36 za muškarce sa genotipom TT, u odnosu na one sa genotipovima GG i GT ( $P = 0.0029$ , 95%CI 0.19-0.71). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da nosioci genotipa TT imaju tri puta niži rizik za razvoj KP (tabela 15).

Tabela 15. Asocijacija genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
GG	53 (35.3)	25 (25.0)	1	0.0081	332.9
GT	80 (53.3)	49 (49.0)	0.77 (0.43-1.39)		
TT	17 (11.3)	26 (26.0)	0.31 (0.14-0.67)		
<b>Dominantni</b>					
GG	53 (35.3)	25 (25.0)	1	0.082	337.5
GT + TT	97 (64.7)	75 (75)	0.61 (0.35-1.07)		
<b>Recesivni</b>					
GG + GT	133 (88.7)	74 (74.0)	1	0.0029	331.6
TT	17 (11.3)	26 (26.0)	0.36 (0.19-0.71)		
<b>Overdominantni</b>					
GG + TT	70 (46.7)	51 (51)	1	0.5	340.1
GT	80 (53.3)	49 (49)	1.19 (0.72-1.97)		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	0.58 (0.39-0.85)	0.0043	332.4

Poređenjem učestalosti genotipova kod bolesnika sa KP i BPH nije potvrđena asocijacija genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za razvoj KP (tabela 16).

Tabela 16. Asocijacija genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
GG	53 (35.3)	44 (29.3)	1	0.25	419.2
GT	80 (53.3)	80 (53.3)	0.83 (0.50-1.38)		
TT	17 (11.3)	26 (17.3)	0.54 (0.26-1.13)		
<b>Dominantni</b>					
GG	53 (35.3)	44 (29.3)	1	0.27	418.7
GT + TT	97 (64.7)	106 (70.7)	0.76 (0.47-1.23)		
<b>Recesivni</b>					
GG + GT	133 (88.7)	124 (82.7)	1	0.14	417.7
TT	17 (11.3)	26 (17.3)	0.61 (0.32-1.18)		
<b>Overdominantni</b>					
GG + TT	70 (46.7)	70 (46.7)	1	1	419.9
GT	80 (53.3)	80 (53.3)	1.00 (0.64-1.57)		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	0.76 (0.54-1.07)	0.11	417.4

Poređenje raspodela genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe nije pokazalo prisustvo asocijacije genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za razvoj BPH (tabela 17).

Tabela 17. Asocijacija genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
Kodominantni					
GG	44 (29.3)	25 (25.0)	1	0.25	339.8
GT	80 (53.3)	49 (49.0)	0.93 (0.51-1.70)		
TT	26 (17.3)	26 (26.0)	0.57 (0.27-1.18)		
Dominantni					
GG	44 (29.3)	25 (25.0)	1	0.45	339.9
GT + TT	106 (70.7)	75 (75)	0.80 (0.45-1.42)		
Recesivni					
GG + GT	124 (82.7)	74 (74.0)	1	0.1	337.8
TT	26 (17.3)	26 (26.0)	0.60 (0.32-1.10)		
Overdominantni					
GG + TT	70 (46.7)	51 (51)	1	0.5	340.1
GT	80 (53.3)	49 (49)	1.19 (0.72-1.97)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.76 (0.53-1.10)	0.15	338.4

#### 3.6.1.4. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7017300 sa rizikom za razvoj KP

Za sve tri grupe ispitanika ustanovljene su raspodele genotipova koje su u skladu sa Hardy-Vajnbergovom ravnotežom.

Statistički značajna razlika u učestalostima genotipova genetičke varijante rs7017300 nađena je između grupe bolesnika sa KP i kontrolne grupe. Log-aditivni model je, na osnovu AIC skora, izabran kao genetički model koji najbolje opisuje asocijaciju genetičke varijante rs7017300 sa rizikom za razvoj KP ( $P = 0.0008$ ). Ukoliko se podrazumeva ovaj model asocijacije, nosioci manje učestalog alela C imaju povećan rizik za razvoj KP (OR = 2.63, 95%CI 1.44-4.80) (tabela 18).

Tabela 18. Asocijacija genetičke varijante rs7017300 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
AA	100 (66.7)	84 (84.0)	1	0.0018	329.9
AC	45 (30.0)	16 (16.0)	2.36 (1.25-4.48)		
CC	5 (3.3)	0 (0.0)	NA (0.00-NA)		
<b>Dominantni</b>					
AA	100 (66.7)	84 (84.0)	1	0.0018	330.8
AC + CC	50 (33.3)	16 (16.0)	2.62 (1.39-4.95)		
<b>Recesivni</b>					
AA + AC	145 (96.7)	100 (100)	1	0.023	335.3
CC	5 (3.3)	0 (0)	NA (0.00-NA)		
<b>Overdominantni</b>					
AA + CC	105 (70)	84 (84.0)	1	0.01	333.9
AC	45 (30)	16 (16.0)	2.25 (1.19-4.26)		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	2.63 (1.44-4.80)	8e-04	329.2

Poređenjem raspodele genotipova genetičke varijante rs7017300 kod bolesnika sa KP i BPH potvrđena je asocijacija alela C povećanim sa rizikom za razvoj KP ( $P = 0.0064$  za kodominantni model). Prema AIC skor, model koji najbolje opisuje uočene razlike je kodominantni ( $OR_{AC} = 1.60$ , 95%CI 0.95-2.69, podaci za homozigot CC su nedostupni zbog odsustva ispitanika sa ovim genotipom u grupi bolesnika sa BPH) (tabela 19). Pokazano je da muškarci sa genotipom AC imaju 1.6 puta veći rizik za razvoj KP, u odnosu na muškarce sa genotipom AA.



Tabela 19. Asocijacija genetičke varijante rs7017300 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH(%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
AA	100 (66.7)	117 (78.0)	1		
AC	45 (30.0)	33 (22.0)	1.60 (0.95-2.69)	0.0064	411.8
CC	5 (3.3)	0 (0.0)	NA (0.00-NA)		
<b>Dominantni</b>					
AA	100 (66.7)	117 (78.0)	1		
AC + CC	50 (33.3)	33 (22.0)	1.77 (1.06-2.96)	0.028	415
<b>Recesivni</b>					
AA + AC	145 (96.7)	150 (0)	1		
CC	5 (3.3)	0 (0)	NA (0.00-NA)	0.0081	412.9
<b>Overdominantni</b>					
AA + CC	105 (70)	117 (78.0)	1		
AC	45 (30)	33 (22.0)	1.52 (0.90-2.56)	0.11	417.4
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	1.87 (1.16-3.02)	0.0091	413.1

Tabela 20. Asocijacija genetičke varijante rs7017300 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
AA	117 (78.0)	84 (84.0)	1		
AC	33 (22.0)	16 (16.0)	1.48 (0.77-2.86)	0.24	-
CC	0 (0.0)	0 (0.0)	-		
<b>Dominantni</b>					
AA	117 (78.0)	84 (84.0)	-		
AC + CC	33 (22.0)	16 (16.0)	-		
<b>Recesivni</b>					
AA + AC	150 (0)	100 (100)	-		
CC	0 (0)	0 (0)	-		
<b>Overdominantni</b>					
AA + CC	117 (78.0)	84 (84.0)	-		
AC	33 (22.0)	16 (16.0)	-		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	-		

O prisustvu potencijalne asocijacije genetičke varijante rs7017300 sa rizikom za razvoj BPH nije bilo moguće izvući nedvosmislen zaključak, iako *P* vrednost za kodominantni model prevazilazi prag statističke značajnosti, usled odsustva ispitanika sa genotipom CC u grupi bolesnika sa BPH i kontrolnoj grupi (tabela 20).

### 3.6.1.5. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za razvoj KP

Kod sve tri analizirane grupe ispitanika ustanovljeno je prisustvo Hardy-Vajnbergove ravnoteže.

Razultati analize pokazali su da se učestalosti genotipova genetičke varijante rs7837688 značajno razlikuju kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe. Genetički model kojim se najbolje objašnjavaju uočene razlike je overdominantni ( $P = 0.0052$ ). Ukoliko se pretpostavi da genetička varijanta rs7837688 doprinosi predispoziciji za razvoj KP po ovom modelu, muškarci sa genotipom GT imaju 2.4 puta veći rizik za razvoj KP u odnosu na muškarce sa homozigotnim genotipovima (95% CI 1.27-4.53) (tabela 21).

Tabela 21. Asocijacija genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
GG	101 (67.3)	82 (82.0)	1	0.02	334.7
GT	47 (31.3)	16 (16.0)	2.38 (1.26-4.51)		
TT	2 (1.3)	2 (2.0)	0.81 (0.11-5.89)		
<b>Dominantni</b>					
GG	101 (67.3)	82 (82.0)	1	0.009	333.7
GT + TT	49 (32.7)	18 (18.0)	2.21 (1.20-4.08)		
<b>Recesivni</b>					
GG + GT	148 (98.7)	98 (98)	1	0.68	340.3
TT	2 (1.3)	2 (2)	0.66 (0.09-4.78)		
<b>Overdominantni</b>					
GG + TT	103 (68.7)	84 (84.0)	1	0.0052	332.7
GT	47 (31.3)	16 (16.0)	2.40 (1.27-4.53)		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	1.89 (1.07-3.33)	0.022	335.3

Asocijacija genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za razvoj KP potvrđena je poređenjem raspodele genotipova kod bolesnika sa KP i BPH. Genetički model koji prema AIC skoru najpribližnije objašnjava uočene razlike je log-aditivni, a alel koji doprinosi povećanju rizika za razvoj KP je T ( $P = 0.0033$ , OR = 2.14, 95% CI 1.27-3.61) (tabela 22).

Tabela 22. Asocijacija genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH(%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
GG	101 (67.3)	122 (81.3)	1		
GT	47 (31.3)	28 (18.7)	2.03 (1.19-3.47)	0.0082	412.3
TT	2 (1.3)	0 (0.0)	NA (0.00-NA)		
<b>Dominantni</b>					
GG	101 (67.3)	122 (81.3)	1		
GT + TT	49 (32.7)	28 (18.7)	2.11 (1.24-3.61)	0.0053	412.1
<b>Recesivni</b>					
GG + GT	148 (98.7)	150 (0)	1		
TT	2 (1.3)	0 (0)	NA (0.00-NA)	0.095	417.1
<b>Overdominantni</b>					
GG + TT	103 (68.7)	122 (81.3)	1		
GT	47 (31.3)	28 (18.7)	1.99 (1.16-3.40)	0.011	413.4
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	2.14 (1.27-3.61)	0.0033	411.3

Poređenje raspodela genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe nije pokazalo asocijaciju genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za razvoj BPH. Međutim, kada je pretpostavljeno da je u osnovi navedene asocijacije recesivni genetički model, koji prema AIC skoru najbolje opisuje uočene razlike, dobijen je statistički trend značajnosti ( $P = 0.055$ ). U ovom slučaju, nije bilo moguće ustanoviti vrednost OR usled odsustva ispitanika sa genotipom TT u grupi bolesnika sa BPH (tabela 23).

Tabela 23. Asocijacija genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
GG	122 (81.3)	82 (82.0)	1	0.14	338.6
GT	28 (18.7)	16 (16.0)	1.18 (0.60-2.31)		
TT	0 (0.0)	2 (2.0)	0.00 (0.00-NA)		
Dominantni					
GG	122 (81.3)	82 (82.0)	1	0.89	340.5
GT + TT	28 (18.7)	18 (18.0)	1.05 (0.54-2.01)		
Recesivni					
GG + GT	150 (0)	98 (98)	1	0.055	336.8
TT	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00-NA)		
Overdominantni					
GG + TT	122 (81.3)	84 (84.0)	1	0.59	340.2
GT	28 (18.7)	16 (16.0)	1.20 (0.61-2.36)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.93 (0.50-1.70)	0.8	340.4

### 3.6.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 17q12 sa rizikom za razvoj KP

#### 3.6.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za razvoj KP

Utvrđene distribucije genotipova u sve tri ispitivane grupe ne pokazuju odstupanje od Hardi-Vajbergove ravnoteže.

Poređenje učestalosti genotipova genetičke varijante rs7501939 kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe dalo je statistički značajan rezultat za asocijaciju navedene genetičke varijante sa rizikom za razvoj KP po log-aditivnom genetičkom modelu, koji je ujedno i model koji najbolje opisuje uočene razlike ( $P = 0.0038$ ). Prema rezultatima procene doprinosa varijante rs7501939 predispoziciji za razvoj KP, manje učestali alel T asociiran je sa smanjenjem rizika za pojavu ove bolesti (OR = 0.44, 95% CI 0.20-0.95) (tabela 24).

Tabela 24. Asocijacija genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
CC	71 (47.3)	37 (37)	1	0.11	338
CT	63 (42)	44 (44)	0.75 (0.43-1.30)		
TT	16 (10.7)	19 (19)	0.44 (0.20-0.95)		
<b>Dominantni</b>					
CC	71 (47.3)	37 (37)	1	0.11	337.9
CT + TT	79 (52.7)	63 (63)	0.65 (0.39-1.10)		
<b>Recesivni</b>					
CC + CT	134 (89.3)	81 (81)	1	0.066	337.1
TT	16 (10.7)	19 (19)	0.51 (0.25-1.05)		
<b>Overdominantni</b>					
CC + TT	87 (58)	56 (56)	1	0.75	340.4
CT	63 (42)	44 (44)	0.92 (0.55-1.54)		
<b>Log-aditivni</b>	-	-	0.68 (0.47-0.98)	0.038	336.2

Analiza razlika u raspodeli genotipova kod bolesnika sa KP i BPH nije ukazala na postojanje asocijacije genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za razvoj (tabela 25).

Tabela 25. Asocijacija genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH(%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
CC	71 (47.3)	72 (48)	1	0.99	421.9
CT	63 (42)	62 (41.3)	1.03 (0.64-1.67)		
TT	16 (10.7)	16 (10.7)	1.01 (0.47-2.18)		
<b>Dominantni</b>					
CC	71 (47.3)	124 (82.7)	1	0.91	419.9
CT + TT	79 (52.7)	26 (17.3)	1.03 (0.65-1.62)		
<b>Recesivni</b>					
CC + TC	134 (89.3)	149 (99.3)	1	1	419.9
TT	16 (10.7)	1 (0.7)	1.00 (0.48-2.08)		
<b>Overdominantni</b>					
CC + TT	87 (58)	125 (83.3)	1	0.91	419.9
TC	63 (42)	25 (16.7)	1.03 (0.65-1.63)		
<b>Log-aditivni</b>	-	-	1.02 (0.72-1.42)	0.93	419.9

Kada je razmatrana potencijalna asocijacija genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za razvoj BPH statistička značajnost ustanovljena je za log-aditivni model asocijacije, koji najbolje opisuje uočene razlike u distribuciji genotipova kod bolesnika

sa BPH i kontrolne grupe ( $P = 0.032$ ). Za nosioce manje učestalog alela T genetičke varijante rs7501939 pokazan je smanjen rizik za razvoj BPH, u odnosu na muškarce sa genotipom CC (OR= 0.67, 95% CI 0.47-0.97 za log-aditivni model) (tabela 26).

Tabela 26. Asocijacija genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
CC	72 (48)	37 (37)	1	0.095	337.8
CT	62 (41.3)	44 (44)	0.72 (0.42-1.26)		
TT	16 (10.7)	19 (19)	0.43 (0.20-0.94)		
<b>Dominantni</b>					
CC	124 (82.7)	37 (37)	1	0.085	337.5
CT + TT	26 (17.3)	63 (63)	0.64 (0.38-1.07)		
<b>Recesivni</b>					
CC + TC	149 (99.3)	81 (81)	1	0.066	337.1
TT	1 (0.7)	19 (19)	0.51 (0.25-1.05)		
<b>Overdominantni</b>					
CC + TT	125 (83.3)	56 (56)	1	0.68	340.3
TC	25 (16.7)	44 (44)	0.90 (0.54-1.50)		
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	0.67 (0.47-0.97)	0.032	335.9

### 3.6.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za razvoj KP

Učestalosti genotipova genetičke varijante rs3760511 u grupama bolesnika sa KP i BHP, kao i u kontrolnoj grupi, u skladu su sa Hardy-Vajnbergovom ravnotežom.

Pri poređenju učestalosti genotipova navedene varijante kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe nisu pokazane značajne razlike. Test asocijacije ove genetičke varijante sa rizikom za razvoj KP pokazao je *P* vrednost od 0.29 za dominantni model, kojim se najbolje objašnjavaju uočene razlike (tabela 27).

Tabela 27. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
TT	70 (46.7)	51 (51)	1	0.55	341.3
TG	64 (42.7)	36 (36)	1.30 (0.75-2.23)		
GG	16 (10.7)	13 (13)	0.90 (0.40-2.03)		
Dominantni					
TT	70 (46.7)	51 (51)	1	0.5	340.1
TG + GG	80 (53.3)	49 (49)	1.19 (0.72-1.97)		
Recesivni					
TT + TG	134 (89.3)	87 (87)	1	0.57	340.2
GG	16 (10.7)	13 (13)	0.80 (0.37-1.74)		
Overdominantni					
TT + GG	86 (57.3)	64 (64)	1	0.29	339.4
TG	64 (42.7)	36 (36)	1.32 (0.79-2.23)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.04 (0.72-1.51)	0.82	340.5

Poređenje učestalosti genotipova kod bolesnika sa KP i BPH takođe nije pokazalo statistički značajnu razliku ni za jedan od testiranih modela (tabela 28).

Tabela 28. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
TT	70 (46.7)	65 (43.3)	1	0.51	420.5
TG	64 (42.7)	73 (48.7)	0.81 (0.51-1.31)		
GG	16 (10.7)	12 (8)	1.24 (0.54-2.81)		
Dominantni					
TT	70 (46.7)	65 (43.3)	1	0.56	419.6
TG + GG	80 (53.3)	85 (56.7)	0.87 (0.55-1.38)		
Recesivni					
TT + TG	134 (89.3)	138 (92)	1	0.43	419.3
GG	16 (10.7)	12 (8)	1.37 (0.63-3.01)		
Overdominantni					
TT + GG	86 (57.3)	77 (51.3)	1	0.3	418.8
TG	64 (42.7)	73 (48.7)	0.78 (0.50-1.24)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.98 (0.69-1.40)	0.93	419.9

Statistički značajna razlika u distribuciji genotipova genetičke varijante rs3760511 pronađena je između grupe bolesnika sa BPH i kontrolne grupe ( $P = 0.047$  za model koji najbolje opisuje uočene razlike - overdominantni model). Pokazano je da

muškarci sa genotipom TG imaju 1.69 puta veći rizik za razvoj BPH u odnosu na muškarce sa homozigotnim genotipovima (95%CI 1.00-2.83) (tabela 29).

Tabela 29. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
<b>Kodominantni</b>					
TT	65 (43.3)	51 (51)	1		
TG	73 (48.7)	36 (36)	1.59 (0.93-2.74)	0.11	338
GG	12 (8)	13 (13)	0.72 (0.30-1.72)		
<b>Dominantni</b>					
TT	65 (43.3)	51 (51)	1		
TG + GG	85 (56.7)	49 (49)	1.36 (0.82-2.26)	0.23	339.1
<b>Recesivni</b>					
TT + TG	138 (92)	87 (87)	1		
GG	12 (8)	13 (13)	0.58 (0.25-1.33)	0.2	338.9
<b>Overdominantni</b>					
TT + GG	77 (51.3)	64 (64)	1		
TG	73 (48.7)	36 (36)	1.69 (1.00-2.83)	0.047	336.6
<b>Log-aditivni</b>					
-	-	-	1.06 (0.72-1.57)	0.75	340.4

### 3.6.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 7q36 sa rizikom za razvoj KP

#### 3.6.3.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za razvoj KP

Raspodela genotipova u sve tri grupe ispitanika u skladu je sa Hardy-Vajnbergovom ravnotežom.

Rezultati analize nisu ukazali na postojanje asocijacije genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za razvoj KP, kako prilikom poređenja distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe (tabela 30), tako ni prilikom poređenja navedenih učestalosti kod bolesnika sa KP i BPH (tabela 31). U ovim poređenjima nije pokazan ni statistički trend značajnosti, s obzirom da je najmanja dobijena P vrednost 0.37.



Tabela 30. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
GG	76 (50.7)	54 (54)	1	0.87	342.2
GT	65 (43.3)	40 (40)	1.15 (0.68-1.95)		
TT	9 (6)	6 (6)	1.07 (0.36-3.17)		
Dominantni					
GG	76 (50.7)	54 (54)	1	0.61	340.2
GT + TT	74 (49.3)	46 (46)	1.14 (0.69-1.90)		
Recesivni					
GG + GT	141 (94)	94 (94)	1	1	340.5
TT	9 (6)	6 (6)	1.00 (0.34-2.90)		
Overdominantni					
GG + TT	85 (56.7)	60 (60)	1	0.6	340.2
GT	65 (43.3)	40 (40)	1.15 (0.69-1.92)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.10 (0.72-1.66)	0.67	340.3

Tabela 31. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
GG	76 (50.7)	78 (52)	1	0.59	420.8
GT	65 (43.3)	59 (39.3)	1.13 (0.70-1.82)		
TT	9 (6)	13 (8.7)	0.71 (0.29-1.76)		
Dominantni					
GG	76 (50.7)	78 (52)	1	0.82	419.8
GT + TT	74 (49.3)	72 (48)	1.05 (0.67-1.66)		
Recesivni					
GG + GT	141 (94)	137 (91.3)	1	0.37	419.1
TT	9 (6)	13 (8.7)	0.67 (0.28-1.62)		
Overdominantni					
GG + TT	85 (56.7)	91 (60.7)	1	0.48	419.4
GT	65 (43.3)	59 (39.3)	1.18 (0.74-1.87)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.97 (0.67-1.39)	0.85	419.9

Slični rezultati dobijeni su i u poređenju učestalosti genotipova genetičke varijante rs1799983 kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe, te stoga, nije pokazana asocijacija navedene genetičke varijante sa sa rizikom za razvoj BPH (tabela 32).

Tabela 32. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
GG	78 (52)	54 (54)	1	0.73	341.9
GT	59 (39.3)	40 (40)	1.02 (0.60-1.74)		
TT	13 (8.7)	6 (6)	1.50 (0.54-4.19)		
Dominantni					
GG	78 (52)	54 (54)	1	0.76	340.4
GT + TT	72 (48)	46 (46)	1.08 (0.65-1.80)		
Recesivni					
GG + GT	137 (91.3)	94 (94)	1	0.43	339.9
TT	13 (8.7)	6 (6)	1.49 (0.55-4.05)		
Overdominantni					
GG + TT	91 (60.7)	60 (60)	1	0.92	340.5
GT	59 (39.3)	40 (40)	0.97 (0.58-1.63)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.12 (0.75-1.68)	0.57	340.2

### 3.6.3.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u promotorskom regionu gena *NOS3* sa rizikom za razvoj KP

#### 3.6.3.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za razvoj KP

Distribucija genotipova kod bolesnika sa KP i BPH, kao i u kontrolnoj grupi u skladu je sa Hardy-Vajnbergovim principom.

Za učestalosti genotipova genetičke varijante rs2070744 nije pokazana statistički značajna razlika između grupe bolesnika sa KP i kontrolne grupe. Za overdominantni model koji prema AIC skorom najbolje opisuje uočene razlike dobijena je P vrednost od 0.38 (tabela 33). Takođe, poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH nije pokazana asocijacija genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za razvoj KP (tabela 34).

Tabela 33. Asocijacija genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
TT	54 (36)	34 (34)	1	0.62	341.6
TC	68 (45.3)	51 (51)	0.84 (0.48-1.47)		
CC	28 (18.7)	15 (15)	1.18 (0.55-2.51)		
Dominantni					
TT	54 (36)	34 (34)	1	0.75	340.4
TC + CC	96 (64)	66 (66)	0.92 (0.54-1.56)		
Recesivni					
TT + TC	122 (81.3)	85 (85)	1	0.45	339.9
CC	28 (18.7)	15 (15)	1.30 (0.66-2.58)		
Overdominantni					
TT + CC	82 (54.7)	49 (49)	1	0.38	339.7
TC	68 (45.3)	51 (51)	0.80 (0.48-1.32)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.03 (0.72-1.48)	0.85	340.5

Tabela 34. Asocijacija genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
TT	54 (36)	57 (38)	1	0.45	420.3
TC	68 (45.3)	73 (48.7)	0.98 (0.60-1.62)		
CC	28 (18.7)	20 (13.3)	1.48 (0.75-2.93)		
Dominantni					
TT	54 (36)	57 (38)	1	0.72	419.8
TC + CC	96 (64)	93 (62)	1.09 (0.68-1.74)		
Recesivni					
TT + TC	122 (81.3)	130 (86.7)	1	0.21	418.3
CC	28 (18.7)	20 (13.3)	1.49 (0.80-2.79)		
Overdominantni					
TT + CC	82 (54.7)	77 (51.3)	1	0.56	419.6
TC	68 (45.3)	73 (48.7)	0.87 (0.56-1.38)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.16 (0.84-1.61)	0.36	419.1

Prilikom analize postojanja potencijalne asocijacije genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za razvoj BPH nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalostima genotipova navedene varijante kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe (tabela 35).

Tabela 35. Asocijacija genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
TT	57 (38)	34 (34)	1	0.8	342.1
TC	73 (48.7)	51 (51)	0.85 (0.49-1.49)		
CC	20 (13.3)	15 (15)	0.80 (0.36-1.76)		
Dominantni					
TT	57 (38)	34 (34)	1	0.52	340.1
TC + CC	93 (62)	66 (66)	0.84 (0.50-1.43)		
Recesivni					
TT + TC	130 (86.7)	85 (85)	1	0.71	340.4
CC	20 (13.3)	15 (15)	0.87 (0.42-1.80)		
Overdominantni					
TT + CC	77 (51.3)	49 (49)	1	0.72	340.4
TC	73 (48.7)	51 (51)	0.91 (0.55-1.51)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.88 (0.61-1.28)	0.51	340.1

### 3.6.3.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za razvoj KP

Sve tri ispitivane grupe uzoraka raspodelom genotipova zadovoljavaju Hardy-Vajnbergov princip ravnoteže.

Analiza asocijacije genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za razvoj KP nije pokazala statistički značajnu razliku u učestalostima genotipova navedene genetičke varijante kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe (tabela 36), kao ni kod bolesnika sa KP i BPH (tabela 37). Takođe, za navedenu varijantu nije pokazana asocijacija sa rizikom za razvoj BPH (tabela 38).

Tabela 36. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
CC	130 (86.7)	85 (85)	1	0.91	342.3
CT	19 (12.7)	14 (14)	0.89 (0.42-1.86)		
TT	1 (0.7)	1 (1)	0.65 (0.04-10.60)		
Dominantni					
CC	130 (86.7)	85 (85)	1	0.71	340.4
CT + TT	20 (13.3)	15 (15)	0.87 (0.42-1.80)		
Recesivni					
CC + TC	149 (99.3)	99 (99)	1	0.77	340.4
TT	1 (0.7)	1 (1)	0.66 (0.04-10.75)		
Overdominantni					
CC + TT	131 (87.3)	86 (86)	1	0.76	340.4
TC	19 (12.7)	14 (14)	0.89 (0.42-1.87)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.87 (0.45-1.69)	0.68	340.3

Tabela 37. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za razvoj KP, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa KP i BPH

Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj bolesnika sa BPH (%)	OR (95% CI)	P vrednost	AIC
Kodominantni					
CC	130 (86.7)	130 (86.7)	1	0.49	420.5
CT	19 (12.7)	20 (13.3)	0.95 (0.48-1.86)		
TT	1 (0.7)	0 (0)	NA (0.00-NA)		
Dominantni					
CC	130 (86.7)	130 (86.7)	1	NA	419.9
CT + TT	20 (13.3)	20 (13.3)	1.00 (0.51-1.95)		
Recesivni					
CC + TC	149 (99.3)	150 (100)	1	0.24	418.5
TT	1 (0.7)	0 (0)	NA (0.00-NA)		
Overdominantni					
CC + TT	131 (87.3)	130 (86.7)	1	0.86	419.9
TC	19 (12.7)	20 (13.3)	0.94 (0.48-1.85)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.05 (0.56-2.00)	0.87	419.9

Tabela 38. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za razvoj BPH, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa BPH i kontrolne grupe

Genetički model	Broj bolesnika sa BPH (%)	Broj kontrola (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
Kodominantni					
CC	130 (86.7)	85 (85)	1	0.39	340.6
CT	20 (13.3)	14 (14)	0.93 (0.45-1.95)		
TT	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-NA)		
Dominantni					
CC	130 (86.7)	85 (85)	1	0.71	340.4
CT + TT	20 (13.3)	15 (15)	0.87 (0.42-1.80)		
Recesivni					
CC + TC	150 (100)	99 (99)	1	0.18	338.7
TT	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-NA)		
Overdominantni					
CC + TT	130 (86.7)	86 (86)	1	0.88	340.5
TC	20 (13.3)	14 (14)	0.95 (0.45-1.97)		
Log-aditivni					
-	-	-	0.82 (0.41-1.63)	0.57	340.2

### 3.7. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP

Na osnovu rezultata GWA studija, koje su se odnosile na evropske populacije, izabrano je 13 genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 za koje je izvršena analiza asocijacije alela i genotipova sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP u grupi bolesnika sa teritorije Republike Srbije. Kao standardni prognostički parametri KP u ovom radu korišćeni su serumske vrednosti PSA, GGS i klinički stadijum KP određivan po TNM klasifikaciji.

#### 3.7.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 8q24 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP

Za genetičke varijante rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300 i rs7837688 locirane u regionu 8q24 nije pokazana asocijacija sa standardnim prognostičkim parametrima KP. U svim sprovedenim testovima asocijacije za tri različita genetička modela dobijene su *P* vrednosti veće od 0.1. Takođe, u mnogobrojnim poređenjima statističke tabele sadržale su više od 20% polja sa

očekivanim vrednostima učestalosti genotipova manjim od 5 za kodominantni i recesivni model (tabele 39-43). Naime, prema Cochran-ovom pravilu, ukoliko u statističkim tabelama očekivanih učestalosti genotipova više od 20% polja ima vrednost manju od 5 ili makar jedno polje sadrži vrednost manju od 1, ne preporučuje se korišćenje  $\chi^2$  testa u poređenju razlika učestalosti genotipova između različitih grupa ispitanika (205).

Tabela 39. Asocijacija genetičke varijante rs1447295 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	Genotipovi			rs1447295		
	CC	CA	AA	P vrednost (kodominantan)	P vrednost (dominantan) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivan) <sub>a</sub>
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	27	22	0			
10-20	25	12	2	0.326 <sub>b</sub>	0.610	0.599 <sub>b</sub>
≥ 20	34	27	1			
T stadijum						
T1	15	14	0			
T2	44	25	2	0.661 <sub>b</sub>	0.542	0.659 <sub>b</sub>
T3 i T4	27	22	1			
GGS						
< 7	37	32	2			
= 7	36	20	1	0.707 <sub>b</sub>	0.447	0.702 <sub>b</sub>
> 7	13	9	0			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sub>b</sub> više od 20% polja u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

Tabela 40. Asocijacija genetičke varijante rs4242382 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs4242382			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	Genotipovi					
	GG	GA	AA			
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	34	15	0			
10-20	31	7	1	0.451 <sub>b</sub>	0.347	0.563 <sub>b</sub>
≥ 20	41	20	1			
T stadijum						
T1	24	5	0			
T2	47	23	1	0.550 <sub>b</sub>	0.254	0.754 <sub>b</sub>
T3 i T4	35	14	1			
GGS						
< 7	51	19	1			
= 7	38	18	1	0.883 <sub>b</sub>	0.622	0.828 <sub>b</sub>
> 7	17	5	0			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sub>b</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

Tabela 41. Asocijacija genetičke varijante rs6983267 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs6983267			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	Genotipovi					
	GG	GT	TT			
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	15	26	8			
10-20	15	22	2	0.561	0.694	0.258
≥ 20	23	32	7			
T stadijum						
T1	9	18	2			
T2	27	33	11	0.456	0.779	0.310
T3 i T4	17	29	4			
GGS						
< 7	23	35	7			
= 7	20	31	6	0.580	0.291	0.602
> 7	4	14	4			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom



Tabela 42. Asocijacija genetičke varijante rs7017300 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs7017300					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	AA	AC	CC			
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	32	15	2			
10-20	27	11	1	0.992 <sub>b</sub>	0.921	0.924 <sub>b</sub>
≥ 20	41	19	2			
T stadijum						
T1	22	6	1			
T2	44	26	1	0.329 <sub>b</sub>	0.397	0.383 <sub>b</sub>
T3 i T4	34	13	3			
GGS						
< 7	47	21	3			
= 7	38	17	2	0.918 <sub>b</sub>	0.787	0.625 <sub>b</sub>
> 7	15	7	0			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sub>b</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

Tabela 43. Asocijacija genetičke varijante rs7837688 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs7837688					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	GG	GT	TT			
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	34	14	1			
10-20	28	11	0	0.800 <sub>b</sub>	0.606	0.687 <sub>b</sub>
≥ 20	39	22	1			
T stadijum						
T1	22	6	1			
T2	46	25	0	0.423 <sub>b</sub>	0.546	0.347 <sub>b</sub>
T3 i T4	33	16	1			
GGS						
< 7	50	21	0			
= 7	36	20	1	0.491 <sub>b</sub>	0.681	0.251 <sub>b</sub>
> 7	15	6	1			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sub>b</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

### 3.7.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 17q12 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP

#### 3.7.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7501939 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP

Između grupa bolesnika sa KP formiranih na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara nisu utvrđene statistički značajne razlike u distribucijama genotipova genetičke varijante rs7501939 (tabela 44).

Tabela 44. Asocijacija genetičke varijante rs7501939 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs7501939					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	CC	CT	TT			
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	21	25	3			
10-20	18	14	7	0.46	0.36	0.62
≥ 20	32	24	6			
T stadijum						
T1	13	11	4			
T2	32	32	8	0.65	0.55	0.38
T3 i T4	26	20	4			
GGS						
< 7	34	28	9			
= 7	24	29	4	0.88	0.62	0.78
> 7	13	6	3			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

#### 3.7.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3760511 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP

Za genetičku varijantu rs3760511 pokazana je asocijacija sa GGS kao standardnim prognostičkim parametrom KP, pri čemu je statistička značajnost dobijena za kodominantni i recesivni genetički model ( $P = 0.0092$  i  $P = 0.0039$ , redom) (tabela 45).

Tabela 45. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs3760511			<i>P</i> vrednost (kodominantni)	<i>P</i> vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	<i>P</i> vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	Genotipovi					
	TT	TG	GG			
<b>Serumski PSA (ng/ml)</b>						
≤10	23	21	5			
10-20	19	14	6	0.86	0.84	0.67
≥ 20	28	29	5			
<b>T stadijum</b>						
T1	13	10	5			
T2	37	29	6	0.38	0.45	0.38
T3 i T4	20	25	5			
<b>GGs</b>						
< 7	33	24	14			
= 7	27	29	1	0.0092	0.98	0.0039
> 7	10	11	1			

<sup>a</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Poređenjem učestalosti genotipova kod bolesnika sa zbirnim Glison gradusom <7 i =7 pokazana je asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa vrednostima GGS. Recesivni model, koji najbolje opisuje uočene razlike prema AIC skoru, pokazuje da bolesnici sa KP koji poseduju genotip GG genetičke varijante rs3760511 imaju oko 14 puta manji rizik za dobijanje KP čiji GGS iznosi 7, u odnosu na bolesnike koji su nosioci alela T ( $P = 0.0006$ , OR = 0.07, 95%CI 0.01-0.71) (tabela 46).

Poređenje raspodela genotipova kod KP bolesnika sa GGS <7 i >7 nije ukazalo na postojanje asocijacije genetičke varijante rs3760511 sa GGS. Ipak, recesivni model, koji prema AIC skoru najbolje opisuje uočene razlike, pokazuje statistički trend asocijacije genotipa GG ove genetičke varijante sa GGS >7 ( $P = 0.06$ , OR = 0.19, 95%CI 0.02-1.57) (tabela 47).

Tabela 46. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa GGS, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa zbirnim Glison gradusom <7 i =7

Genetički model	GGS		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	< 7	= 7			
<b>Kodominantni</b>					
TT	33 (46.5)	27 (47.4)	1	0.0015	168.9
TG	24 (33.8)	29 (50.9)	1.48 (0.70-3.10)		
GG	14 (19.7)	1 (1.8)	0.09 (0.01-0.71)		
<b>Dominantni<sub>a</sub></b>					
TT	33 (46.5)	27 (47.4)	1	0.92	179.9
TG + GG	38 (53.5)	30 (52.6)	0.96 (0.48-1.94)		
<b>Recesivni<sub>a</sub></b>					
TT + TG	57 (80.3)	56 (98.2)	1	6e <sup>-04</sup>	168
GG	14 (19.7)	1 (1.8)	0.07 (0.01-0.57)		

<sup>a</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Tabela 47. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa GGS, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa zbirnim Glison gradusom <7 i >7

Genetički model	GGS		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	< 7	> 7			
<b>Kodominantni</b>					
TT	33 (46.5)	10 (45.5%)	1	0.12	103.6
TG	24 (33.8)	11 (50%)	1.51 (0.55-4.13)		
GG	14 (19.7)	1 (4.5)	0.24 (0.03-2.02)		
<b>Dominantni<sub>a</sub></b>					
TT	33 (46.5)	10 (45.5%)	1	0.93	105.8
TG + GG	38 (53.5)	12 (54.5)	1.04 (0.40-2.72)		
<b>Recesivni<sub>a</sub></b>					
TT + TG	57 (80.3)	21 (95.5)	1	0.06	168
GG	14 (19.7)	1 (4.5)	0.19 (0.02-1.57)		

<sup>a</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Nije utvrđena statistički značajna razlika u učestalostima genotipova genetičke varijante rs3760511 kod bolesnika sa GGS = 7 i >7 (tabela 48).

Tabela 48. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa GGS, dobijena poređenjem distribucije genotipova kod bolesnika sa zbirnim Glison gradusom =7 i >7

Genetički model	GGS		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	= 7	> 7			
Kodominantni					
TT	27 (47.4)	10 (45.5%)	1	0.8	109
TG	29 (50.9)	11 (50%)	1.02 (0.38-2.80)		
GG	1 (1.8)	1 (4.5)	2.70 (0.15-47.39)		
Dominantni <sub>a</sub>					
TT	27 (47.4)	10 (45.5%)	1	0.88	97.4
TG + GG	30 (52.6)	12 (54.5)	1.08 (0.40-2.90)		
Recesivni <sub>a</sub>					
TT + TG	56 (98.2)	21 (95.5)	1	0.5 <sub>b</sub>	97
GG	1 (1.8)	1 (4.5)	2.67 (0.16-44.60)		

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sub>b</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

### 3.7.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 7q36 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP

#### 3.7.3.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1799983 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP

Genetička varijanta rs1799983 asociirana je sa serumskim vrednostima PSA ( $P = 0.038$ , za kodominantni model;  $P = 0.018$ , za dominantni model) (tabela 49).

Poređenje raspodela genotipova kod bolesnika sa KP koji imaju serumski nivo PSA  $\leq 10$  ng/ml i 10-20 ng/ml nije pokazalo asocijaciju SNV rs1799983 sa navedenim prognostičkim parametrom KP (tabela 50). S druge strane, navedena asocijacija je ustanovljena poređenjem učestalosti genotipova rs1799983 kod bolesnika sa serumskim nivoom PSA  $\leq 10$  ng/ml i  $\geq 20$  ng/ml. Kada je podrazumevan dominantni genetički model, koji prema AIC skor najbolje opisuje uočene razlike, pokazano da bolesnici sa KP koji su nosioci alela T analizirane genetičke varijante imaju više nego upola manji rizik da im vrednosti serumske PSA budu više od 20 ng/ml, u odnosu na bolesnike sa genotipom GG ( $P = 0.018$ , OR = 0.40, 95%CI 0.19-0.86) (tabela 51).

Tabela 49. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs1799983					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	GG	GT	TT			
<b>Serumski PSA (ng/ml)</b>						
≤10	19	25	5	0.038	0.018	0.13
10-20	19	18	2			
≥ 20	38	22	2			
<b>T stadijum</b>						
T1	13	13	2	0.17	0.18	0.11
T2	33	32	7			
T3 i T4	30	20	0			
<b>GGS</b>						
< 7	33	34	4	0.54	0.27	0.61
= 7	30	22	5			
> 7	13	9	0			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Tabela 50. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa serumskim vrednostima PSA, dobijena poređenjem distribucija genotipova kod bolesnika sa serumskim PSA ≤10 ng/ml i 10-20 ng/ml

Genetički model	Serumski PSA (ng/ml)		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	≤10	10-20			
<b>Kodominantni</b>					
GG	19 (38.8%)	19 (48.7%)	1	0.51	125.2
GT	25 (51%)	18 (46.1%)	0.72 (0.30-1.73)		
TT	5 (10.2%)	2 (5.1%)	0.40 (0.07-2.32)		
<b>Dominantni<sub>a</sub></b>					
GG	19 (38.8%)	10 (45.5%)	1	0.35	124
GT + TT	30 (61.2)	12 (54.5)	0.67 (0.28-1.56)		
<b>Recesivni<sub>a</sub></b>					
GG + GT	44 (89.8)	21 (95.5)	1	0.37	124.1
TT	5 (10.2%)	1 (4.5)	0.48 (0.09-2.60)		

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Tabela 51. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa serumskim vrednostima PSA, dobijena poređenjem distribucija genotipova kod bolesnika sa serumskim PSA  $\leq 10$  ng/ml i  $\geq 20$  ng/ml

Genetički model	Serumski PSA (ng/ml)		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	< 10	$\geq 20$			
<b>Kodominantni</b>					
GG	19 (38.8%)	38 (61.3%)	1	0.04	151.9
GT	25 (51%)	22 (35.5%)	0.44 (0.20-0.97)		
TT	5 (10.2%)	2 (3.2%)	0.20 (0.04-1.13)		
<b>Dominantni<sup>a</sup></b>					
GG	19 (38.8%)	38 (61.3%)	1	0.018	150.8
GT + TT	30 (61.2)	24 (38.7%)	0.40 (0.19-0.86)		
<b>Recesivni<sup>a</sup></b>					
GG + GT	44 (89.8)	60 (96.8%)	1	0.13	154.1
TT	5 (10.2%)	2 (3.2%)	0.29 (0.05-1.58)		

<sup>a</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Kada je poređena učestalost genotipova kod KP bolesnika sa serumskim PSA 10-20 ng/ml i  $\geq 20$  ng/ml nije utvrđena asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa serumskim vrednostima PSA (tabela 52).

Tabela 52. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa serumskim vrednostima PSA, dobijena poređenjem distribucija genotipova kod bolesnika sa serumskim PSA 10-20 ng/ml i  $\geq 20$  ng/ml

Genetički model	Serumski PSA (ng/ml)		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	10-20 ng/ml	$\geq 20$			
<b>Kodominantni</b>					
GG	19 (48.7%)	38 (61.3%)	1	0.46	139.2
GT	18 (46.1%)	22 (35.5%)	0.61 (0.27-1.40)		
TT	2 (5.1%)	2 (3.2%)	0.50 (0.07-3.83)		
<b>Dominantni<sup>a</sup></b>					
GG	10 (45.5%)	38 (61.3%)	1	0.22	137.2
GT + TT	12 (54.5)	24 (38.7%)	0.60 (0.27-1.35)		
<b>Recesivni<sup>a</sup></b>					
GG + GT	21 (95.5)	60 (96.8%)	1	0.64 <sup>b</sup>	138.5
TT	1 (4.5)	2 (3.2%)	0.62 (0.08-4.57)		

<sup>a</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sup>b</sup> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

**3.7.3.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u promotorskom regionu gena *NOS3* sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP**

**3.7.3.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs2070744 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP**

Za genetičku varijantu rs2070744 nije pokazana asocijacija sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP (tabela 53).

Tabela 53. Asocijacija genetičke varijante rs2070744 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs2070744					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	TT	TC	CC			
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	16	25	8			
10-20	12	21	6	0.24	0.29	0.38
≥ 20	26	22	14			
T stadijum						
T1	10	14	4			
T2	22	33	17	0.62	0.33	0.74
T3 i T4	22	21	7			
GGS						
< 7	26	35	10			
= 7	19	26	12	0.25	0.88	0.13
> 7	9	7	6			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

**3.7.3.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3918226 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP**

Za genetičku varijantu rs3918226 nije pokazana asocijacija sa standardnim prognostičkim parametrima KP. Statistički trend asocijacije dostignut je u analizi



asocijacije navedene genetičke varijante sa kliničkim T stadijumom lokalizovanog KP ( $P = 0.094$  za dominantni model) (tabela 54).

Tabela 54. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa standardnim prognostičkim parametrima KP

Standardni prognostički parametri	rs3918226					
	Genotipovi			<i>P</i> vrednost (kodominantni)	<i>P</i> vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	<i>P</i> vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	CC	CT	TT			
Serumski PSA (ng/ml)						
≤10	40	8	1			
10-20	33	6	0	0.18 <sub>b</sub>	0.11	0.21 <sub>b</sub>
≥ 20	57	5	0			
T stadijum						
T1	23	5	0			
T2	60	11	1	0.25 <sub>b</sub>	0.094	0.84 <sub>b</sub>
T3 i T4	47	3	0			
GGS						
< 7	61	10	0			
= 7	48	8	1	0.58 <sub>b</sub>	0.41	0.65 <sub>b</sub>
> 7	21	1	0			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sub>b</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

### 3.8. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti sa rizikom za progresiju KP

Na osnovu rezultata GWA studija, koje su se odnosile na evropske populacije, izabrano je 13 genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 za koje je izvršena analiza asocijacije alela i genotipova sa rizikom za progresiju KP u grupi bolesnika sa teritorije Republike Srbije. Za procenu rizika za progresiju KP korišćeni su parametri definisani od strane *D'Amico* i saradnika (192), kao i oni definisani od strane *Medeiros*-a i saradnika (182). U okviru ispitivanja asocijacije i genotipova analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za progresiju KP posebno je ispitivana i moguća asocijacija genetičkih varijanti sa prisustvom ili odsustvom metastaza.

### 3.8.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 8q24 sa rizikom za progresiju KP

Za alele i genotipove genetičkih varijanti rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300 i rs7837688 nije pokazana asocijacija sa rizikom za progresiju KP. U svim sprovedenim testovima asocijacije za tri različita genetička modela dobijene su *P* vrednosti veće od 0.1. Takođe, u mnogobrojnim poređenjima statističke tabele sadržale su više od 20% polja sa očekivanim vrednostima manjim od 5 za kodominantni i recesivni model (tabele 55-59).

Tabela 55. Asocijacija genetičke varijante rs1447295 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs1447295					
	Genotipovi			<i>P</i> vrednost (kodominantan)	<i>P</i> vrednost (dominantan) <sub>a</sub>	<i>P</i> vrednost (recesivan) <sub>a</sub>
	CC	CA	AA			
Rizik za progresiju <sub>b</sub>						
Nizak	6	8	0 <sub>a</sub>			
Srednji	35	18	2	0.392 <sub>c</sub>	0.333	0.527 <sub>c</sub>
Visok	45	35	1			
Rizik za progresiju <sub>d</sub>						
Nizak	32	21	2	0.521 <sub>c</sub>	0.873	0.276 <sub>c</sub>
Visok	54	40	1			
Metastaze						
Odsutne	29	25	1	0.662 <sub>c</sub>	0.385	0.904 <sub>c</sub>
Prisutne	57	36	2			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D`Amico et al.*

<sub>c</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sub>d</sub> prema *Medeiros et al.*

Tabela 56. Asocijacija genetičke varijante rs4242382 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs4242382					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	GG	GA	AA			
Rizik za progresiju <sub>b</sub>						
Nizak	11	3	0	0.946 <sub>c</sub>	0.773	0.864 <sub>c</sub>
Srednji	39	15	1			
Visok	56	24	1			
Rizik za progresiju <sub>d</sub>						
Nizak	41	13	1	0.629 <sub>c</sub>	0.427	0.694 <sub>c</sub>
Visok	65	29	1			
Metastaze						
Odsutne	37	17	1	0.575 <sub>c</sub>	0.487	0.694 <sub>c</sub>
Prisutne	69	25	1			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D'Amico et al.*

<sub>c</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sub>d</sub> prema *Medeiros et al.*

Tabela 57. Asocijacija genetičke varijante rs6983267 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs6983267					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	GG	GT	TT			
Rizik za progresiju <sub>b</sub>						
Nizak	5	7	2	0.969	0.977	0.819
Srednji	20	28	7			
Visok	28	45	8			
Rizik za progresiju <sub>c</sub>						
Nizak	23	24	8	0.187	0.206	0.345
Visok	30	56	9			
Metastaze						
Odsutne	5	31	19	0.760	0.510	0.878
Prisutne	12	49	34			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D'Amico et al.*

<sub>c</sub> prema *Medeiros et al.*

Tabela 58. Asocijacija genetičke varijante rs7017300 rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs7017300					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	AA	AC	CC			
Rizik za progresiju <sub>b</sub>						
Nizak	10	4	0			
Srednji	36	17	2	0.969 <sub>c</sub>	0.914	0.766 <sub>c</sub>
Visok	54	24	3			
Rizik za progresiju <sub>d</sub>						
Nizak	38	16	1	0.705 <sub>c</sub>	0.632	0.432 <sub>c</sub>
Visok	62	29	4			
Metastaze						
Odsutne	36	16	3	0.545 <sub>c</sub>	0.811	0.271 <sub>c</sub>
Prisutne	64	29	2			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D'Amico et al.*

<sub>c</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sub>d</sub> prema *Medeiros et al.*

Tabela 59. Asocijacija genetičke varijante rs7837688 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs7837688					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	GG	GT	TT			
Rizik za progresiju <sub>b</sub>						
Nizak	11	3	0			
Srednji	38	17	0	0.617 <sub>c</sub>	0.537	0.422 <sub>c</sub>
Visok	52	27	2			
Rizik za progresiju <sub>d</sub>						
Nizak	41	14	0	0.248 <sub>c</sub>	0.152	0.279 <sub>c</sub>
Visok	60	33	2			
Metastaze						
Odsutne	35	19	1	0.735 <sub>c</sub>	0.463	0.694 <sub>c</sub>
Prisutne	66	28	1			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D'Amico et al.*

<sub>c</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sub>d</sub> prema *Medeiros et al.*

### 3.8.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 17q12 sa rizikom za progresiju KP

#### 3.8.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za progresiju KP

Između grupa bolesnika sa KP formiranih na osnovu rizika za progresiju KP nisu utvrđene statistički značajne razlike u distribucijama genotipova genetičke varijante rs7501939. Međutim, poređenjem učestalosti genotipova navedene genetičke varijante kod bolesnika sa visokim i niskim rizikom za progresiju KP prema preporukama *Medeiros*-a i saradnika dobijen je statistički trend značajnosti za recesivni model asocijacije ( $P = 0.092$ ) (tabela 60).

Tabela 60. Asocijacija genetičke varijante rs7501939 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs7501939					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	CC	CT	TT			
Rizik za progresiju <sub>b</sub>						
Nizak	8	4	2	0.66	0.57	0.39
Srednji	21	27	7			
Visok	42	32	7			
Rizik za progresiju <sub>c</sub>						
Nizak	26	20	9	0.2	0.99	0.092
Visok	45	43	7			
Metastaze						
Odsutne	43	40	12	0.54	0.5	0.29
Prisutne	28	23	4			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D'Amico et al.*

<sub>c</sub> prema *Medeiros et al.*

#### 3.8.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za progresiju KP

Utvrđena je asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za progresiju KP definisanim prema kriterijumu *Medeiros*-a i saradnika po kodominantnom modelu nasleđivanja ( $P = 0.022$ ,  $OR_{TG} = 2.25$ , 95%CI 1.08-4.71,  $OR_{GG} = 0.58$ , 95%CI 0.20-

1.74), a statistički trend značajnosti zabeležen je za recesivni model ( $P = 0.092$ ,  $OR = 0.41$ ,  $95\%CI 0.14-1.16$ ) (tabela 61).

Tabela 61. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs3760511					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	TT	TG	GG			
<b>Rizik za progresiju<sub>b</sub></b>						
Nizak	6	4	4			
Srednji	28	22	5	0.17	0.75	0.097
Visok	36	38	7			
<b>Rizik za progresiju<sub>c</sub></b>						
Nizak	30	16	9	<b>0.022</b>	0.14	0.092
Visok	40	48	7			
<b>Metastaze</b>						
Odsutne	48	36	11	0.3	0.21	0.63
Prisutne	22	28	5			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D'Amico et al.*

<sub>c</sub> prema *Medeiros et al.*

Tabela 62. Asocijacija genetičke varijante rs3760511 sa rizikom za progresiju KP definisanom prema kriterijumima *Medeiros*-a i saradnika

Genetički model	<i>Medeiros</i> i saradnici		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	Nizak rizik	Visok rizik			
<b>Kodominantni</b>					
TT	30 (54.5%)	40 (42.1%)	1		
TG	16 (29.1%)	48 (50.5%)	2.25 (1.08-4.71)	<b>0.022</b>	<b>195.5</b>
GG	9 (16.4%)	7 (7.4%)	0.58 (0.20-1.74)		
<b>Dominantni<sub>a</sub></b>					
TT	30 (54.5%)	40 (42.1%)	1		
TG + GG	25 (45.5%)	55 (57.9%)	1.65 (0.85-3.22)	<b>0.14</b>	<b>199</b>
<b>Recesivni<sub>a</sub></b>					
TT + TG	46 (83.6%)	88 (92.6%)	1		
GG	9 (16.4%)	7 (7.4%)	<b>0.41 (0.14-1.16)</b>	<b>0.092</b>	<b>198.3</b>

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Prema kodominantnom modelu, bolesnici sa KP koji poseduju genotip TG genetičke varijante rs3760511 imaju 2.25 puta veći rizik za progresiju KP prema kriterijumima *Medeiros*-a i saradnika, u odnosu na bolesnike sa genotipom TT (tabela 62). Pored toga, statistički trend dostignut je i u analizi asocijacije genetičke varijante

rs3760511 sa rizikom za progresiju KP određenim prema kriterijumu *D`Amico* i saradnika po recesivnom genetičkom modelu ( $P = 0.097$ ) (tabela 61).

### 3.8.3. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u regionu 7q36 sa rizikom za progresiju KP

#### 3.8.3.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za progresiju KP

Za genetičku varijantu rs1799983 nije pokazana asocijacija sa rizikom za progresiju KP. Međutim, pokazan je i statistički trend asocijacije navedene genetičke varijante sa rizikom za progresiju KP prema kriterijumu *D`Amico* i saradnika ( $P = 0.081$  za dominantni model), kao i sa pojavom metastaza ( $P = 0.074$  za recesivni model) (tabela 63).

Tabela 63. Asocijacija genetičke varijante rs1799983 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs1799983					
	Genotipovi			<i>P</i> vrednost (kodominantni)	<i>P</i> vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	<i>P</i> vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	GG	GT	TT			
Rizik za progresiju <sub>b</sub>						
Nizak	5	8	1			
Srednji	25	25	5	0.18	0.081	0.29
Visok	46	32	3			
Rizik za progresiju <sub>c</sub>						
Nizak	24	27	4			
Visok	52	38	5	0.42	0.19	0.62
Metastaze						
Odsutne	45	42	8			
Prisutne	31	23	1	0.16	0.29	0.074

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D`Amico et al.*

<sub>c</sub> prema *Medeiros et al.*

### 3.8.3.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u promotorskom regionu gena *NOS3* sa rizikom za progresiju KP

#### 3.8.3.2.1. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za progresiju KP

Za genetičku varijantu rs2070744 nije pokazana asocijacija sa rizikom za progresiju KP. Međutim, ustanovljen je trend asocijacije ispitivane genetičke varijante sa pojavom metastaza za dominantni genetički model ( $P = 0.068$ ) (tabela 64).

Tabela 64. Asocijacija genetičke varijante rs2070744 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs2070744					
	Genotipovi			<i>P</i> vrednost (kodominantni)	<i>P</i> vrednost (dominantni) <sup>a</sup>	<i>P</i> vrednost (recesivni) <sup>a</sup>
	TT	TC	CC			
Rizik za progresiju <sup>b</sup>						
Nizak	5	8	1			
Srednji	14	30	11	0.11	0.13	0.43
Visok	35	30	16			
Rizik za progresiju <sup>c</sup>						
Nizak	18	28	9	0.58	0.52	0.58
Visok	36	40	19			
Metastaze						
Odsutne	29	46	20	0.18	0.068	0.32
Prisutne	25	22	8			

<sup>a</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sup>b</sup> prema *D`Amico et al.*

<sup>c</sup> prema *Medeiros et al.*

#### 3.8.3.2.2. Rezultati analiza asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za progresiju KP

Za genetičku varijantu rs3918226 pokazana je asocijacija sa rizikom za progresiju KP procenjenom prema kriterijumu *D`Amico* i saradnika ( $P = 0.031$  za dominantni model), kao i sa prisustvom metastaza (tabela 65). Poređenjem učestalosti genotipova rs3918226 kod grupa bolesnika sa KP sa niskim i srednjim rizikom, kao i sa



niskim i visokim rizikom za progresiju bolesti nisu dobijeni statistički značajni rezultati (tabele 66 i 67).

Tabela 65. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za progresiju KP

Rizik za progresiju	rs3918226					
	Genotipovi			P vrednost (kodominantni)	P vrednost (dominantni) <sub>a</sub>	P vrednost (recesivni) <sub>a</sub>
	CC	CT	TT			
<b>Rizik za progresiju<sub>b</sub></b>						
Nizak	12	2	0	0.095 <sub>c</sub>	0.031	0.5 <sub>c</sub>
Srednji	42	12	1			
Visok	76	5	0			
<b>Rizik za progresiju<sub>a</sub></b>						
Nizak	45	9	1	0.21 <sub>c</sub>	0.19	0.16 <sub>c</sub>
Visok	85	10	0			
<b>Metastaze</b>						
Odsutne	78	16	1	0.061 <sub>c</sub>	0.022	0.34 <sub>c</sub>
Prisutne	52	3	0			

<sub>a</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa rizikom za progresiju KP

<sub>b</sub> prema *D'Amico et al.*

<sub>c</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sub>d</sub> prema *Medeiros et al.*

Tabela 66. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za progresiju KP, dobijena poređenjem frekvencija genotipova kod grupa bolesnika sa niskim i srednjim rizikom za progresiju KP procenjenim prema kriterijumu *D'Amico* i saradnika

Genetički model	<i>D'Amico</i> i saradnici		OR (95% CI)	P vrednost	AIC
	Nizak rizik	Srednji rizik			
<b>Kodominantni</b>					
CC	12 (85.7%)	42 (76.4%)	1	0.63 <sub>a</sub>	74.7
CT	2 (14.3%)	12 (21.8%)	1.71 (0.34-8.74)		
TT	0 (0%)	1 (1.8%)	NA (0.00-NA)		
<b>Dominantni<sub>b</sub></b>					
CC	12 (85.7%)	42 (76.4%)	1	0.43	73
CT + TT	2 (14.3%)	13 (23.6%)	1.86 (0.37-9.39)		
<b>Recesivni<sub>b</sub></b>					
CC + CT	14 (100%)	54 (98.2%)	1	0.5 <sub>a</sub>	73.1
TT	0 (0%)	1 (1.8%)	NA (0.00-NA)		

<sub>a</sub> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sub>b</sub> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Tabela 67. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za progresiju KP, dobijena poređenjem frekvencija genotipova kod grupa bolesnika sa niskim i visokim rizikom za progresiju KP procenjenim prema kriterijumu *D`Amico* i saradnika

Genetički model	<i>D`Amico</i> i saradnici		OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
	Nizak rizik	Visok rizik			
Kodominantni					
CC	12 (85.7%)	76 (93.8%)	1	0.33 <sub>a</sub>	82.5
CT	2 (14.3%)	5 (6.2%)	0.39 (0.07-2.27)		
TT	0 (0%)	0 (0%)	NA (0.00-NA)		
Dominantni <sub>b</sub>					
CC	12 (85.7%)	76 (93.8%)	1	0.33	82.5
CT + TT	2 (14.3%)	5 (6.2%)	0.39 (0.07-2.27)		
Recesivni <sub>b</sub>					
CC + CT	14 (100%)	81 (100%)	1	1 <sub>a</sub>	-
TT	0 (0%)	0 (0%)	NA (0.00-NA)		

<sup>a</sup> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sup>b</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

Međutim, kada su upoređene navedene učestalosti u grupama bolesnika sa srednjim i visokim rizikom za progresiju KP, procenjeno je da, prema dominantnom modelu, bolesnici nosioci alela T imaju pet puta niži rizik da razviju agresivnu formu KP prema kriterijumu *D`Amico* i saradnika, u odnosu na muškarce sa homozigotnim genotipom CC ( $P = 0.0033$ , OR = 0.21, 95%CI 0.07-0.64) (tabela 68).

Takođe, ustanovljena je statistički značajna razlika u raspodeli genotipova genetičke varijante rs3918226 između grupa bolesnika sa KP formiranih na osnovu prisustva, odnosno odsustva metastaza, kada je podrazumevan dominantni genetički model ( $P = 0.022$ ). Manje učestali alel T ima protektivnu ulogu za pojavu metastaza kod KP. Bolesnici sa KP koji su nosioci alela T imaju četiri puta manju rizik od pojave metastaza u odnosu na bolesnike sa genotipom CC (OR = 0.26, 95%CI 0.07-0.95) (tabela 69).

Tabela 68. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za progresiju KP, dobijena poređenjem frekvencija genotipova kod grupa bolesnika sa srednjim i visokim rizikom za progresiju KP procenjenim prema kriterijumu *D`Amico* i saradnika

Genetički model	<i>D`Amico</i> i saradnici		OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
	Srednji rizik	Visok rizik			
<b>Kodominantni</b>					
CC	42 (76.4%)	76 (93.8%)	1	0.0096	180.2
CT	12 (21.8%)	5 (6.2%)	0.23 (0.08-0.70)		
TT	1 (1.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)		
<b>Dominantni<sub>a</sub></b>					
CC	42 (76.4%)	76 (93.8%)	1	0.0033	178.9
CT + TT	13 (23.6%)	5 (6.2%)	0.21 (0.07-0.64)		
<b>Recesivni<sub>a</sub></b>					
CC + CT	54 (98.2%)	81 (100%)	1	0.18 <sub>b</sub>	185.7
TT	1 (1.8%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)		

<sup>a</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

<sup>b</sup> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

Tabela 69. Asocijacija genetičke varijante rs3918226 sa pojavom metastaza

Genetički model	Metastaze		OR (95% CI)	<i>P</i> vrednost	AIC
	Odsutne	Prisutne			
<b>Kodominantni</b>					
CC	78 (82.1%)	52 (94.5%)	1	0.061 <sub>a</sub>	197.6
CT	16 (16.8%)	3 (5.5%)	0.28 (0.08-1.01)		
TT	1 (1.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)		
<b>Dominantni<sub>b</sub></b>					
CC	78 (82.1%)	52 (94.5%)	1	0.022	195.9
CT + TT	17 (17.9%)	3 (5.5%)	0.26 (0.07-0.95)		
<b>Recesivni<sub>b</sub></b>					
CC + CT	94 (98.9%)	55 (100%)	1	0.34	200.2
TT	1 (1.1%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)		

<sup>a</sup> više od 20% ćelija u tabeli ima očekivane vrednosti manje od 5

<sup>b</sup> dominantni i recesivni modeli podrazumevaju moguću asocijaciju manje učestalih alela sa standardnim prognostičkim parametrom

## 4. Diskusija

Maligne bolesti su, posle kardiovaskularnih bolesti, glavni uzorčnici smrti u Evropi. Procenjuje se da je svaka peta smrt u Evropi uzrokovana malignim bolestima. Među njima najčešće su karcinom dojke, pluća, prostate, jajnika i debelog creva (206). U Evropi je 2008. godine dijagnostikovano 382,000 novih slučajeva KP (207). Epidemiološke procene za Sjedinjene Američke Države pokazuju da će jedan od šest muškaraca tokom života oboleti od KP (208). Svetska zdravstvena organizacija objavila je zabrinjavajuću prognozu o povećanju novodijagnostikovanih slučajeva malignih bolesti u svetu sa 10 miliona u 2000. godini na 15 miliona 2020. godine (209).

Epidemiološka, klinička i molekularno-biološka ispitivanja pokazuju da prevencija i dalje predstavlja glavnu strategiju u borbi protiv incidence i mortaliteta malignih bolesti. Medicinski pristup prevenciji podrazumeva molekularno-biološka istraživanja genetičkih izmena i ćelijskih procesa odgovornih za inicijaciju i razvoj malignih tumora (206). Nakon sekvenciranja genoma čoveka i drugih vrsta nastala je nova naučna disciplina, genomika. Razvoj genomike doprinosi sve intenzivnijoj primeni genetičkih testiranja u dijagnostici malignih bolesti. To je dovelo i do razvoja nove medicinske discipline koja se naziva genomska medicina (210). Istovremeno, otkrića iz oblasti genomike i srodnih naučnih disciplina predstavljaju i osnovu za razvoj savremene personalizovane (translacione) terapije malignih bolesti (211).

U toku je veliki naučni projekat međunarodnog konzorcijuma za genomska istraživanja malignih bolesti (eng. *International Cancer Genome Consortium*, ICGC) gde je jedna od tema i KP (212).

Zahvaljujući GWAS, od 2007. godine, istraživanja molekularne osnove KP proširila su se i na SNP u nekodirajućim regionima genoma čoveka (125, 213). Do sada je otkriveno preko 30 SNP koji su asocirani sa rizikom za razvoj i progresiju KP. Međutim, utvrđeni odnos verovatnoća (OR) kreće se u granicama od 0.64 do 1.88 (143). Dobijene vrednosti OR su i očekivane zato što SNP-ovi predstavljaju samo jedan deo genetičkih faktora koji imaju značaj u molekularnoj patogenezi malignih bolesti koje se

definišu kao poligeniski determinisane kompleksne bolesti. U patogenezi kompleksnih bolesti pored genetičkih, ulogu imaju i sredinski faktori kao i interakcije genetičkih i sredinskih faktora. Složena genetička osnova KP je i razlog što se nijedan od SNP za koji je utvrđena asocijacija sa KP još uvek ne koristi kao prognostički parametar KP u kliničkoj praksi (214, 215).

Međutim, za očekivati je da će dalja genomska istraživanja, naročito ona iz oblasti funkcionalne genomike, imati uspeha u otkriću biomarkera (u prvom redu SNP-ova) koji bi imali svoju punu primenu u prevenciji i skriningu KP (216, 217). Veruje se da će i nova generacija sekvenciranja (eng. *next generation sequencing*, NGS), u tehničkom smislu, olakšati i unaprediti strategije istraživanja asocijacije SNP sa bolestima čoveka, uključujući i KP (218, 219).

Ova doktorska disertacija za cilj svog istraživanja imala je utvrđivanje moguće asocijacije 13 odabranih SNV sa rizikom za razvoj i progresiju KP u grupi bolesnika sa teritorije Republike Srbije. Odabir SNV vršen je na osnovu rezultata GWAS i studija slučajeva i kontrola koje su za temu imale identifikaciju genetičkih varijanti čiji su aleli i genotipovi asociirani sa KP. Studija je uključila 150 bolesnika sa sporadičnim formama KP. Kontrolnu grupu činilo je 100 muškaraca koji su bili bez znakova bolesti prostate. Pored kontrolne grupe opšte populacije studija je obuhvatila i grupu od 150 bolesnika sa BPH. Kao benigni tumor prostate, BPH nije premaligna lezija KP (16). Kod svih bolesnika sa BPH koji su analizirani ovom doktorskom disertacijom isključen je KP. Zbog neizbežne pojave heterogenosti kontrolne grupe, grupa bolesnika sa BPH, za našu studiju, predstavlja grupu koja je svojim osobinama najbliža tzv. grupi super normalnih kontrola (220).

U okviru ove doktorske disertacije za svih pet analiziranih SNV (rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300 i rs7837688) iz regiona 8q24 kao i za rs7501939 iz regiona 17q12 pokazana je asocijacija sa rizikom za razvoj KP u analiziranoj grupi bolesnika.

U interpretaciji značaja SNP u patogenezi KP teškoću predstavlja i činjenica da je velika većina SNP identifikovana u okviru GWAS zapravo locirana u intronima (45%) i intergenskim sekvencama (43%) (140). Međutim, otkrića genomike pokazuju da veliki broj „intergenskih” sekvenci zapravo predstavljaju sekvence za gene koji kodiraju regulatorne molekule RNK ili sekvence regulatornih elemenata koji učestvuju u regulaciji ekspresije gena (140).

Najbolji primer je otkriće vezano za SNP rs6983267 (region 8q24) koji predstavlja „suspektni lokus“ povezan sa rizikom za razvoj KP. Ova genetička varijanta locirana je u regionu 8q24, koji se do skora definisao kao genska pustinja (76, 139, 140). Rezultati kasnijih eksperimentalnih istraživanja pokazali su da se rs6983267 zapravo nalazi u okviru regulatornog elementa (pojačivača) za koji se vezuje regulatorni protein beta-katenin TCF 4. Zahvaljujući formiranoj hromatinskoj petlji, veličine od 335 kb, ovaj regulatorni protein učestvuje u regulaciji ekspresije onkogeno *c-myc*. Pokazano je da se beta-katenin TCF 4 efikasnije vezuje za pojačivač ako se u okviru pojačivača nalazi „rizični“ alel genetičke varijante rs6983264 (221).

Prilikom analize asocijacije alela i genotipova genetičke varijante rs1447295 (region 8q24) sa rizikom za razvoj KP prvo je izvršeno ispitivanje postojanja Hardy-Vajnborgove ravnoteže. Ovo ispitivanje rađeno je odvojeno za grupu bolesnika sa KP, grupu bolesnika sa BPH, kao i za kontrolnu grupu zdravih muškaraca. Uočeno je odstupanje od Hardy-Vajnborgove ravnoteže za grupu bolesnika sa BPH kao i za kontrolnu grupu.

Odstupanje od Hardy-Vajnborgove ravnoteže usvojeno je kao glavni metod identifikacije grešaka u samom postupku genotipizacije (222). Drugim rečima, odabir metode kojim se vrši genotipizacija može uticati na odstupanje dobijenih rezultata od Hardy-Vajnborgove ravnoteže (223). To je razlog što smo rezultate genotipizacije metodom RFLP proverili metodom automatskog sekvenciranja. Rezultati ponovljene genotipizacije potvrdili su rezultate dobijene metodom RFLP. Metodom automatskog sekvenciranja isključili smo mogućnost da je pojava pseudo SNP-ova i delecionih

polimorfizama u fragmentu molekula DNK koji okružuje rs1447295 (region 8q24) imala uticaj na rezultate izvršene genotipizacije korišćenjem metode RFLP.

Pored metodoloških nedostataka, odsustvo Hardy-Vajnbergove ravnoteže može biti posledica određenih pojava u samoj populaciji koja je predmet analize. Pojedini autori kao razlog odstupanja navode i pojave kao što su ukrštanja u srodstvu u okviru analizirane populacije, stratifikacija populacije ili selekcija (222).

Pri poređenju učestalosti genotipova bolesnika sa KP i muškaraca iz kontrolne grupe uočena je statistički značajna razlika za rs1447295 (region 8q24). Rezultati naše studije pokazuju da je pojava alela A asocirana sa smanjenim rizikom za razvoj KP, odnosno da nosioci alela A rs1447295 imaju 10 puta manji rizik za razvoj KP od nosioca genotipa CC. Ipak, zbog odsustva Hardy-Vajnbergove ravnoteže u grupi bolesnika sa BPH i grupi zdravih muškaraca, rezultati za rs1447295 (region 8q24) ne mogu se smatrati pouzdanim i mogu delimično objasniti neslaganje sa rezultatima drugih studija.

Rezultati GWAS i replikativnih studija slučajeva i kontrola (eng. *case-control studies*) pokazale su asocijaciju genotipova CA i AA sa povišenim rizikom za razvoj KP (143, 224). Do istog rezultata došle su i studije rađene u azijskim populacijama kao što su tajlandska (225), japanska (141, 226) i koreanska (227), kao i u američkim populacijama bez obzira da li su analizirani muškarci bili Amerikanci evropskog ili afričkog porekla (228-235). Da su genotipovi CA i AA rs1447295 u asocijaciji sa rizikom za razvoj KP pokazale su i studije asocijacije rađene u francuskoj (236), švedskoj (139), ruskoj (237) i poljskoj populaciji (238), kao i meta-analiza rađena na većem broju evropskih populacija (239).

Međutim, studije drugih autora rađene kako u populaciji Amerikanaca afričkog (240) tako i evropskog porekla (241) nisu potvrdile statističku značajnost asocijacije alela A rs1447295 (region 8q24) sa rizikom za razvoj KP. Statistička značajnost nije pokazana ni u studijama asocijacije rađenim u zapadno afričkim populacijama (Nigerija, Kamerun i Jamajka) (242) i populaciji Singapura (243). Kada su evropske populacije u

pitanju, asocijacije alela A rs1447295 (region 8q24) sa rizikom za razvoj KP nije pokazana u holandskoj populaciji (244).

Poređenjem učestalosti genotipova genetičke varijante rs4242382 (region 8q24) između grupe bolesnika sa KP i bolesnika sa BPH, dobijena je statistička značajnost asocijacije alela A sa rizikom za razvoj KP. Pokazano je da nosioci genotipova AA i AG, imaju skoro dva puta veći rizik za razvoj KP od nosioca genotipa GG. Pokazan je i trend asocijacije ove SNV sa rizikom za razvoj KP, kada su poređene grupa bolesnika sa KP i grupa zdravih muškaraca (kontrolna grupa).

Dobijeni rezultati saglasni su sa rezultatima studija asocijacije rs4242382 (region 8q24) sa rizikom za razvoj KP u švedskoj (139) i francuskoj populaciji (236). Isti rezultati su dobijeni i u populacijama Amerikanaca evropskog porekla (232, 234, 245) kao i u populaciji Tajvana (246). U svim ovim studijama kontrolnu grupu činili su zdravi muškarci bez znakova bolesti prostate. Pouzdanost dobijenih rezultata potvrđena je i meta-analizom koja je obuhvatala evropske, američke i azijske populacije (143).

Studije asocijacije rs6983267 (region 8q24) sa rizikom za razvoj KP u švedskoj (139), ruskoj (237) i grčkoj populaciji (247) pokazale su da muškarci sa genotipom TT imaju smanjen rizik za razvoj KP. Da genotip TT smanjuje rizik za razvoj KP potvrđuje i naša studija asocijacije rađena u grupi bolesnika iz populacije Srbije. Isti rezultati dobijeni su i u studijama slučajeva i kontrola rađenim u populacijama Amerikanca evropskog (229, 231, 232, 234) latino-američkog (248) i afričkog porekla (249). Protektivnu ulogu genotipa TT ove genetičke varijante za razvoj KP potvrđuju i meta-analize rađene na osnovu rezultata brojnih studija koje su obuhvatale evropske i američke populacije (143,239).

U azijskim i afričkim populacijama, studije asocijacije rs6983267 (region 8q24) sa rizikom za razvoj KP nisu pokazale protektivnu ulogu alela T. Do sada su ove studije asocijacije rađene u populacijama Singapura (243), Koreje (227), Tajvana (246) i populacijama zapadne Afrike (Nigerija, Kamerun i Jamajka) (240, 242).



Kada su, u okviru naše studije, upoređivane učestalosti genotipova genetičke varijante rs7017300 (region 8q24) između grupa bolesnika sa KP i BPH, pokazana je asocijacija ovog polimorfizma sa rizikom za razvoj KP. Nosioci genotipova CC i CA imaju viši rizik za razvoj KP u odnosu na nosioce genotipa AA.

Identičan rezultat dobijen je i u studiji asocijacije rađene u švedskoj populaciji (139). Ovi rezultati potvrđeni su i GWAS Xu i saradnika (2011. godine) koja je rađena na populacijama Amerikanaca evropskog i afričkog porekla. U okviru ove GWAS za još 31 od 800 analiziranih SNP pokazana je statistički značajna asocijacija sa rizikom za razvoj KP (249).

Poslednja SNV iz regiona 8q24 analizirana u ovoj studiji bila je rs7837688. Statistički značajna razlika u učestalostima genotipova ove genetičke varijante utvrđena je između grupe bolesnika sa KP i kontrolne grupe zdravih muškaraca. Na osnovu rezultata naše studije može se zaključiti da muškarci sa genotipom GT imaju 2,4 puta veći rizik za razvoj KP od muškaraca sa homozigotnim genotipovima.

I druge studije asocijacije pokazale su da alel T rs7837688 (region 8q24) povećava rizik za razvoj KP. Takvi rezultati dobijeni su u populacijama Švedske (139), Velike Britanije i Australije (250), među Amerikancima evropskog porekla (77, 137, 232, 234, 248, 251) i Latinoamerikancima (248), ali ne i među Amerikancima afričkog porekla (251).

Do sada se region hromozoma 8q24 razmatrao kao region u kome se nalaze genetičke varijante čiji su aleli i genotipovi u asocijaciji sa rizikom za razvoj KP. Analizom tkiva prostate dobijenih od bolesnika sa KP, nakon učinjene radikalne prostatektomije, detektovana je pojava amplifikacije regiona 8q24. Ova amplifikacija je u korelaciji sa ekspresijom onkogeno *c-myc* i kao takva predstavlja genetički marker agresivnijih oblika KP. Zato se amplifikacija regiona 8q24, danas definiše kao genetički marker koji je u asocijaciji sa rizikom za progresiju KP (252).

Jedna od prvih GWAS koja je za temu imala identifikaciju SNP koji su povezani sa rizikom za razvoj KP urađena je od strane Gudmundsson i saradnika 2007. godine. U grupi od 1.501 bolesnika sa KP i 11.209 zdravih muškaraca sa Islanda identifikovane su dve genetičke varijante (rs7501939 i rs3760511) u hromozomskom regionu 17q12 povezane sa rizikom za razvoj KP (154). Nakon brojnih drugih GWAS i studija slučajeva i kontrola, pored regiona 8q24, region 17q12 ostao je najznačajniji region asociiran sa rizikom za razvoj KP. Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio je utvrđivanje moguće asocijacije ove dve genetičke varijante sa KP u populaciji Srbije.

Većina od pomenutih studija pokazuje asocijaciju alela T rs7501939 sa smanjenim rizikom za razvoj KP. To se odnosi na evropske populacije Islanda (154), Holandije (154), Velike Britanije (250) i Švedske (139) kao i na populacije Amerikanaca evropskog i afričkog porekla (82, 151, 153, 155, 253, 254).

I u populaciji Srbije, alel T rs7501939 (region 17q12) asociiran je sa smanjenim rizikom za razvoj KP. Ovaj rezultat dobijen je i kada je upoređivana grupa bolesnika sa KP sa grupom zdravih muškaraca (kontrolna grupa), kao i kada je upoređivana grupa bolesnika sa KP sa grupom bolesnika sa BPH.

Pored naše studije, jedina do sada objavljena studija koja je upoređivala grupu bolesnika sa KP i grupu bolesnika sa BPH, a u cilju utvrđivanja moguće asocijacije rs7501939 (region 17q12) sa rizikom za razvoj KP bila je studija Kim-a i saradnika rađena u populaciji Južne Koreje (156). Rezultati ove studije asocijacije identični su rezultatima naše studije.

Pošto je rs7501939 lociran u prvom intronu gena *HNF1B* (255), pojava različitih alela može imati efekat na ekspresiju ovog gena.

Za drugu analiziranu genetičku varijantu u regionu 17q12, rs3760511, nije utvrđena asocijacija alela i genotipova sa rizikom za razvoj KP u analiziranoj grupi bolesnika sa teritorije Republike Srbije.

Ovaj rezultat u suprotnosti je sa rezultatima studija asocijacija ove genetičke varijante rađenih u evropskim populacijama. Naime, u njima je pokazana asocijacija alela C sa povećanim rizikom za razvoj KP (139, 154).

Objašnjenje za dobijene rezultate u našoj studiji koji su u koliziji sa rezultatima drugih studija može se naći ili u inerpopulacijskim razlikama efekta analizirane SNV. Pored toga, na rezultate naše studije efekat može imati i broj analiziranih bolesnika. Zato nastavak studije asocijacije rs3760511 (region 17q12) sa KP na većoj grupi bolesnika iz populacije Srbije ima svoju naučnu opravdanost.

KP u molekularno-biološkom smislu predstavlja vrlo heterogeno oboljenje. I pored intenzivnih istraživanja mali je broj protein-kodirajućih gena čije su mutacije direktno dovedene u vezu sa razvojem sporadičnih formi KP. Jedan od njih je gen za AR (97). Pored njega, istražuje se i uloga proteinskog produkta genske fuzije *TMPRSS2-ERG* i delecije tumor supresornog gena *PTEN* u patogenezi KP (256, 257). I prve studije asocijacije genetičkih varijanti sa KP odnosile su se na SNP-ove u tumor supresornim genima i genima čiji su proteinski produkti uključeni u procese metabolizma steroida, reparacije molekula DNK, ćelijskog odgovora na oksidativni stres i angiogeneze (258). Jedan od njih je i gen koji kodira endotelijani enzim azot-oksidi sintetazu 3 (*NOS3*) (259).

Studija asocijacije analiziranih genetičkih varijanti u genu *NOS3* sa rizikom za razvoj KP nije dala statistički značajne rezultate. Rezultati naše studije poklapaju se sa rezultatima studija asocijacije rađenim u populacijama Amerikanaca evropskog i afričkog porekla (260) i u populaciji Brazila (178).

Takođe, naša studija asocijacije pokazala je da se manje učestali alel C genetičke varijante rs3918226 (region 7q36) detektuje samo kod muškaraca kod kojih je u genetičkoj varijanti rs2070744 prisutan alel T, što je u skladu sa podacima iz studije rađene u populaciji Brazila (178).

Suprotno ovim rezultatima, nedavna studija asocijacije rađena u populaciji Irana, pokazuje da muškarci sa genotipovima TC i CC rs2070744 (region 7q36) imaju 2,43 puta i 3,62 puta veći rizik za razvoj KP, respektivno (183).

Početak devedesetih godina prošlog veka započela je primena PSA testa u dijagnostici KP. Zahvaljujući primeni PSA testa (određivanje serumske vrednosti PSA kao biohemijskog markera bolesti prostate) i hirurškog lečenja lokalizovanog KP operativnom tehnikom radikalne prostatektomije poslednjih dvadeset godina beleži se značajan trend smanjenja smrtnosti uzrokovane KP (261, 262). Da je PSA test, rađen zbog medicinske indikacije uvećanja volumena prostate, nespecifični standardni prognostički parametar potvrđuje činjenica da se prevalenca KP u biopsijama prostate kreće u granicama od 20 do 40% (263). I pored toga što povećanje serumske vrednosti PSA nije specifično za KP, već za bolesti prostate, PSA test je i dalje standardni prognostički parametar KP (264). Primena PSA testa omogućila je i dijagnostiku asimptomatskih KP (265).

Pored značaja u ranoj dijagnostici, povećanje serumske vrednosti PSA predstavlja i biohemijski marker progresije KP. Zbog toga PSA test ima primenu i u praćenju odgovora bolesnika na primenjenu hormonsku ili hiruršku terapiju kao prognostički parametar progresije KP (266).

Od 1974. godine, u upotrebi je GGS kao pokazatelj histološke diferencijacije KP. Iako su tokom nekoliko decenija upotrebe, uočeni određeni nedostaci, GGS i dalje predstavlja standardni prognostički parametar progresije KP koji ima primenu i u proceni modaliteta lečenja bolesnika sa KP (267, 268).

Na kraju, najpouzdaniji standardni prognostički parametar KP predstavlja klinički stadijum primarnog tumora (T) definisan na osnovu kriterijuma TNM klasifikacije čija je poslednja revizija objavljena 2010. godine od strane Američkog komiteta za maligne bolesti (eng. *American Joint Committee on Cancer/Union Internationale Contre le Cancer*, AJCC / UICC) (64).

Zbog nedostataka standardnih prognostičkih parametara, SNV predstavljaju glavne predmete istraživanja koja za cilj imaju otkriće nestandardnih prognostičkih parametara. Genetičke varijante kao nestandardni prognostički parametri bi se samostalno ili u kombinaciji sa standardnim prognostičkim parametrima koristile u dijagnostici i lečenju KP (269, 270).

U našoj studiji, od 13 analiziranih SNV za samo dve pokazana je asocijacija sa standardnim prognostičkim parametrima KP. Za genetičku varijantu rs3760511 u regionu 17q12 pokazana je asocijacija sa GGS, a za rs1799983 u egzonu 7 gena *NOS3* sa serumskim vrednostima PSA.

Poređenjem učestalosti genotipova bolesnika sa KP kojima je zbirni Glison gradus manji od 7 i bolesnika kojima je zbirni Glison gradus 7 pokazano je da bolesnici koji poseduju homozigotni genotip GG rs3760511 (region 17q12) imaju 14 puta manji rizik za dobijanje KP čija se histološka diferencijacija opisuje zbirnim GG 7 od onih koji poseduju alel T. Poređenje raspodela genotipova kod bolesnika sa zbirnim GG manjim od 7 i grupe bolesnika sa zbirnim GG većim od 7 nije pokazalo statistički značajnu asocijaciju. Ipak, recesivni model, koji prema AIC skorom najbolje opisuje uočene razlike, pokazuje statistički trend asocijacije genotipa GG sa zbirnim GG većim od 7.

Prema PubMed bazi podataka do danas nisu rađene studije asocijacije genetičke varijante rs3760511 sa standardnim prognostičkim parametrima KP uključujući i GGS.

Do sada je ispitivana asocijacija SNV rs7501939 (region 17q12) sa standardnim prognostičkim parametrima KP u grupama bolesnika iz populacije Aškenazi Jevreja (271) i u populaciji Amerikanaca afričkog porekla (253). Rezultati obe studije nisu utvrdili postojanje statistički značajne asocijacije ove genetičke varijante sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP. Dobijeni rezultati su u korelaciji i sa rezultatima naše studije asocijacije rs7501939 sa standardnim prognostičkim parametrima KP.

Rezultati naše studije pokazali su da je genetička varijanta rs1799983 (region 7q36) asocirana sa serumskim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP i to na osnovu poređenja raspodele genotipova kod bolesnika čija je serumska vrednost PSA bila  $\leq 10$  ng/ml i bolesnika čija je serumska vrednost PSA bila  $\geq 20$  ng/ml. Bolesnici koji su nosioci alela T analizirane genetičke varijante imaju upola manji rizik da im serumska vrednost PSA bude  $\geq 20$  ng/ml u odnosu na bolesnike sa homozigotom GG rs1799983. Na osnovu rezultata ove studije, dalja istraživanja asocijacije rs1799983 sa serumskim vrednostima PSA u grupi sa većim brojem bolesnika sa KP ima svoju naučnu opravdanost.

U populaciji Irana ispitivana je moguća asocijacija ove genetičke varijante sa standardnim prognostičkim parametrima KP ali nije pokazana asocijacija ni sa GGS ni sa serumskim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP (183).

Istovremeno, ispitivanje asocijacije rs1799983 (region 7q36) sa rizikom za razvoj KP u našoj grupi bolesnika nije dalo statistički značajne rezultate. Ovi rezultati identični su rezultatima jedine studije asocijacije ove genetičke varijante sa KP rađenoj u evropskoj populaciji (populaciji Portugala) (182). Isti rezultati dobijeni su i studijama asocijacije rađenim u severnoameričkim populacijama (168, 260), brazilskoj populaciji (175) i populaciji Irana (183).

Studija asocijacije genetičkih varijanti u regionu 8q24 sa standardnim prognostičkim parametrima KP u našoj grupi bolesnika nije dala statistički značajne rezultate. Do istih rezultata došlo se i u studijama asocijacije rađenim u populacijama Švedske (139), Amerikanaca evropskog (233, 245) i afričkog porekla (228).

Malobrojne su studije asocijacije genetičkih varijanti u regionu 8q24 sa standardnim prognostičkim parametrima KP koje su dale statistički značajne rezultate. U grupi bolesnika iz francuske populacije pokazana je statistički značajna asocijacija alela A genetičke varijante rs1447295, kao i alela A genetičke varijante rs4242382, sa povišenim serumskim vrednostima PSA (243).

Asocijacija alela A rs1447295 (region 8q24) sa zbirnim GG većim od 7 pokazana je u populaciji Amerikanaca evropskog porekla (138) i u grupi bolesnika poreklom iz Japana (226). Na kraju, u populaciji Singapura pokazana je asocijacija alela G genetičke varijante rs6983267 sa T3 i T4 kliničkim stadijumom KP (243).

Zahvaljujući novim dijagnostičkim procedurama, KP predstavlja redak maligni tumor koji se može dijagnostikovati i u stadijumu bolesti koji ne zahteva radikalno lečenje. Poznato je da hirurško lečenje KP može uzrokovati postoperativne komplikacije kao što su inkontinencija (gubitak voljne kontrole mokrenja) i/ili erektilna disfunkcija (impotencija). Ove postoperativne komplikacije imaju negativan efekat na kvalitet života bolesnika sa KP nakon hirurškog lečenja (51,52).

Imajući ovo u vidu, otkriće novih prognostičkih markera rizika za progresiju KP bilo bi od pomoći i u rešavanju diferencijalno dijagnostičke dileme agresivnog KP *versus* KP koji je posledica preterane dijagnoze. Idealne kandidate i za ove prognostičke markere predstavljaju SNV, ali one za koje se pokaže da su asociirane sa rizikom za progresiju KP. Pravilna i precizna procena rizika za progresiju KP imala bi praktičnu primenu i u pouzdanijem odabiru adekvatne terapije (praćenje bolesnika *versus* hormonska terapija *versus* hirurško lečenje) za svakog bolesnika sa KP ponaosob.

Za dve od 13 analiziranih SNV pokazana je asocijacija sa rizikom za progresiju KP. To su rs3760511 iz regiona 17q12 i rs3918226 iz promotorskog regiona gena *NOS3*.

Rezultati naše studije pokazali su da nosioci genotipa TG rs3760511 (region 17q12) iz grupe analiziranih bolesnika sa KP imaju 2,25 puta veći rizik za progresiju KP i to kada je rizik za progresiju KP procenjivan prema preporukama Medeiros-a i saradnika (182) u odnosu na bolesnike sa genotipom TT. Kada su bolesnici sa KP selektovani u grupe sa različitim rizikom za progresiju KP prema preporukama D'Amico-a i saradnika (192), uočena asocijacija imala je statistički trend prema recesivnom modelu ispitivanja.

Studije asocijacije rs3760511 (region 17q12) sa rizikom za progresiju KP rađene su kod bolesnika u većem broju evropskih populacija (Francuska, Norveška, Švedska, Danska, Grčka, Italija, Holandija, Španija, Velika Britanija) (151), populaciji Amerikanaca evropskog porekla (151), kao i u populaciji Južne Koreje (156). Rezultati ni jedne od ovih studija nisu pokazali statistički značajnu asocijaciju ove genetičke varijante sa rizikom za progresiju KP, kao ni sa pojavom metastaza.

Poređenjem učestalosti genotipova rs3918226 (region 7q36) u grupama bolesnika sa srednjim i visokim rizikom za progresiju KP prema preporukama D'Amico-a i saradnika (192) pokazano je da bolesnici koji su nosioci alela T imaju 5 puta niži rizik za razvoj KP sa visokim rizikom za progresiju KP u odnosu na bolesnike sa genotipom CC. Pored toga, manje učestali alel T ima i protektivnu ulogu za pojavu metastaza. Rezultati su pokazali da u analiziranoj grupi bolesnika sa KP, nosioci ovog alela imaju 4 puta manji rizik za pojavu metastaza.

Studija u grupi bolesnika sa KP iz populacije Srbije prva je studija asocijacije koja je pokazala asocijaciju alela T genetičke varijante rs3918226 sa rizikom za progresiju KP.

Pored statističke značajne asocijacije dve SNV sa rizikom za progresiju KP, rezultati naše studije pokazali su statistički trend asocijacije rs7501939 (region 17q12) i rs1799983 (region 7q36) sa rizikom za progresiju KP.

Do sada ni jedna studija asocijacije rađena u grupama bolesnika sa KP evropskog porekla (uključujući i Amerikance evropskog porekla) nije pokazala statistički značajnu asocijaciju rs7501939 (region 17q12) sa rizikom za progresiju KP (151). Odsustvo statistički značajne razlike pokazano je i u studiji asocijacije u grupi bolesnika iz populacije Amerikanaca afričkog porekla (253).

Prethodne studije asocijacije rs1799983 (region 7q36) sa rizikom za progresiju KP u grupi bolesnika iz Portugala (182) i Brazila (175) nisu dale statistički značajne rezultate. Jedina studija u kojoj je do sada pokazana statistički značajna asocijacija ove



genetičke varijante sa rizikom za progresiju KP bila je studija rađena u iranskoj populaciji (183). Međutim, u portugalskoj populaciji pokazana je statistički značajna asocijacija genotipa GG rs1799983 sa pojavom metastaza (182).

Pored SNV rs1799983, rezultati naše studije pokazuju statistički trend asocijacije manje učestalog alela C rs2070744 (region 7q36) sa smanjenim rizikom za pojavu metastaza u analiziranoj grupi bolesnika sa KP. Pojava manje učestalog alela C ove genetičke varijante asocirana je sa povišenim nivoom transkripata gena *NOS3* u perifernoj krvi bolesnika sa KP. To je pokazala studija rađena u grupi bolesnika iz populacije Brazila kod kojih je takođe pokazana i statistički značajna asocijacija SNV rs2070744 (region 7q36) sa rizikom za progresiju KP (178).

U našoj grupi bolesnika sa KP, nije pokazana statistički značajna asocijacija analiziranih SNV iz regiona 8q24 sa rizikom za progresiju bolesti. Dobijeni rezultati su u suprotnosti sa studijama asocijacije rađenim u američkim populacijama. Statistički značajna asocijacija alela A rs1447295 sa rizikom za progresiju KP pokazana je i u populaciji Amerikanaca evropskog (233) i afričkog porekla (235). Statistički trend registrovan je u populaciji Poljske (238).

Rezultati studije asocijacije odabranih SNV u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa rizikom za progresiju KP mogli bi biti upotrebljeni i za meta-analizu koja bi za cilj imala pouzdaniju identifikaciju genetičkih varijanti asociranih sa agresivnijom formom KP. Jedina do sada objavljena meta-analiza za cilj je imala ispitivanje moguće asocijacije samo dva SNP (rs11672691 i rs 11704416) sa agresivnijim formama KP. Rezultati ove meta-analize pokazali su da se rs11672691 lociran u regionu 19q13 može smatrati lokusom povezanim sa agresivnijim formama KP (272).

Urađena studija asocijacija podrazumevala je i upoređivanje grupe bolesnika sa BPH i grupe muškaraca bez znakova bolesti prostate. Poređenjem ove dve grupe muškaraca sa teritorije Republike Srbije, utvrđeno je da su genetičke varijante rs1447295 (region 8q24), rs7501939 i rs3760511 (region 17q12) povezane sa rizikom za razvoj BPH u populaciji Srbije.

Poređenjem raspodele genotipova genetičke varijante rs1447295 (region 8q24) u grupi bolesnika sa BPH i kontrolne grupe pokazana je asocijacija manje učestalog alela A sa smanjenim rizikom za razvoj BPH. Smanjeni rizik za razvoj BPH pokazan je i za muškarce koji poseduju manje učestali alel T genetičke varijante rs7501939 (region 17q12). Kada je genetička varijanta rs3760511 (region 17q12) u pitanju, utvrđeno je da muškarci sa genotipom TG imaju 1,69 puta veći rizik za razvoj BPH u odnosu na muškarce koji poseduju homozigotne genotipove.

Dobijeni rezultati ne mogu se upoređivati sa drugim populacijama, jer do sada nisu objavljivane studije asocijacije analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj BPH. Iz tog razloga, potrebno je nastaviti ovu studiju asocijacije u većoj grupi bolesnika sa BPH. Preliminarni rezultati ukazuju da bi genetička varijanta rs3760511 (region 17q12), za koju nije pokazana asocijacija sa KP u populaciji Srbije, mogla predstavljati nestandardni prognostički parametar za procenu rizika za razvoj BPH.

Jedna od glavnih primedbi koja se odnosi na ulogu GWAS u istraživanju patogeneze malignih i drugih bolesti čoveka odnosi se i na nizak nivo utvrđenih asocijacija identifikovanih SNP sa rizikom za razvoj bolesti (273). Međutim, treba imati u vidu da na vrednost odnosa verovatnoće, odnosno njeno smanjenje, utiče i efekat tzv. kontaminacije kontrolne grupe potencijalnim budućim bolesnicima. To se naročito odnosi na KP kao malignu bolest koja ima visoku incidencu u starijem životnom dobu muškaraca. Drugi problem GWAS odnosi se na populacionu heterogenost kontrolnih grupa. Kako su GWAS masivne po broju ispitanika i obuhvataju bolesnike iz velikog broja medicinskih centara iz više zemalja tako je i kontrolna grupa sačinjena od velikog broja zdravih individua iz različitih populacija. Danas preovladava mišljenje da kontrolne grupe koje se definišu kao evropska populacija ili Amerikanci evropskog porekla zapravo predstavljaju miks različitih etničkih „podgrupa“. Takav u suštini heterogen sastav kontrolnih grupa GWAS, ima efekat i na dobijene male vrednosti odnosa verovatnoća za analizirane SNP (274).

U svetlu ovih saznanja o objektivnim ograničenjima GWAS, replikativne studije slučajeva i kontrola rađene na manjem broju ispitanika, ali sa homogenom kontrolnom

grupom, dobijaju na svom značaju. Naime, studije asocijacije sa homogenim kontrolnim grupama mogu dati precizniji odgovor na pitanje koji je stvarni odnos verovatnoća analiziranog „rizičnog“ lokusa sa određenom bolešću.

Replikativne studije slučajeva i kontrola imaju značaj i zbog populacijskih razlika u doprinosu analizirane genetičke varijante riziku za razvoj određene bolesti čoveka (130, 135). S tim u vezi, studija asocijacije odabranih SNV sa KP u grupi bolesnika sa teritorije Republike Srbije ima svoju naučnu opravdanost.

Najveći broj studija genetičke asocijacije, uključujući i GWAS, potencijalne efekte genetičkih varijanti na razvoj i/ili progresiju bolesti razmatra nezavisno od efekata drugih varijanti. Međutim, epistatički odnosi između gena smatraju se značajnim činiocem u determinisanju predispozicije za razvoj kompleksnih bolesti, uključujući i maligne. Usled prisustva genskih interakcija, od izuzetnog značaja za razumevanje procesa koji su u osnovi patogeneze kompleksnih bolesti su analize koje uključuju testiranje zajedničkih efekata različitih varijanti na razvoj određene bolesti. Naime, pristup zasnovan na nezavisnoj analizi pojedinačnih lokusa i utvrđivanju razlika u učestalostima alela i genotipova u grupama ispitanika sa određenim fenotipom i kontrolnim grupama može dovesti do nemogućnosti detekcije varijanti sa malim ili marginalno značajnim pojedinačnim efektima, ali sa izraženim zajedničkim doprinosom predispoziciji za razvoj fenotipa od interesa koji je zasnovan na njihovoj međusobnoj interakciji (275).

Dosadašnje malobrojne analize nisu pružile nedvosmislene dokaze prisustva asocijacije epistatičkih odnosa između genetičkih varijanti i rizika za razvoj KP (276-278). Ovi rezultati mogu se objasniti relativno malim brojem analiziranih lokusa, usled tehničkih ograničenja računarskih sistema i složenosti algoritama, kao i razlikama u primenjenim algoritmima i statističkim pristupima. Stoga, eventualne analize sprovedena na drugim setovima genetičkih varijanti, ali i u drugim populacijama, mogle bi dovesti do identifikacije novih interakcija sa potencijalnim efektom na rizik za razvoj i/ili progresiju KP.

Doprinos nastavka istraživanja asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP i njihove epistatičke interakcije je i u definisanju panela minimalnog broja SNV za čije alele ili genotipove je pokazana snažna asocijacija sa KP i koji bi se kao takvi koristili kao nestandardni prognostički parametri u dijagnostici i praćenju ove bolesti. Dalja istraživanja funkcionalne uloge ovih SNV bila bi od pomoći i u otkriću novih bioloških molekula koji bi vodili razvoju novih pristupa u terapiji. Na kraju, genetički markeri za koje se pokaže asocijacija sa KP mogli bi biti od koristi i u medicinskoj prevenciji KP.

## 5. Zaključci

Studija asocijacije genetičkih varijanti u regionima 7q36, 8q24 i 17q12 sa rizikom za razvoj i progresiju karcinoma prostate (KP) u populaciji Srbije dala je sledeće statistički značajne rezultate:

- a. Alel A genetičke varijante rs1447295 deset puta smanjuje rizik za razvoj KP.
- b. Alel A genetičke varijante rs4242382 dva puta povećava rizik za razvoj KP.
- c. Alel T genetičke varijante rs6983267 smanjuje rizik za razvoj KP oko tri puta.
- d. Alel C genetičke varijante rs7017600 povećava rizik za razvoj KP.
- e. Genotip GT genetičke varijante rs7837688 preko dva puta povećava rizik za razvoj KP.
- f. Alel T genetičke varijante rs7501939 za polovinu smanjuje rizik za razvoj KP.
- g. Genotip GG genetičke varijante rs3760511 14 puta umanjuje rizik za dobijanje KP čija se histološka diferencijacija opisuje zbirnim Glison gradusom (GGS) 7.
- h. Alel T genetičke varijante rs1799983 za polovinu smanjuje rizik da serumska vrednost PSA bude  $\geq 20$  ng/ml.
- i. Genotip TG genetičke varijante rs3760511 dva puta povećava rizik za progresiju KP, kada se rizik za progresiju bolesti procenjivao prema kriterijumima Medeirosa i saradnika.
- j. Alel T genetičke varijante rs3918226 pet puta smanjuje rizik za progresiju KP, kada se rizik za progresiju bolesti procenjivao prema kriterijumima D'Amica i saradnika.
- k. Alel T genetičke varijante rs3918226 četiri puta smanjuje rizik za pojavu metastaza.

Rezultati ove studije pokazali su naučnu opravdanost studije slučajeva i kontrola u populaciji Srbije. Doprinos nastavka istraživanja asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP je u definisanju panela minimalnog broja SNV koji bi se koristili kao nestandardni prognostički parametri u dijagnostici i kliničkom praćenju bolesnika sa KP.

## 6. Literatura

1. Gray H. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. 40th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2008.
2. Leissner KH, Tisell LE. The weight of the human prostate. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1979; 13(2):137–42.
3. Juretić A, Marušić A, Ježek D, Šarić N, Bašić-Koretić M, Bišof V. Anatomija, histologija, embriologija i fiziologija prostate. In: Šamija M ed. Rak prostate – najvarijabilniji zloćudni tumor. Zagreb: Medicinska naklada i hrvatsko onkološko društvo. 2010. pp.1-20.
4. McNeal JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res* 1984; 145:27–53.
5. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. WHO Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, 6. edition, Lyon: IARC Press, 2004.
6. Li R, Guo Y, Han BM, Yan X, Utleg AG, Li W , Tu LC, Wang J, Hood L, Xia S, Lin B. Proteomics cataloging analysis of human expressed prostatic secretions reveals rich source of biomarker candidates. *Proteomics Clin Appl.* 2008; 2 (4):543-55.
7. Burden HP, Holmes CH, Persad R, Whittington K. Prostatasomes-their effects on human male reproduction and fertility. *Hum Reprod Update.* 2006; 12 (3):283-92.
8. Vukotić V. Dijagnostičkih proces premalignih lezija i karcinoma prostate. In: Cerović S, Brajušković G, Vukotić V eds. Premaligne lezije i karcinom prostate. Beograd: IP Beograd doo. 2009. pp. 103-23.
9. Giovannucci E. Medical history and etiology of prostate cancer. *Epidemiol Rev* 2001; 23 (1):159-62.
10. Lipsky BA, Byren I, Hoey CT. Treatment of Bacterial Prostatitis. *Clin Infect Dis.* 2010; 50(12):1641-52.
11. Naber KG. Prostatitis. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(Suppl 6):132-4.

12. Wagenlehner FM, Naber KG, Bschiepfer T, Brähler E, Weidner W. Prostatitis and male pelvic pain syndrome: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2009; 106(11):175-83.
13. Gurunadha Rao Tunuguntla HS, Evans CP. Management of prostatitis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002; 5(3):172-9.
14. Krieger JN, Lee SW, Jeon J, Cheah PY, Liong ML, Riley DE. Epidemiology of prostatitis. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:S85-S90.
15. Nickel JC. Inflammation and Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am* 2008; 35 (1):109-15.
16. Issa MM, Regan TS. Medical Therapy for Benign Prostatic Hyperplasia- Present and Future Impact. *Am J Manag Care* 2007; 13 (Suppl 1):S4-S9.
17. Levy A, Samraj JP. Benign prostatic hyperplasia: When to 'watch and wait,' when and how to treat. *Cleve Clin J Med* 2007; 74 (Suppl 3):S15-S20.
18. Connolly SS, Fitzpatrick JM. Medical treatment of benign prostatic hyperplasia. *Postgrad Med J* 2007; 83 (976):73-8.
19. Emberton M, Cornel EB, Bassi PF, Fourcade RO, Gómez JM, Castro R. Benign prostatic hyperplasia as a progressive disease: a guide to the risk factors and options for medical management. *Int J Clin Pract* 2008; 62 (7):1076-86.
20. Bushman W. Etiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2009; 36 (4):403-15.
21. Wang W, Bergh A, Damber JE. Chronic inflammation in benign prostatic hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in glandular epithelium. *Prostate.* 2004; 61(1):60-72.
22. Kyprianou N, Tu H, Jacobs SC. Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol.* 1996; 27(7): 668-75.
23. Wilt TJ, N'Dow J. Benign prostatic hyperplasia. Part 1-Diagnosis. *BMJ* 2008; 336(7636):146-9.
24. Garg G, Singh D, Saraf S, Saraf S. Management of Benign Prostate Hyperplasia: An Overview of  $\alpha$ -Adrenergic Antagonist. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(8):1554-8.
25. Patel AK, Chapple CR. Benign prostatic hyperplasia: treatment in primary care. *BMJ* 2006; 333(7567):535-9.

26. Godoy G, Taneja SS. Contemporary clinical management of isolated high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2008; 11(1):20-31.
27. Feneley MR, Busch C. Precursor lesions for prostate cancer. *J R Soc Med* 1997; 90(10):533-9.
28. Dickinson SI. Premalignant and malignant prostate lesions: pathologic review. *Cancer Control* 2010; 17(4):214-22.
29. Pickup M, Van Der Kwast TH. My approach to intraductal lesions of the prostate gland. *J Clin Pathol* 2007; 60(8):856-65.
30. McNeal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol.* 1986;17:64-71.
31. Bostwick DG, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2004; 17(3):360-79.
32. Davidson D, Bostwick DG, Qian J, Wollan PC, Oesterling JE, Rudders RA, et al. Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: Predictive accuracy in needle biopsies. *J Urol.* 1995; 154:1295-99.
33. Vukotić V. Klinički značaj detektovanih premalignih promena u prostati. In: Cerović S, Brajušković G, Vukotić V, eds. *Premaligne Lezije i Karcinom Prostate*. Beograd: IP Beograd d.o.o.; 2009. pp.125-34.
34. Grignon DJ. Unusual subtypes of prostate cancer. *Mod Pathol.* 2004; 17:316-27.
35. Strnad M, Šamija M. Epidemiologija raka prostate. In: In: Šamija M ed. *Rak prostate – najvarijabilniji zloćudni tumor*. Zagreb: Medicinska naklada i hrvatsko onkološko društvo. 2010. pp.21-37.
36. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19(8):1893-907.
37. Cancer Registry of Central Serbia, Institute of Public Health of the Republic of Serbia 1999-2009. Available at: <http://www.batut.org.rs/> Accessed: March 2, 2012.
38. Brawley OW. Prostate cancer epidemiology in the United States. *World J Urol.* 2012; 30(2):195-200.



39. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol.* 2012; 30(2):143-8.
40. Aus G, Robinson D, Rosell J, Sandblom G, Varenhorst E. Survival in prostate carcinoma –outcomes from a prospective, population-based cohort of 8887 men with up to 15 years of follow-up: Results from three countries in the population-based National Prostate Cancer Registry of Sweden. *Cancer.* 2005; 103:943–51.
41. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010; 24(18):1967-2000.
42. Stanford JL, Ostrander EA. Familial prostate cancer. *Epidemiol Rev.*2001; 23(1):19-23.
43. Rowley KH, Mason MD. The aetiology and pathogenesis of prostate cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 1997; 9(4):213-8.
44. Mordukhovich I, Reiter PL, Backes DM, Family L, McCullough LE, O'Brien KM, Razzaghi H, Olshan AF. A review of African American-white differences in risk factors for cancer: prostate cancer. *Cancer Causes Control.* 2011; 22(3): 341-57.
45. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett* 2010; 293(2):133-43.
46. Gathirua-Mwangi WG, Zhang J. Dietary factors and risk for advanced prostate cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2013. *In press.*
47. Ghai S, Toi A. Role of transrectal ultrasonography in prostate cancer. *Radiol Clin North Am.* 2012; 50(6):1061-73.
48. Schroeder JE, Barzilay Y, Hasharoni A, Kaplan L, Cohen JE, Itshayek E. Evaluation and Management of Lower Back Pain in Oncological Patients. In: Yoshihito Sakai ed. *Low Back Pain Pathogenesis and Treatment. In Tech.* 2012; pp.91-112.
49. Brawer MK. Screening and early detection of prostate cancer will decrease morbidity and mortality from prostate cancer: the argument for. *Eur Urol.* 1996; 29(Suppl 2):19-23.
50. Schröder FH, Gosselaar C, Roemeling S, Postma R, Roobol MJ, Bangma CH. PSA and the detection of prostate cancer after 2005. Part I. *EAU-EBU Update Series* 2006; 4:2–12.

51. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, Feuer E, de Koning H. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101(6):374-83.
52. Coleman MP, Alexe D-M, Albrecht T, McKee M eds. Responding to the challenge of cancer in Europe. European Observatory, Institute of Public Health of the Republic of Slovenia, Ljubljana, 2008.
53. Rassweiler J, Rassweiler MC, Kenngott H, Frede T, Michel MS, Alken P, Clayman R. The past, present and future of minimally invasive therapy in urology: A review and speculative outlook. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2013; 22(4):200-9.
54. Cerović S. Parametri agresivnosti karcinoma prostate. In: Cerović S, Brajušković G, Vukotić V, eds. *Premaligne Lezije i Karcinom Prostate.* Beograd: IP Beograd d.o.o.; 2009. pp. 8-22.
55. Tosoian J, Loeb S. PSA and beyond: the past, present, and future of investigative biomarkers for prostate cancer. *ScientificWorldJournal* 2010; 10:1919-31.
56. Kouriefs C, Sahoyl M, Grange P, Muir G. Prostate specific antigen through the years. *Arch Ital Urol Androl.* 2009; 81(4):195-8.
57. Klein EA, Platz EA, Thompson IM. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Kavoussi LR, Novic AC, Partin AW, Peters CA, eds. *Campbell-Walsh Urology.* Philadelphia: Saunders; 2007. pp.2854-73.
58. Reljić A. Klinička slika i dijagnostika raka prostate In: Šamija M ed. *Rak prostate – najvarijabilniji zloćudni tumor.* Zagreb: Medicinska naklada i hrvatsko onkološko društvo. 2010. pp 69-74.
59. Zhang HF, Wang HL, Xu N, Li SW, Ji GY, Li XM, Pan YZ, Zhang L, Zhao XJ, Gao HW. Mass screening of 12,027 elderly men for prostate carcinoma by measuring serum prostate specific antigen. *Chin Med J (Engl).* 2004; 117(1):67-70.
60. Reissigl A, Klocker H, Pointner J, Fink K, Horninger W, Ennemoser O, Strasser H, Colleselli K, Hörtl L, Bartsch G. Usefulness of the ratio free/total prostate-specific antigen in addition to total PSA levels in prostate cancer screening. *Urology.* 1996; 48 (6A):62-6.

61. Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J Androl* 2009; 11(1):74-80.
62. Katz A, Katz A. The top 13: what family physicians should know about prostate cancer. *Can Fam Physician* 2008; 54 (2):198-203.
63. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F; European Association of Urology. EAU Guidelines on Prostate Cancer. *European Urology* 2008; 53:68–80.
64. Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology* 2012; 60:87–117.
65. Buhmeida A, Pyrhönen S, Laato M, Collan Y. Prognostic factors in prostate cancer. *Diagnostic Pathology* 2006; 1(4):1-15.
66. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F; European Association of Urology. EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Treatment of Clinically Localised Disease. *Eur Urol* 2011; 59:61-71.
67. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29(9):1228-42.
68. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU International* 2013; 111:753–60.
69. Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, Epstein JI, Humphrey PA, Mikuz G, Newling D, Nilsson S, Sakr W, Srigley JR, Wheeler TM, Montironi R. Prognostic and predictive factors and reporting of prostate carcinoma in prostate needle biopsy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2005; (216):20-33.
70. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology* 2004; 17:292–306.
71. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science.* 1987; 235(4786):305-11.
72. Brajušković G. Molekularna osnova karcinoma prostate. In: Cerović S, Brajušković G, Vukotić V, eds. *Premaligne Lezije i Karcinom Prostate.* Beograd: IP Beograd d.o.o.; 2009. pp. 35-54.
73. Taby R, Issa JPI. Cancer Epigenetics. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:376–92.

74. Karayi MK, Markham AK. Molecular biology of prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2004; 7:6–20.
75. Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, Rafnar T, Bergthorsson JT, Agnarsson BA, Baker A, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Jakobsdottir M, Xu J, Blondal T, Kostic J, Sun J, Ghosh S, Stacey SN, Mouy M, Saemundsdottir J, Backman VM, Kristjansson K, Tres A, Partin AW, Albers-Akkers MT, Godino-Ivan Marcos J, Walsh PC, Swinkels DW, Navarrete S, Isaacs SD, Aben KK, Graif T, Cashy J, Ruiz-Echarri M, Wiley KE, Suarez BK, Witjes JA, Frigge M, Ober C, Jonsson E, Einarsson GV, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Isaacs WB, Catalona WJ, Barkardottir RB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nature Genetics* 2007; 39:631-7.
76. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Guy M, Morrisom J, Severi G, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, Jhavar S, Saunders E, Hopper JL, Southey MC, Muir KR, English DR, Dearnaley DP, Ardern-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Wilkinson RA, Sawyer E, Lophatananon A; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators/British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK Prostate testing for cancer and Treatment study ( ProtecT Study) Collaborators, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Cooper C, Donovan JL, Hamdy FC, Neal DE, Eeles RA, Easton DF. Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. *Nature Genetics* 2009; 41:1058-60.
77. Yeager M, Orr N, Hayes RB, Jacobs KB, Kraft P, Wacholder S, Minichiello MJ, Fearnhead P, Yu K, Chatterjee N, Wang Z, Welch R, Staats BJ, Calle EE, Feigelson HS, Thun MJ, Rodriguez C, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Giovannucci E, Willett WC, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Gelmann EP, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover R, Hunter DJ, Chanock SJ, Thomas G. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nature Genetics* 2007; 39:645-9.

78. Fleming WH, Hamel A, MacDonald R, Ramsey E, Pettigrew NM, Johnston B, Dodd JG, Matusik RJ. Expression of the c-myc Protooncogene in Human Prostatic Carcinoma and Benign Prostatic Hyperplasia. *Cancer Res* 1986; 46:1535-8.
79. Koh CM, Bieberich CJ, Dang CV, Nelson WG, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. MYC and Prostate Cancer. *Genes & Cancer* 2010; 1 (6):617-28.
80. Ellwood-Yen K, Graeber TG, Wongvipat J, Iruela-Arispe ML, Zhang J, Matusik R, Thomas GV, Sawyers CL. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell*. 2003; 4(3):223-38.
81. Karnak D, Xu L. Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins. *Curr Drug Targets*. 2010; 11(6):699-707.
82. Sreenath TL, Dobi A, Petrovics G, Srivastava S. Oncogenic activation of ERG: A predominant mechanism in prostate cancer. *J Carcinog* 2011;10:10-21.
83. Roychowdhury S, Chinnaiyan AM. Advancing precision medicine for prostate cancer through genomics. *J Clin Oncol*. 2013; 31(15):1866-73.
84. Qi M, Li Y, Liu J, Yang X, Wang L, Zhou Z, Han B. Morphologic features of carcinomas with recurrent gene fusions. *Adv Anat Pathol*. 2012; 19 (6):417-24.
85. Martin DN, Starks AM, Ambs S. Biological determinants of health disparities in prostate cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013; 25(3):235-41.
86. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development* 2000; 14:2410–34.
87. Mimeault M, Batra SK. Animal models relevant to human prostate carcinogenesis underlining the critical implication of prostatic stem/progenitor cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1816 (1):25-37.
88. Tomkova K, Tomka M, Zajac V. Contribution of p53, p63, and p73 to the developmental diseases and cancer. *Neoplasma*. 2008; 55(3):177-81.
89. Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, Miller LD, Lim B, Liu ET, Yu Q, Ng HH, Ruan Y. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*. 2006; 124(1):207-19.
90. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14 (5):297-306.

91. Aparicio A, Den RB, Knudsen KE. Time to stratify? The retinoblastoma protein in castrate-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2011; 8(10):562-8.
92. Fiandalo MV, Kyprianou N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Exp Oncol*. 2012; 34(3):165-75.
93. Hällström TM, Laiho M. Genetic changes and DNA damage responses in the prostate. *Prostate*. 2008; 68(8):902-18.
94. Wu X, Gong S, Roy-Burman P, Lee P, Culig Z. Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocr Relat Cancer*. 2013; 20(4):R155-70.
95. Abate-Shen C, Shen MM, Gelmann E. Integrating differentiation and cancer: the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* 2008; 76(6):717-27.
96. Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, Jenkins RB, Bieberich CJ, De Marzo AM. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res*. 2006; 66(22):10683-90.
97. Schrecengost R, Knudsen KE. Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin Oncol*. 2013; 40(3):244-58.
98. Shang Y, Myers M, Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell*. 2002; 9(3):601-10.
99. Wu CT, Altuwaijri S, Ricke WA, Huang SP, Yeh S, Zhang C, Niu Y, Tsai MY, Chang C. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(31):12679-84.
100. Bonkhoff H, Berges R. From pathogenesis to prevention of castration resistant prostate cancer. *Prostate*. 2010; 70(1):100-12.
101. Colecchia M, Frigo B, Del Boca C, Guardamagna A, Zucchi A, Colloi D, Leopardi O. Detection of apoptosis by the TUNEL technique in clinically localised prostatic cancer before and after combined endocrine therapy. *J Clin Pathol* 1997; 50:384-8.
102. Feldman BJ, Feldman D. The Development of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1:34-45.

103. Bluemn EG, Nelson PS. The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. *Curr Opin Oncol.* 2012; 24(3):251-7.
104. Koochekpour S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl.* 2010; 12 (5):639-57.
105. Van der Kwast TH, Têtu B. Androgen receptors in untreated and treated prostatic intraepithelial neoplasia. *Eur Urol.* 1996; 30:265–8.
106. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC, Asangani IA, Ateeq B, Chun SY, Siddiqui J, Sam L, Anstett M, Mehra R, Prensner JR, Palanisamy N, Ryslik GA, Vandin F, Raphael BJ, Kunju LP, Rhodes DR, Pienta KJ, Chinnaiyan AM, Tomlins SA. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2012; 487(7406):239-43.
107. Perry AS, Watson WG, Lawler M, Hollywood D. The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 2010; 7:668-80.
108. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science.* 2008; 322 (5908):1695-9.
109. Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J, Rittenhouse H. PCA3: from basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Lett.* 2011; 301(1):1-6.
110. Hessels D, Schalken JA. The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2009; 6(5):255-61.
111. Ploussard G, de la Taille A. Urine biomarkers in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2010; 7(2):101-9.
112. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human microRNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130(7):2113-29.
113. Yogeve O, Lagos D. Noncoding RNAs and cancer. *Silence* 2011; 2 (1): 6.
114. Yap KL, Li S, Muñoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou MM. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and

- methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell* 2010; 38:662–74.
115. Abbas A, Gupta S. The role of histone deacetylases in prostate cancer. *Epigenetics* 2008; 3(6):300-9.
  116. Li LC, Carroll PR, Dahiya R. Epigenetic Changes in Prostate Cancer: Implication for Diagnosis and Treatment. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:103-15.
  117. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics* 2006; 7:21-33.
  118. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, Irizarry RA, Morgan J, Hicks J, DeWeese TL, Isaacs WB, Bova GS, De Marzo AM, Nelson WG. DNA Hypomethylation Arises Later in Prostate Cancer Progression than CpG Island Hypermethylation and Contributes to Metastatic Tumor Heterogeneity. *Cancer Res* 2008; 68(21):8954-67.
  119. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419(6907):624-9.
  120. Chen Z, Wang L, Wang Q, Li W. Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer. *Epigenomics* 2010; 2(4):551-60.
  121. Ellinger J, Kahl P, von der Gathen J, Jogenhofer S, Heukamp LC, Gütgemann I, Walter B, Hofstädter F, Büttner R, Müller SC, Bastian PJ, von Ruecker A. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. *The Prostate* 2010; 70(1):61-9.
  122. Brajušković G. Genomika. In: Brajuskovic G. *Molekularna biologija 2*. Beograd: Savremena administracija 2012. pp.203-36.
  123. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996; 273(5281):1516-7.
  124. Potter SR, Partin AW. Hereditary and Familial Prostate Cancer: Biologic Aggressiveness and Recurrence. *Rev Urol*. 2000; 2(1):35–6.
  125. Pomerantz MM, Freedman ML. Genetics of prostate cancer risk. *Mt Sinai J Med*. 2010; 77(6):643-54.



126. Cancel-Tassin G, Cussenot O. Prostate cancer genetics. *Minerva Urol Nefrol.* 2005; 57(4):289-300.
127. Verhage BA, Kiemeny LA. Genetic susceptibility to prostate cancer: a review. *Fam Cancer.* 2003 ; 2(1):57-67.
128. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho S, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B. Human Prostate Cancer Risk Factors. *Cancer* 2004; 101(10):2371-490.
129. Hindorff LA, Gillanders EM, Manolio TA. Genetic architecture of cancer and other complex diseases: lessons learned and future directions. *Carcinogenesis.* 2011; 32(7):945-54.
130. Easton DF, Eeles RA. Genome-wide association studies in cancer. *Human Molecular Genetics* 2008; 17(R2):R109–15.
131. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med.* 2010; 363(2):166-76.
132. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447(7145):661–78.
133. Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nature Genetics* 2005; 17:459-54.
134. Hosking FJ, Dobbins SE, Houlstoun RS. Genome-wide association studies for detecting cancer susceptibility. *British Medical Bulletin* 2011; 97:27-46.
135. Marchini J, Cardon LR, Phillips MS, Donnelly P. The effects of human population structure on large genetic association studies. *Nature Genetics* 2004; 36:512-7.
136. Witte JS. Prostate cancer genomics: towards a new understanding. *Nat Rev Genet* 2009; 10(2):77-82.
137. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, Yu K, Chatterjee N, Welch R, Hutchinson A, Crenshaw A, Cancel-Tassin G, Staats BJ, Wang Z, Gonzalez-Bosquet J, Fang J, Deng X, Berndt SI, Calle EE, Feigelson HS, Thun MJ, Rodriguez C, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher

- FR, Giovannucci E, Willett WC, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Crawford ED, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover R, Hayes RB, Hunter DJ, Chanock SJ. Multiple loci identified in a genom-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet* 2008; 40(3):310-5.
138. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, Sigurdsson A, Benediksdottir KR, Cazier JB, Sainz J, Jakobsdottir M, Kostic J, Magnusdottir DN, Ghosh S, Agnarsson K, Birgisdottir B, Le Roux L, Olafsdottir A, Blondal T, Andresdottir M, Gretarsdottir OS, Bergthorsson JT, Gudbjartsson D, Gylfason A, Thorleifsson G, Manolescu A, Kristjansson K, Geirsson G, Isaksson H, Douglas J, Johansson JE, Bälter K, Wiklund F, Montie JE, Yu X, Suarez BK, Ober C, Cooney KA, Gronberg H, Catalona WJ, Einarsson GV, Barkardottir RB, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet* 2006; 38:652-8.
139. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G, Adami HO, Hsu FC, Zhu Y, Bälter K, Kader AK, Turner AR, Liu W, Bleecker ER, Meyers DA, Duggan D, Carpten JD, Chang BL, Isaacs WB, Xu J, Grönberg H. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:910-9.
140. Ghoussaini M, Song H, Koessler T, Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Driver KE, Pooley KA, Ramus SJ, Kjaer SK, Hogdall E, DiCioccio RA, Whittemore AS, Gayther SA, Giles GG, Guy M, Edwards SM, Morrison J, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Arden-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Brown PM, Hopper JL, Neal DE, Pharoah PD, Ponder BA, Eeles RA, Easton DF, Dunning AM; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators/British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK ProtecT Study Collaborators. Multiple Loci with Different Cancer Specificities within the 8q24 Gene Desert. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 962-6.
141. Terada N, Tsuchiya N, Ma Z, Shimizu Y, Kobayashi T, Nakamura E, Kamoto T, Habuchi T, Ogawa O. Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *Prostate* 2008; 68:1689-95.

142. Wasserman NF, Aneas I, Nobrega MA. An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a MYC enhancer. *Genome Res* 2010; 20:1191-7.
143. Liu H, Wang B, Han C. Meta-Analyses of Genome-Wide and Replication Association Studies on Prostate Cancer. *Prostate* 2011; 71:209-24.
144. Cheng I, Plummer SJ, Jorgenson E, Liu X, Rybicki BA, Casey G, Witte JS. 8q24 and prostate cancer: association with advanced disease and meta-analysis. *European Journal of Human Genetics* 2008; 16:496-505.
145. Sotelo J, Esposito D, Duhagon MA, Banfield K, Mehalko J, Liao H, Stephens RM, Harris TJ, Munroe DJ, Wu X. Long-range enhancers on 8q24 regulate c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(7):3001-5.
146. Pomerantz MM, Beckwith CA, Regan MM, Wyman SK, Petrovics G, Chen Y, Hawksworth DJ, Schumacher FR, Mucci L, Penney KL, Stampfer MJ, Chan JA, Ardlie KG, Fritz BR, Parkin RK, Lin DW, Dyke M, Herman P, Lee S, Oh WK, Kantoff PW, Tewari M, McLeod DG, Srivastava S, Freedman ML. Evaluation of the 8q24 prostate cancer risk locus and MYC expression. *Cancer Res*. 2009; 69 (13):5568-74.
147. Pomerantz MM, Ahmadiyeh N, Jia L, Herman P, Verzi MP, Doddapaneni H, Beckwith CA, Chan JA, Hills A, Davis M, Yao K, Kehoe SM, Lenz HJ, Haiman CA, Yan C, Henderson BE, Frenkel B, Barretina J, Bass A, Taberero J, Baselga J, Regan MM, Manak JR, Shivdasani R, Coetzee GA, Freedman ML. The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2009; 41(8):882-4.
148. Huppi K, Volfovsky N, Runfola T, Jones TL, Mackiewicz M, Martin SE, Mushinski JF, Stephens R, Caplen NJ. The identification of microRNAs in a genomically unstable region of human chromosome 8q24. *Mol Cancer Res*. 2008; 6(2):212-21.
149. Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, Penegar S, Chandler I, Gorman M, Wood W, Barclay E, Lubbe S, Martin L, Sellick G, Jaeger E, Hubner R, Wild R, Rowan A, Fielding S, Howarth K; CORGI Consortium, Silver A, Atkin W, Muir K, Logan R, Kerr D, Johnstone E, Sieber O, Gray R, Thomas H, Peto J, Cazier JB, Houlston R. A genome-wide

- association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet.* 2007; 39(8):984-8.
150. Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, Prendergast J, Olschwang S, Chiang T, Crowdy E, Ferretti V, Laflamme P, Sundararajan S, Roumy S, Olivier JF, Robidoux F, Sladek R, Montpetit A, Campbell P, Bezieau S, O'Shea AM, Zogopoulos G, Cotterchio M, Newcomb P, McLaughlin J, Younghusband B, Green R, Green J, Porteous ME, Campbell H, Blanche H, Sahbatou M, Tubacher E, Bonaiti-Pellié C, Buecher B, Riboli E, Kury S, Chanock SJ, Potter J, Thomas G, Gallinger S, Hudson TJ, Dunlop MG. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2007; 39(8):989-94.
151. Berndt SI, Sampson J, Yeager M, Jacobs KB, Wang Z, Hutchinson A, Chung C, Orr N, Wacholder S, Chatterjee N, Yu K, Kraft P, Feigelson HS, Thun MJ, Diver WR, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Crawford ED, Haiman C, Henderson B, Kolonel L, Le Marchand L, Siddiq A, Riboli E, Travis RC, Kaaks R, Isaacs W, Isaacs S, Wiley KE, Gronberg H, Wiklund F, Stattin P, Xu J, Zheng SL, Sun J, Vatten LJ, Hveem K, Njølstad I, Gerhard DS, Tucker M, Hayes RB, Hoover RN, Fraumeni JF Jr, Hunter DJ, Thomas G, Chanock SJ. Large-scale fine mapping of the HNF1B locus and prostate cancer risk. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(16):3322-9.
152. Levin AM, Machiela MJ, Zuhlke KA, Ray AM, Cooney KA, Douglas JA. Chromosome 17q12 variants contribute to risk of early-onset prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68(16):6492-5.
153. Stevens VL, Ahn J, Sun J, Jacobs EJ, Moore SC, Patel AV, Berndt SI, Albanes D, Hayes RB. HNF1B and JAZF1 genes, diabetes, and prostate cancer risk. *Prostate* 2010;70(6):601-7.
154. Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A, Rafnar T, Gudbjartsson D, Agnarsson BA, Baker A, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Jakobsdottir M, Blondal T, Stacey SN, Helgason A, Gunnarsdottir S, Olafsdottir A, Kristinsson KT, Birgisdottir B, Ghosh S, Thorlacius S, Magnusdottir D, Stefansdottir G, Kristjansson K, Bagger

- Y, Wilensky RL, Reilly MP, Morris AD, Kimber CH, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, So WY, Tong PC, Ng MC, Hansen T, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Tres A, Fuertes F, Ruiz-Echarri M, Asin L, Saez B, van Boven E, Klaver S, Swinkels DW, Aben KK, Graif T, Cashy J, Suarez BK, van Vierssen Trip O, Frigge ML, Ober C, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Palmer CN, Rotimi C, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Benediktsson R, Jonsson E, Einarsson GV, Mayordomo JI, Catalona WJ, Kiemeny LA, Barkardottir RB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39(8):977-83.
155. Sun J, Purcell L, Gao Z, Isaacs SD, Wiley KE, Hsu FC, Liu W, Duggan D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Chang BL, Partin AW, Walsh PC, Isaacs WB, Zheng SL. Association between sequence variants at 17q12 and 17q24.3 and prostate cancer risk in European and African Americans. *Prostate* 2008; 68(7):691-7.
156. Kim HJ, Bae JS, Lee J, Chang IH, Kim KD, Shin HD, Han JH, Lee SY, Kim W, Myung SC. HNF1B polymorphism associated with development of prostate cancer in Korean patients. *Urology* 2011; 78(4):969.e1-6.
157. Hooker S, Hernandez W, Chen H, Robbins C, Torres JB, Ahaghotu C, Carpten J, Kittles RA. Replication of prostate cancer risk loci on 8q24, 11q13, 17q12, 19q33, and Xp11 in African Americans. *Prostate* 2010; 70(3):270-5.
158. Elliott KS, Zeggini E, McCarthy MI, Gudmundsson J, Sulem P, Stacey SN, Thorlacius S, Amundadottir L, Grönberg H, Xu J, Gaborieau V, Eeles RA, Neal DE, Donovan JL, Hamdy FC, Muir K, Hwang SJ, Spitz MR, Zanke B, Carvajal-Carmona L, Brown KM; Australian Melanoma Family Study Investigators, Hayward NK, Macgregor S, Tomlinson IP, Lemire M, Amos CI, Murabito JM, Isaacs WB, Easton DF, Brennan P; PanScan Consortium, Barkardottir RB, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Hunter DJ, Chanock SJ, Stefansson K, Ioannidis JP. Evaluation of association of HNF1B variants with diverse cancers: collaborative analysis of data from 19 genome-wide association studies. *PLoS One*. 2010; 5(5):e10858.

159. Courtois G, Baumhueter S, Crabtree GR. Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:7937–41.
160. Cereghini S, Blumenfeld M, Yaniv M. A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev* 1988; 2:957–74.
161. Rey-Campos J, Chouard T, Yaniv M, Cereghini S. vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J* 1991; 10:1445–57.
162. Pontoglio M. Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:S140–3.
163. Pharoah PD, Tsai YY, Ramus SJ, Phelan CM, Goode EL, Lawrenson K, Buckley M, Fridley BL, Tyrer JP, Shen H, Weber R, Karevan R, Larson MC, Song H, Tessier DC, Bacot F, Vincent D, Cunningham JM, Dennis J, Dicks E; Australian Cancer Study; Australian Ovarian Cancer Study Group, Aben KK, Anton-Culver H, Antonenkova N, Armasu SM, Baglietto L, Bandera EV, Beckmann MW, Birrer MJ, Bloom G, Bogdanova N, Brenton JD, Brinton LA, Brooks-Wilson A, Brown R, Butzow R, Campbell I, Carney ME, Carvalho RS, Chang-Claude J, Chen YA, Chen Z, Chow WH, Cicek MS, Coetzee G, Cook LS, Cramer DW, Cybulski C, Dansonka-Mieszkowska A, Despiere E, Doherty JA, Dörk T, du Bois A, Dürst M, Eccles D, Edwards R, Ekici AB, Fasching PA, Fenstermacher D, Flanagan J, Gao YT, Garcia-Closas M, Gentry-Maharaj A, Giles G, Gjyshi A, Gore M, Gronwald J, Guo Q, Halle MK, Harter P, Hein A, Heitz F, Hillemanns P, Hoatlin M, Høgdall E, Høgdall CK, Hosono S, Jakubowska A, Jensen A, Kalli KR, Karlan BY, Kelemen LE, Kiemeny LA, Kjaer SK, Konecny GE, Krakstad C, Kupryjanczyk J, Lambrechts D, Lambrechts S, Le ND, Lee N, Lee J, Leminen A, Lim BK, Lissowska J, Lubiński J, Lundvall L, Lurie G, Massuger LF, Matsuo K, McGuire V, McLaughlin JR, Menon U, Modugno F, Moysich KB, Nakanishi T, Narod SA, Ness RB, Nevanlinna H, Nickels S, Noushmehr H, Odunsi K, Olson S, Orlov I, Paul J, Pejovic T, Pelttari LM, Permut-Wey J, Pike MC, Poole EM, Qu X, Risch HA, Rodriguez-Rodriguez L, Rossing MA, Rudolph A, Runnebaum I,

- Rzepecka IK, Salvesen HB, Schwaab I, Severi G, Shen H, Shridhar V, Shu XO, Sieh W, Southey MC, Spellman P, Tajima K, Teo SH, Terry KL, Thompson PJ, Timorek A, Tworoger SS, van Altena AM, van den Berg D, Vergote I, Vierkant RA, Vitonis AF, Wang-Gohrke S, Wentzensen N, Whittemore AS, Wik E, Winterhoff B, Woo YL, Wu AH, Yang HP, Zheng W, Ziogas A, Zulkifli F, Goodman MT, Hall P, Easton DF, Pearce CL, Berchuck A, Chenevix-Trench G, Iversen E, Monteiro AN, Gayther SA, Schildkraut JM, Sellers TA. GWAS meta-analysis and replication identifies three new susceptibility loci for ovarian cancer. *Nat Genet.* 2013; 45(4):362-70.
164. Spurdle AB, Thompson DJ, Ahmed S, Ferguson K, Healey CS, O'Mara T, Walker LC, Montgomery SB, Dermitzakis ET; Australian National Endometrial Cancer Study Group, Fahey P, Montgomery GW, Webb PM, Fasching PA, Beckmann MW, Ekici AB, Hein A, Lambrechts D, Coenegrachts L, Vergote I, Amant F, Salvesen HB, Trovik J, Njolstad TS, Helland H, Scott RJ, Ashton K, Proietto T, Otton G; National Study of Endometrial Cancer Genetics Group, Tomlinson I, Gorman M, Howarth K, Hodgson S, Garcia-Closas M, Wentzensen N, Yang H, Chanock S, Hall P, Czene K, Liu J, Li J, Shu XO, Zheng W, Long J, Xiang YB, Shah M, Morrison J, Michailidou K, Pharoah PD, Dunning AM, Easton DF. Genome-wide association study identifies a common variant associated with risk of endometrial cancer. *Nat Genet.* 2011; 43(5):451-4.
165. Ma J, Gao M, Lu Y, Feng X, Zhang J, Lin D, Xiao T, Hu Z, Yuan J, Su K, Shipley J, Xue J, Gao Y. Gain of 1q25-32, 12q23-24.3, and 17q12-22 facilitates tumorigenesis and progression of human squamous cell lung cancer. *J Pathol.* 2006; 210(2):205-13.
166. Marinho S, Custovic A, Marsden P, Smith JA, Simpson A. 17q12-21 variants are associated with asthma and interact with active smoking in an adult population from the United Kingdom. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012; 108(6):402-11.
167. Beerman I, Novak J, Wyatt RJ, Julian BA, Gharavi AG. The genetics of IgA nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2007; 3(6):325-38.

168. Lee KM, Kang D, Park SK, Berndt SI, Reding D, Chatterjee N, Chanock S, Huang WY, Hayes RB. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009; 30(4):621-5.
169. Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*. 1998; 12(10):773-90.
170. Grande M, Carlström K, Stege R, Pousette A, Faxén M. Estrogens increase the endothelial nitric oxide synthase (ecNOS) mRNA level in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Prostate*. 2000; 45(3):232-7.
171. Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med*. 1972; 136(2):261-76.
172. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 1993; 143(2):401-9.
173. Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17(1):91-106.
174. Salvucci O, Carsana M, Bersani I, Tragni G, Anichini A. Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. *Cancer Res*. 2001; 61(1):318-26.
175. Marangoni K, Neves AF, Cardoso AM, Santos WK, Faria PC, Goulart LR. The endothelial nitric oxide synthase Glu-298-Asp polymorphism and its mRNA expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Detect Prev*. 2006; 30(1):7-13.
176. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999; 99 (22):2864-70.
177. Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Soubrier F, Cambien F. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene - no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29(4):284-90.



178. Marangoni K, Araújo TG, Neves AF, Goulart LR. The -786T>C promoter polymorphism of the NOS3 gene is associated with prostate cancer progression. *BMC Cancer*. 2008; 8:273.
179. Miyahara K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y, et al. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem*. 1994; 223(3):719-26.
180. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(6):2832-5.
181. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H, Nakao K. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(18):2629-37.
182. Medeiros RM, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Ferreira P, Lopes C. Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(11):3433-7.
183. Safarinejad MR, Safarinejad S, Shafiei N, Safarinejad S. Effects of the T-786C, G894T, and Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer. *Urol Oncol*. 2013; 31(7):1132-40.
184. Howard TD, Giles WH, Xu J, Wozniak MA, Malarcher AM, Lange LA, Macko RF, Basehore MJ, Meyers DA, Cole JW, Kittner SJ. Promoter polymorphisms in the nitric oxide synthase 3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young black women. *Stroke*. 2005; 36(9):1848-51.

185. Niu W, Qi Y. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PLoS One*. 2011; 6(9):e24266.
186. Yoshimura T, Hisatomi A, Kajihara S, Yasutake T, Ogawa Y, Mizuta T, Ozaki I, Utsunomiyai T, Yamamoto K. The relationship between insulin resistance and polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in patients with coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb*. 2003; 10(1):43-7.
187. He Y, Fan Z, Zhang J, Zhang Q, Zheng M, Li Y, Zhang D, Gu S, Yang H. Polymorphisms of eNOS gene are associated with diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mutagenesis*. 2011; 26(2):339-49.
188. Sinici I, Güven EO, Serefoğlu E, Hayran M. T-786C polymorphism in promoter of eNOS gene as genetic risk factor in patients with erectile dysfunction in Turkish population. *Urology*. 2010; 75(4):955-60.
189. Safarinejad MR, Shafiei N, Safarinejad S. The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility. *Mol Reprod Dev*. 2010; 77(8):720-7.
190. Zintzaras E, Grammatikou M, Kitsios GD, Doxani C, Zdoukopoulos N, Papandreou C, Patrikidou A. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer: a genetic association study and meta-analysis. *J Hum Genet*. 2010; 55(11):743-8.
191. Hindorff LA, MacArthur J (European Bioinformatics Institute), Morales J (European Bioinformatics Institute), Junkins HA, Hall PN, Klemm AK, and Manolio TA. A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies. Available at: [www.genome.gov/gwastudies](http://www.genome.gov/gwastudies). Accessed [30 september 2013].
192. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998; 280:969-74.
193. Sambrook J, Russel DW. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed Field Agarose Gel Electrophoresis. In: Sambrook J, Russel DW, eds. *Molecular*

- Cloning: a laboratory manual, Third Edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2001; pp.5.1-5.17.
194. Romac S, Vukosavić S, Stojković O, Čuljković B. Osnovni principi PCR metode. In: Romac S, Vukosavić S, Stojković O, Čuljković B, eds. PCR u kliničkoj dijagnostici. Beograd: Biološki fakultet u Beogradu; 1999; pp.9-27.
  195. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11):2479-88.
  196. Chang HW, Yang CH, Chang PL, Vheng YH, Chuang LY. SNP-RFLPing: restriction enzyme mining for SNP in genomes. *BMC Genomics* 2006; 7:1-7.
  197. Saiki RK, Scharf S, Faloona , Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-4.
  198. Bartlett JMS. Optimisation of Polymerase Chain Reaction. In: Bartlett JMS, Stirling D. eds. PCR protocols. 2nd edition. New Jersey: Humana Press; 2005. pp.89-100.
  199. Surdhar GK. Cycle sequencing of PCR products. In: Theophilus BDM, Rapley R. eds. PCR Mutation Detection Protocols. New Jersey: Humana Press; 2002. pp.65-72.
  200. Wallis Y, Morrell N. Automated DNA Sequencing. In: Theophilus BDM, Rapley R. eds. PCR Mutation Detection Protocols. 2nd edition. New Jersey: Humana Press; 2011. pp.173-85.
  201. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet* 2005; 76:887-93.
  202. SNPStats. Available at: URL: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>
  203. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006; 22(15):1928-9.

204. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* 2011; 6(2):121-33.
205. Cochran WG. The  $\chi^2$  test of goodness of fit. *Annals of Mathematical Statistics.* 1952; 25:315-45.
206. Bretthauer M, Kalager M. Principles, effectiveness and caveats in screening for cancer. *Br J Surg.* 2013; 100(1):55-65.
207. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer.* 2010; 46(4):765-81.
208. Verma M, Patel P, Verma M. Biomarkers in prostate cancer epidemiology. *Cancers (Basel).* 2011; 3(4):3773-98.
209. Ades F, Senterre C, de Azambuja E, Sullivan R, Popescu R, Parent F, Piccart M. Discrepancies in cancer incidence and mortality and its relationship to health expenditure in the 27 European Union member states. *Ann Oncol.* 2013; 24(11):2897-902.
210. Williams ES, Hegde M. Implementing genomic medicine in pathology. *Adv Anat Pathol.* 2013; 20(4):238-44.
211. Natrajan R, Wilkerson P. From integrative genomics to therapeutic targets. *Cancer Res.* 2013; 73(12):3483-8.
212. Barbieri CE, Demichelis F, Rubin MA. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. *Histopathology.* 2012; 60(1):187-98.
213. Ioannidis JP, Castaldi P, Evangelou E. A compendium of genome-wide associations for cancer: critical synopsis and reappraisal. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(12):846-58.
214. Aly M, Wiklund F, Grönberg H. Early detection of prostate cancer with emphasis on genetic markers. *Acta Oncol.* 2011; 50 (Suppl 1):18-23.
215. Ishak MB, Giri VN. A systematic review of replication studies of prostate cancer susceptibility genetic variants in high-risk men originally identified from genome-wide association studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20(8):1599-610.

216. Pilling LC, Harries LW, Powell J, Llewellyn DJ, Ferrucci L, Melzer D. Genomics and successful aging: grounds for renewed optimism? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012; 67(5):511-9.
217. Nakagawa H, Akamatsu S, Takata R, Takahashi A, Kubo M, Nakamura Y. Prostate cancer genomics, biology, and risk assessment through genome-wide association studies. *Cancer Sci*. 2012; 103(4):607-13.
218. Huang J, Wang JK, Sun Y. Molecular pathology of prostate cancer revealed by next-generation sequencing: opportunities for genome-based personalized therapy. *Curr Opin Urol*. 2013; 23(3):189-93.
219. Patnala R, Clements J, Batra J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC Genet*. 2013;14(39):1-11.
220. Lewis CM, Knight J. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harb Protoc*. 2012; 2012(3):297-306.
221. Wright JB, Brown SJ, Cole MD. Up regulation of c- MYC in cis through a large chromatin loop linked to a cancer risk associated single-nucleotide polymorphism in colorectal cancer cells. *Mol Cell Biol* 2010; 30:1411–20.
222. Zhang Y D, Tier B. Population stratification, not genotype error, causes some SNPs to depart from Hardy-Weinberg Equilibrium. Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics. Barossa Valley, South Australia. September 28-October 1. 2009. pp.243-246.
223. Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, Riley J, Purvis I, Xu CF. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12(5):395-9.
224. Schumacher FR, Feigelson HC, Cox DG, Haiman CA, Albanes D, Buring J, Calle EE, Chanock SJ, Colditz GA, Diver WR, Dunning AM, Freedman ML, Gaziano JM, Giovannucci E, Hankinson SE, Hayes RB, Henderson BE, Hoover RN, Kaaks R, Key T, Kolonel LN, Kraft P, Le Marchand L, Ma J, Pike MC, Riboli E, Stampfer MJ, Stram DO, Thomas G, Thun MJ, Travis R, Virtamo J, Andriole G, Gelmann E, Willett WC, Hunter DJ. A common 8q24 variant in prostate and breast cancer from a large nested case-control study. *Cancer Res* 2007; 67:2951-56.

225. Chen M, Huang YC, Ko IL, Yang S, Chang YH, Huang W, Chen YM. The rs1447295 at 8q24 is a risk variant for prostate cancer in Taiwanese men. *J Urol* 2009; 74:698-701.
226. Hamano T, Matsui H, Sekine Y, Ohtake N, Nakata S, Suzuki K. Association of SNP rs1447295 and microsatellite marker DG8S737 with familial prostate cancer and high grade disease. *J Urol* 2010; 184:738-42.
227. Joung JY, Park S, Yoon H, Lee SJ, Park WS, Seo HK, Chung J, Kim SY, Hong SH, Lee YS, Kim J, Lee KH. Association of common variations of 8q24 with the risk of prostate cancer in Koreans and a review of the Asian population. *BJU Int* 2012; 110:E318-25.
228. Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A, Waliszewska A, Penney K, Steen RG, Ardlie K, John EM, Oakley-Girvan I, Whittemore AS, Cooney KA, Ingles SA, Altshuler D, Henderson BE, Reich D. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:14068-73.
229. Penney KL, Salinas CA, Pomerantz M, Schumacher FR, Beckwith CA, Lee GS, Oh WK, Sartor O, Ostrander EA, Kurth T, Ma J, Mucci L, Stanford JL, Kantoff PW, Hunter DJ, Stampfer MJ, Freedman ML. Evaluation of 8q24 and 17q risk loci and prostate cancer mortality. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3223-30.
230. Okobia MN, Zmuda JM, Ferrell RE, Patrick AL, Bunker CH. Chromosome 8q24 variants are associated with prostate cancer risk in a high risk population of African ancestry. *Prostate* 2011; 71:1054-63.
231. Yeager M, Xiao N, Hayes RB, Bouffard P, Desany B, Burdet L, Orr N, Matthews C, Qi L, Crenshaw A, Markovic Z, Fredrikson KM, Jacobs KB, Amundadottir L, Jarvie TP, Hunter DJ, Hoover R, Thomas G, Harkins TT, Chanock SJ. Comprehensive resequence analysis of a 136 kb region of human chromosome 8q24 associated with prostate and colon cancers. *Hum Genet* 2008; 124:161-70.
232. Sun J, Lange EM, Isaacs SD, Liu W, Wiley KE, Lange L, Gronberg H, Duggan D, Carpten JD, Walsh PC, Xu J, Chang BL, Isaacs WB, Zheng SL. Chromosome 8q24 risk variants in hereditary and non-hereditary prostate cancer patients. *Prostate* 2008; 68:489-97.

233. Wang L, McDonnell SK, Slusser JP, Hebring SJ, Cunningham JM, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau SN. Two common chromosome 8q24 variants are associated with increased risk for prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67:2944-50.
234. Zheng SL, Sun J, Cheng Y, Li G, Hsu FC, Zhu Y, Chang BL, Liu W, Kim JW, Turner AR, Gielzak M, Yan G, Isaacs SD, Wiley KE, Sauvageot J, Chen HS, Gurganus R, Mangold LA, Trock BJ, Gronberg H, Duggan D, Carpten JD, Partin AW, Walsh PC, Xu J, Isaacs WB. Association between two unlinked loci at 8q24 and prostate cancer risk among European Americans. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1525-33.
235. Suuriniemi M, Agalliu I, Schaid DJ, Johanneson B, McDonnell SK, Iwasaki L, Stanford JL, Ostrander EA. Confirmation of a positive association between prostate cancer risk and a locus at chromosome 8q24. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16:809-14.
236. Cussenot O, Azzouzi AR, Bantsimba-Malanda G, Gaffroy C, Mangin P, Cormier L, Fournier G, Valeri A, Jouffe L, Roupret M, Fromont G, Sibony M, Comperat E, Cancel-Tassin G. Effect of genetic variability within 8q24 on aggressiveness patterns at diagnosis and familial status of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:5635-9.
237. Os'kina NA, Boiarskikh UA, Lazarev AF, Petrova VD, Ganov DI, Tonacheva OG, Lifshits GI, Filipenko ML. Association of chromosome 8q24 variants with prostate cancer risk in the Siberian region of Russia and meta-analysis. *Mol Biol (Mosk)* 2012; 46:234-41.
238. Wokołorczyk D, Gliniewicz B, Stojewski M, Sikorski A, Złowocka E, Debniak T, Jakubowska A, Górski B, van de Wetering T, Narod SA, Lubiński J, Cybulski C. The rs1447295 and DG8S737 markers on chromosome 8q24 and cancer risk in the Polish population. *Eur J Cancer Prev* 2010; 19:167-71.
239. Troutman SM, Sissung TM, Cropp CD, Venzon DJ, Spencer SD, Adesunloye BA, Huang X, Karzai FH, Price DK, Figg WD. Racial disparities in the association between variants on 8q24 and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist* 2012; 17:312-20.

240. Robbins C, Torres JB, Hooker S, Bonilla C, Hernandez W, Candreva A, Ahaghotu C, Kittles R, Carpten J. Confirmation study of prostate cancer risk variants at 8q24 in African Americans identifies a novel risk locus. *Genome Res* 2007; 17:1717-22.
241. Pal P, Xi H, Guha S, Sun G, Helfand BT, Meeks JJ, Suarez BK, Catalona WJ, Deka R. Common variants in 8q24 are associated with risk for prostate cancer and tumor aggressiveness in men of European ancestry. *Prostate* 2009; 69:1548-56.
242. Murphy AB, Ukoli F, Freeman V, Bennett F, Aiken W, Tulloch T, Coard K, Angwafo F, Kittles RA. 8q24 risk alleles in West African and Caribbean men. *Prostate* 2012; 72:1366-73.
243. Chan JY, Li H, Singh O, Mahajan A, Ramasamy S, Subramaniyan K, Kanesvaran R, Sim HG, Chong TW, Teo YY, Chia SE, Tan MH, Chowbay B. 8q24 and 17q Prostate cancer susceptibility loci in a multiethnic Asian cohort. *Urol Oncol*. 2013; 31(8):1553-60.
244. Zeegers MP, Khan HS, Schouten LJ, van Dijk B, Goldbohn AR, Shalken J, Shajahan S, Pearlman A, Oddoux C, van den Brandt PA, Ostrer H. Genetic marker polymorphisms on chromosome 8q24 and prostate cancer in the Dutch population: DG8S737 may not be the causative variant. *Eur J Hum Genet* 2010; 19:118-20.
245. Fitzgerald LM, Kwon EM, Koopmeiners JS, Salinas CA, Standford JL, Ostrander EA. Analysis of recently identified prostate cancer susceptibility loci in a population-based study: Associations with family history and clinical Features. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3231-7.
246. Bao BY, Pao JB, Lin VC, Huang CN, Chang TY, Lan YH, Lu TL, Lee HZ, Chen LM, Ting WC, Hsieh CJ, Huang SP. Individual and cumulative association of prostate cancer susceptibility variants with clinicopathologic characteristics of the disease. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1232-7.
247. Papanikolopoulou A, Landt O, Ntoumas K, Bolomitis S, Tyrizis SI, Constantinides C, Drakoulis N. The multi-cancer marker, rs6983267, located at region 3 of chromosome 8q24, is associated with prostate cancer in Greek



- patients but does not contribute to the aggressiveness of the disease. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50:379-85.
248. Beuten J, Gelfond JA, Martinez-Fierro ML, Weldon KS, Crandall AC, Rojas-Martinez A, Thompson IM, Leach RJ. Association of chromosome 8q variants with prostate cancer risk in Caucasian and Hispanic men. *Carcinogenesis* 2009; 30:1372-9.
249. Xu Z, Bensen JT, Smith GJ, Mohler JL, Taylor JA. GWAS SNP replication among African American and European American men in the North Carolina – Louisiana prostate cancer project. *Prostate* 2011; 71:881-91.
250. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, Mulholland S, Leongamornlert DA, Edwards SM, Morrison J, Field HI, Southey MC, Severi G, Donovan JL, Hamdy FC, Dearnaley DP, Muir KR, Smith C, Bagnato M, Ardern-Jones AT, Hall AL, O'Brien LT, Gehr-Swain BN, Wilkinson RA, Cox A, Lewis S, Brown PM, Jhavar SG, Tymrakiewicz M, Lophatananon A, Bryant SL; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators; British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK ProtecT Study Collaborators, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Woodhouse CJ, Thompson A, Christmas T, Ogden C, Fisher C, Jamieson C, Cooper CS, English DR, Hopper JL, Neal DE, Easton DF. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2008; 40(3):316-21.
251. Salinas CA, Kwon E, Carlson CS, Koopmeiners JS, Feng Z, Karyadi DM, Ostrander EA, Stanford JL. Multiple independent genetic variants in the 8q24 region are associated with prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:1203-13.
252. Fromont G, Godet J, Peyret A, Irani J, Celhay O, Rozet F, Cathelineau X, Cussenot O. 8q24 amplification is associated with Myc expression and prostate cancer progression and is an independent predictor of recurrence after radical prostatectomy. *Hum Pathol.* 2013; 44(8):1617-23.
253. Chang BL, Spangler E, Gallagher S, Haiman CA, Henderson B, Isaacs W, Benford ML, Kidd LR, Cooney K, Strom S, Ingles SA, Stern MC, Corral R, Joshi AD, Xu J, Giri VN, Rybicki B, Neslund-Dudas C, Kibel AS, Thompson

- IM, Leach RJ, Ostrander EA, Stanford JL, Witte J, Casey G, Eeles R, Hsing AW, Chanock S, Hu JJ, John EM, Park J, Stefflova K, Zeigler-Johnson C, Rebbeck TR. Validation of genome-wide prostate cancer associations in men of African descent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(1):23-32.
254. Haiman CA, Chen GK, Blot WJ, Strom SS, Berndt SI, Kittles RA, Rybicki BA, Isaacs WB, Ingles SA, Stanford JL, Diver WR, Witte JS, Hsing AW, Nemesure B, Rebbeck TR, Cooney KA, Xu J, Kibel AS, Hu JJ, John EM, Gueye SM, Watya S, Signorello LB, Hayes RB, Wang Z, Yeboah E, Tettey Y, Cai Q, Kolb S, Ostrander EA, Zeigler-Johnson C, Yamamura Y, Neslund-Dudas C, Haslag-Minoff J, Wu W, Thomas V, Allen GO, Murphy A, Chang BL, Zheng SL, Leske MC, Wu SY, Ray AM, Hennis AJ, Thun MJ, Carpten J, Casey G, Carter EN, Duarte ER, Xia LY, Sheng X, Wan P, Pooler LC, Cheng I, Monroe KR, Schumacher F, Le Marchand L, Kolonel LN, Chanock SJ, Van Den Berg D, Stram DO, Henderson BE. Genome-wide association study of prostate cancer in men of African ancestry identifies a susceptibility locus at 17q21. *Nat Genet* 2011; 43(6):570-3.
255. Zhang X, Qiao H, Zhao Y, Wang X, Sun H, Liu A, Xu L, Sun D, Jin Y, Yu Y, Meng X, Bai J, Chen F, Fu S. Association of single nucleotide polymorphisms in TCF2 with type 2 diabetes susceptibility in a Han Chinese population. *PLoS One* 2012;7(12):1-6(e52938).
256. Netto GJ. Molecular diagnostics in urologic malignancies: a work in progress. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135(5):610-21.
257. Squire JA, Park PC, Yoshimoto M, Alami J, Williams JL, Evans A, Joshua AM. Prostate cancer as a model system for genetic diversity in tumors. *Adv Cancer Res.* 2011; 112:183-216.
258. Naylor SL. SNPs associated with prostate cancer risk and prognosis. *Front Biosci.* 2007; 12:4111-31.
259. Amankwah EK, Sellers TA, Park JY. Gene variants in the angiogenesis pathway and prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2012; 33(7):1259-69.
260. Jacobs EJ, Hsing AW, Bain EB, Stevens VL, Wang Y, Chen J, Chanock SJ, Zheng SL, Xu J, Thun MJ, Calle EE, Rodriguez C. Polymorphisms in

- angiogenesis-related genes and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17(4):972-7.
261. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(4):212-36.
262. Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(7):1117-23.
263. Kashyap A, Kluźniak W, Wokołorczyk D, Gołąb A, Sikorski A, Słojewski M, Gliniewicz B, Switała J, Borkowski T, Borkowski A, Antczak A, Wojnar L, Przybyła J, Sosnowski M, Małkiewicz B, Zdrojowy R, Sikorska-Radek P, Matych J, Wilkosz J, Różański W, Kiś J, Bar K, Bryniarski P, Paradysz A, Jersak K, Niemirowicz J, Słupski P, Jarzemeski P, Skrzypczyk M, Dobruch J, Domagała P, Piotrowski K, Jakubowska A, Gronwald J, Huzarski T, Byrski T, Dębniak T, Górski B, Masojć B, van de Wetering T, Menkiszak J, Akbari MR, Lubiński J, Narod SA, Cybulski C; the Polish Hereditary Prostate Cancer Consortium. The presence of prostate cancer at biopsy is predicted by a number of genetic variants. *Int J Cancer.* 2013; doi: 10.1002/ijc.28447.
264. Obort AS, Ajadi MB, Akinloye O. Prostate-Specific Antigen: Any Successor in Sight? *Rev Urol.* 2013; 15(3):97-107.
265. Valle Gerhold J. How many early detected prostate cancers are needed to prevent one death? *Arch Esp Urol.* 2010; 63(5):335-41.
266. Crawford ED, Bennett CL, Andriole GL, Garnick MB, Petrylak DP. The utility of prostate-specific antigen in the management of advanced prostate cancer. *BJU Int.* 2013; 112(5):548-60.
267. Gottipati S, Warncke J, Vollmer R, Humphrey PA. Usual and unusual histologic patterns of high Gleason score 8 to 10 adenocarcinoma of the prostate in needle biopsy tissue. *Am J Surg Pathol.* 2012; 36(6):900-7.
268. Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samarasinghe H. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology.* 2012; 60(1):75-86.
269. Teerlink CC, Thibodeau SN, McDonnell SK, Schaid DJ, Rinckleb A, Maier C, Vogel W, Cancel-Tassin G, Egrot C, Cussenot O, Foulkes WD, Giles

- GG, Hopper JL, Severi G, Eeles R, Easton D, Kote-Jarai Z, Guy M, Cooney KA, Ray AM, Zuhlke KA, Lange EM, Fitzgerald LM, Stanford JL, Ostrander EA, Wiley KE, Isaacs SD, Walsh PC, Isaacs WB, Wahlfors T, Tammela T, Schleutker J, Wiklund F, Grönberg H, Emanuelsson M, Carpten J, Bailey-Wilson J, Whittemore AS, Oakley-Girvan I, Hsieh CL, Catalona WJ, Zheng SL, Jin G, Lu L, Xu J; International Consortium for Prostate Cancer Genetics, Camp NJ, Cannon-Albright LA. Association analysis of 9,560 prostate cancer cases from the International Consortium of Prostate Cancer Genetics confirms the role of reported prostate cancer associated SNPs for familial disease. *Hum Genet.* 2013.
270. Briganti A, Suardi N, Gallina A, Abdollah F, Novara G, Ficarra V, Montorsi F. Predicting the risk of bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40(1):3-11.
271. Gallagher DJ, Vijai J, Cronin AM, Bhatia J, Vickers AJ, Gaudet MM, Fine S, Reuter V, Scher HI, Halldén C, Dutra-Clarke A, Klein RJ, Scardino PT, Eastham JA, Lilja H, Kirchoff T, Offit K. Susceptibility loci associated with prostate cancer progression and mortality. *Clin Cancer Res* 2010; 16(10):2819-32.
272. Amin Al Olama A, Kote-Jarai Z, Schumacher FR, Wiklund F, Berndt SI, Benlloch S, Giles GG, Severi G, Neal DE, Hamdy FC, Donovan JL, Hunter DJ, Henderson BE, Thun MJ, Gaziano M, Giovannucci EL, Siddiq A, Travis RC, Cox DG, Canzian F, Riboli E, Key TJ, Andriole G, Albanes D, Hayes RB, Schleutker J, Auvinen A, Tammela TL, Weischer M, Stanford JL, Ostrander EA, Cybulski C, Lubinski J, Thibodeau SN, Schaid DJ, Sorensen KD, Batra J, Clements JA, Chambers S, Aitken J, Gardiner RA, Maier C, Vogel W, Dörk T, Brenner H, Habuchi T, Ingles S, John EM, Dickinson JL, Cannon-Albright L, Teixeira MR, Kaneva R, Zhang HW, Lu YJ, Park JY, Cooney KA, Muir KR, Leongamornlert DA, Saunders E, Tymrakiewicz M, Mahmud N, Guy M, Govindasami K, O'Brien LT, Wilkinson RA, Hall AL, Sawyer EJ, Dadaev T, Morrison J, Dearnaley DP, Horwich A, Huddart RA, Khoo VS, Parker CC, Van As N, Woodhouse CJ, Thompson A, Dudderidge T, Ogden C, Cooper CS, Lophatonanon A, Southey MC, Hopper JL, English D, Virtamo J, Le Marchand

- L, Campa D, Kaaks R, Lindstrom S, Diver WR, Gapstur S, Yeager M, Cox A, Stern MC, Corral R, Aly M, Isaacs W, Adolfsson J, Xu J, Zheng SL, Wahlfors T, Taari K, Kujala P, Klarskov P, Nordestgaard BG, Røder MA, Frikke-Schmidt R, Bojesen SE, FitzGerald LM, Kolb S, Kwon EM, Karyadi DM, Orntoft TF, Borre M, Rinckleb A, Luedeke M, Herkommer K, Meyer A, Serth J, Marthick JR, Patterson B, Wokolorczyk D, Spurdle A, Lose F, McDonnell SK, Joshi AD, Shahabi A, Pinto P, Santos J, Ray A, Sellers TA, Lin HY, Stephenson RA, Teerlink C, Muller H, Rothenbacher D, Tsuchiya N, Narita S, Cao GW, Slavov C, Mitev V; UK Genetic Prostate Cancer Study Collaborators/British Association of Urological Surgeons' Section of Oncology; UK ProtecT Study Collaborators; Australian Prostate Cancer Bioresource; PRACTICAL Consortium, Chanock S, Gronberg H, Haiman CA, Kraft P, Easton DF, Eeles RA. A meta-analysis of genome-wide association studies to identify prostate cancer susceptibility loci associated with aggressive and non-aggressive disease. *Hum Mol Genet.* 2013; 22(2):408-15.
273. Chung CC, Magalhaes WC, Gonzalez-Bosquet J, Chanock SJ. Genome-wide association studies in cancer - current and future directions. *Carcinogenesis* 2010; 31:111–120.
274. Chen R, Ren S, Sun Y. Genome-wide association studies on prostate cancer: the end or the beginning? *Protein Cell.* 2013; 4(9):677-86.
275. Cordell HJ. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(6):392-404.
276. Xu J, Lowey J, Wiklund F, Sun J, Lindmark F, Hsu FC, Dimitrov L, Chang B, Turner AR, Liu W, Adami HO, Suh E, Moore JH, Zheng SL, Isaacs WB, Trent JM, Grönberg H. The interaction of four genes in the inflammation pathway significantly predicts prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(11 Pt 1):2563-8.
277. Ciampa J, Yeager M, Amundadottir L, Jacobs K, Kraft P, Chung C, Wacholder S, Yu K, Wheeler W, Thun MJ, Diver WR, Gapstur S, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Giovannucci E, Willett WC, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Valeri A, Hunter D, Hoover R, Thomas G, Chanock S, Chatterjee N. Large-

scale exploration of gene-gene interactions in prostate cancer using a multistage genome-wide association study. *Cancer Res.* 2011; 71(9):3287-95.

278. Tao S, Feng J, Webster T, Jin G, Hsu FC, Chen SH, Kim ST, Wang Z, Zhang Z, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J, Sun J. Genome-wide two-locus epistasis scans in prostate cancer using two European populations. *Hum Genet.* 2012; 131(7):1225-34.

## 7. Prilozi

### Prilog A.

P.A.1. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs1447295

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (μl)
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , Kapa)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, Fermentas)	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv 1447	10 μM	0.3 μM	0.45
Prajmer Fw 1447	10 μM	0.3 μM	0.45
Taq polimeraza (Kapa)	5 U/μl	0.04 U/μl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Re)	/	/	10.18
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P.A.2. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs4242382

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (μl)
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , Kapa)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, Fermentas)	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv	10 μM	0.2 μM	0.3
Prajmer Fw	10 μM	0.2 μM	0.3
Taq polimeraza (Kapa)	5 U/μl	0.04 U/μl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Re)	/	/	10.48
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P.A.3. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs6983267

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , Kapa)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, Fermentas)	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv	10 μM	0.2 μM	0.3
Prajmer Fw	10 μM	0.2 μM	0.3
Taq polimeraza (Kapa)	5 U/μl	0.04 U/μl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Re)	/	/	10.48
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P.A.4. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs7017300

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , Kapa)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, Fermentas)	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv	10 μM	0.2 μM	0.3
Prajmer Fw	10 μM	0.2 μM	0.3
Taq polimeraza (Kapa)	5 U/μl	0.04 U/μl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Re)	/	/	10.48
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>



P.A.5. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs7837688

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , Kapa)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, Fermentas)	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv	10 μM	0.3 μM	0.45
Prajmer Fw	10 μM	0.3 μM	0.45
Taq polimeraza (Kapa)	5 U/μl	0.04 U/μl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Re)	/	/	10.18
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P.A.6. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs7501939

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , Kapa)	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, Fermentas)	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv	10 μM	0.2 μM	0.3
Prajmer Fw	10 μM	0.2 μM	0.3
Taq polimeraza (Kapa)	5 U/μl	0.04 U/μl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Re)	/	/	10.48
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P.A.7. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs3760511

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , <i>Kapa</i> )	10X	1X	1.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, <i>Fermentas</i> )	10 mM	200 μM	0.3
Prajmer Rv	10 μM	0.3 μM	0.45
Prajmer Fw	10 μM	0.3 μM	0.45
Taq polimeraza ( <i>Kapa</i> )	5 U/μl	0.04 U/μl	0.12
DNK	/	/	2
Dejonizovana voda (Re)	/	/	10.18
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P.A.8. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičku varijantu rs1799983

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
PCR pufer A (sadrži 15 mm MgCl <sub>2</sub> , <i>Kapa</i> )	10X	1X	2.5
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, <i>Fermentas</i> )	10 mM	200 μM	0.5
Prajmer Rv	10 μM	0.2 μM	0.5
Prajmer Fw	10 μM	0.2 μM	0.5
Taq polimeraza ( <i>Kapa</i> )	5 U/μl	0.04 U/μl	0.2
DNK	/	/	5
Dejonizovana voda (Re)	/	/	15.8
<b>Ukupno</b>			<b>25</b>

P.A.9. Sastav PCR smeše za amplifikaciju regiona koji okružuje genetičke varijante u promotorskom regionu gena *NOS3*

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
PCR puffer 10X ATG ( <i>Roche</i> )	10X	1X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	3
Dezoksiribonukleotidi (dNTPs, <i>Fermentas</i> )	10 mM	200 μM	1
Prajmer Rv	10 μM	5 ρM	5
Prajmer Fw	10 μM	5 ρM	5
Taq polimeraza ( <i>ATG, Roche</i> )	5 U/μl	0.03	0.5
DNK	/	/	5
Dejonizovana voda (Re)	/	/	25.7
<b>Ukupno</b>			<b>50</b>

## Prilog B

### P B.1. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs1447295 metodom RFLP

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
NEB puffer 1 ( <i>New England Biolabs</i> )	10X	1X	1.5
HpyCh4IV	10U/µl	1U/15µl	0.1
PCR rs1447295	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.4
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

### P B.2. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs4242382 metodom RFLP

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
NEB puffer 4 ( <i>New England Biolabs</i> )	10X	1X	1.5
Cac8I	5U/µl	1U/15 µl	0.2
PCR rs4242382	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.3
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

### P B.3. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs6983267 metodom RFLP

Komponente	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
NEB puffer 1 ( <i>New England Biolabs</i> )	10X	1X	1.5
Tsp45I	4U/µl	1U/15 µl	0.25
PCR rs6983267	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.1
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P B.4. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs7017300 metodom RFLP

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (µl)</b>
NEB puffer 3 ( <i>New England Biolabs</i> )	10X	1X	1.5
BseYI	5U/µl	1U/15 µl	0.2
PCR rs7017300	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.3
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P B.5. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs7837688 metodom RFLP

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (µl)</b>
Tango puffer ( <i>Fermentas</i> )	10X	1X	1.5
TatI	5 U/µl	1 U/15 µl	0.2
PCR rs7837688	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.3
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P B.6. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs7501939 metodom RFLP

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (µl)</b>
Tango puffer ( <i>Fermentas</i> )	10X	1X	1.5
TaaI	5 U/µl	1 U/15 µl	0.2
PCR rs1447295	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.3
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P B.7. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs3760511 metodom RFLP

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
NEB puffer 1 ( <i>New England Biolabs</i> )	10X	1X	1.5
HpyCh4V	5 U/μl	1U/15 μl	0.2
PCR rs3760511	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.3
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

P B.8. Sastav smeše za genotipizaciju genetičke varijante rs1799983 metodom RFLP

<b>Komponente</b>	<b>Osnovna koncentracija</b>	<b>Finalna koncentracija</b>	<b>Zapremina (μl)</b>
NEB puffer 1 ( <i>Fermentas</i> )	10X	1X	1.5
MboI	10 U/μl	1 U/15 μl	0.1
PCR rs1799983	/	/	10
Dejonizovana voda (Re)	/	/	3.4
<b>Ukupno</b>			<b>15</b>

Z A P I S N I K

sa sastanka Etičkog odbora održanog 11.02.2011.godine sa početkom u 13:00 časova u prostorijama Biblioteke Ustanove

Prisutni članovi:

- Prim.dr V.Diligenski, predsednik, Klinika za psihijatriju KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“ Načelnik odeljenja za kliničku psihijatriju sa psiho farmakološkom jedinicom
- Dr sci med Biljana Penčić-Popović, zamenik predsednika, Klinika za internu medicinu KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“, Odeljenje kardiologije
- Prim.dr sci med Dragana Kuljić-Obradović, član, Upravnik Bolnice za neurologiju KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“
- Dr Vladislav Pešić, član, Klinika za urologiju KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“, Stacionarno I odeljenje
- Mirko Mrkić, član, advokat

Odsutni članovi:

- Prim.dr sci med Berislav Vekić, član, Klinika za hirurgiju KBC „Dr Dragiša Mišović – Dedinje“, Načelnik stacionarnog odeljenja I
- Jovanka Zečević, član, advokat

Posle glasanja članovi Etičkog odbora su doneli sledeću

O D L U K U

Usvaja se Molba za saglasnost za učestovanje Prof.dr Vinke Vukotić u projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, evidencioni broj 173016: Analiza promena u strukturi genoma kod dijagnostički i prognostički parametar humanih bolesti.

Učešće KBC-a bi se sastojalo u uzimanju 4.5ml krvi pacijentima koji se operišu na bilo koji način zbog benigne hiperplazije prostate ili karinoma prostate a kod kojih ćemo imati ili već imamo histopatološki nalaz.

Dostavljena je sledeća dokumentacija:

- Sinopsis projekta u kome je Prof.dr Vinka Vukotić jedan od članove
- Saglasnost koju bi pacijenti potpisivali

Etički odbor KBC "Dr Dragiša Mišović – Dedinje" radi po principima GCP/ICH.

ZAPISNIK VODILA

*Ljiljana Marčetić*  
Ljiljana Marčetić

PREDSEDNIK ETIČKOG ODBORA,

Prof.dr Vladimir Diligenski



Dimitrija Tucovića 161, 11000 Belgrade, Serbia  
Tel. i fax: 2413-442, e-mail: etikain@nadlanu.com

**Members of the Ethics Board:**

Prof. dr Nada Dimković, Nephrologist  
Prof. dr Nada Barjaktarević, Specialist in human genetics  
Prof. dr Njegica Jojić, Gastroenterologist  
Prof. dr Ljubiša Nikolić, Ophthalmologist  
Dr Bojan Kovačević, Surgery  
Vukičević Zorica, Lawyer  
Mirković Zoran, Lawyer  
Suzana Nedelkov, Secretary

**ODLUKA ETIČKOG ODBORA**  
**Glavni istraživač: Dr Nebojša Jeremić**

**U četvrtak, 01.07.2010.** god. održan je sastanak Etičkog odbora kome su prisustvovali: Prof. dr Nada Dimković, predsednik, Prof. dr Njegica Jojić, član, Prof. dr Ljubiša Nikolić, član, Dr Bojan Kovačević, član, Zorica Vukičević, član, Suzana Nedelkov, sekretar i zapisničar.

Dr Nebojša Jeremić je dostavio Molbu za razmatranje etičke podobnosti studije koju će izvoditi u saradnji sa Fakultetom za molekularnu biologiju tako što će se pacijentima koji boluju od karcinoma prostate i leče se na našem Odeljenju za urologiju, uzimati uzorak od 5 ml krvi u Na-citratu. Iz uzorka će se izolovati DNK da bi se ustanovilo prisustvo polimorfizama.

Naziv studije je: „**Polimorfizam u 8q regionu humanog hromozoma kao prognostički parametar za progresiju karcinoma prostate**“.

S obzirom da je cilj gore navedene studije da poboljša prognostičke parametre kod već obolelih osoba i da omogući skrining i prevenciju kod zdrave populacije muškaraca, **Etički odbor u skladu sa principima i načelima ICH-GCP odobrava izvođenje studije.**



Predsednik Etičkog odbora  
Prof. dr Nada Dimković

Datum: 02.07.2010.

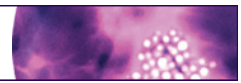


## **Stručna biografija**

Ana Branković rođena je 09. marta 1979. godine u Beogradu, gde je stekla osnovno i srednje obrazovanje. Diplomirala je 2007. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) sa prosečnom ocenom 8.14. Diplomski rad pod naslovom „Uticaj mutacija na rezistenciju na antiretroviralnu terapiju kod pacijenata obolelih od HIV-a“ odbranila je 06.07.2007. godine, sa ocenom 10. Doktorske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija, smer Molekularna biologija eukariota upisala je 2008. godine.

Nakon završetka fakulteta, volontirala je u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Laboratoriji za humanu genetiku i prenatalnu dijagnostiku Kliničko-bolničkog centra „Zvezdara“ u Beogradu. Od 2008. godine zaposlena je na Kriminalističko-policijskoj akademiji, Beograd kao saradnik u nastavi, a 2009. godine birana je u zvanje asistenta.

Do sada je publikovala jedan rad u međunarodnom časopisu kategorije M22, jedan rad u međunarodnom časopisu kategorije M23 i jedan rad u časopisu nacionalnog značaja. Autor ili koautor je dva saopštenja na kongresima međunarodnog značaja štampanih u izvodu i pet saopštenja na kongresima nacionalnog značaja štampanih u celini. Koautor je i u dva poglavlja u monografiji i tematskom zborniku nacionalnog značaja.



## ORIGINAL ARTICLE

# Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population

Ana Branković<sup>\*1</sup>, Goran Brajušković<sup>\*</sup>, Zorana Nikolić<sup>\*</sup>, Vinka Vukotić<sup>†</sup>, Snežana Cerović<sup>‡</sup>, Dušanka Savić-Pavićević<sup>\*</sup> and Stanka Romac<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade, Serbia, <sup>†</sup>Department of Urology, Clinical Centre 'dr Dragiša Mišović', Belgrade, Serbia and <sup>‡</sup>Institute of Pathology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

INTERNATIONAL  
JOURNAL OF  
EXPERIMENTAL  
PATHOLOGY

doi: 10.1111/iep.12045

Received for publication: 13 July 2012  
Accepted for publication: 5 July 2013

**Correspondence:**

Goran Brajušković  
Faculty of Biology  
University of Belgrade  
Studentski Trg 16  
PO Box 52  
Belgrade 11000  
Serbia  
Tel./Fax: +381 11 2639 100  
E-mail: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

<sup>1</sup>Branković A. and Brajušković G. contributed equally to this work.

**SUMMARY**

Genome-wide association studies (GWAS) have identified over 46 SNPs associated with human prostate cancer (PCa). Some studies have shown correlation of the nitric oxide synthase (NOS) NOS3 gene polymorphisms with the risk and/or progression of PCa. This study aimed to evaluate the association of NOS3 gene polymorphisms (−786T>C, −764A>G, −714G>T, −690C>T, −649G>A and 894G>T) with PCa risk and progression. 150 patients with PCa, 150 patients with BPH and 100 age-matched healthy controls were recruited in this study. Genotyping of promoter polymorphisms was performed by bi-directional DNA sequencing, and for 894G>T by RFLP analysis. There was no significant association between the alleles and genotypes of these genetic variants and PCa risk. For −786T>C polymorphism, we found that C allele is associated with absence of metastases, assuming dominant genetic model ( $P = 0.049$ ; OR, 0.50; 95% CI, 0.25–1.00). It was found that, compared with NOS3 −690C>T variant CC genotype, CT and TT genotypes confer decreased risk of developing metastases (dominant model,  $P = 0.015$ , OR, 0.24; 95% CI, 0.07–0.88) and show association with low clinical tumour stage, compared with stages  $T_3$  and  $T_4$  (dominant model,  $P = 0.046$ , OR, 0.20; 95% CI, 0.04–1.02). Genetic variants −764A>G, −714G>T, −649G>A were not detected in our study group. There is evidence of an inverse correlation of the NOS3 894G>T minor allele with high serum PSA (>20 ng/ml) (dominant model,  $P = 0.013$ , OR, 0.37; 95% CI, 0.17–0.82). Our results suggest that NOS3 gene polymorphisms are genetic susceptibility factors for the progression of PCa and patient outcome.

**Keywords**

genetic variation, nitric oxide synthase, prostate cancer, single nucleotide polymorphism

**Introduction**

Prostate cancer (PCa) is a disease with considerable heterogeneity in biological aggressiveness and prognosis. Onset and progression of PCa involve accumulation of both genetic and epigenetic alterations (Konishi *et al.* 2005; Yu & Luo 2007). The incidence of PCa has a strong age, ethnic origin and geographical dependence (Hällström & Laiho 2008). Almost 899,000 PCa cases and 258,000 PCa deaths are estimated to have occurred in 2008 worldwide, with 72% of cases and 53% of deaths in developed countries (Center *et al.* 2012). Prostate cancer in Serbian

population shows increasing trend of newly discovered cases, from 662 in 1999 to 1.673 in 2009 (Vrdoljak *et al.* 2011; Cancer Registry of Central Serbia, Institute of Public Health of the Republic of Serbia 1999–2009). In the past decade, numerous studies analysed association of SNPs with the risk and/or progression of malignant diseases (Goh *et al.* 2012).

Nitric oxide (NO) is a pleiotropic molecule critical to a number of physiological and pathological processes (Mocellin *et al.* 2007). Nitric oxide synthases (NOSs) are a family of enzymes that catalyse the production of NO from L-arginine and L-citrulline amino acids (Forstermann *et al.* 1998).

Different members of the NOS family are encoded by separate genes. There are three known isoforms, two are constitutive (NOS1, NOS3) and the third is inducible (NOS2). NOS3 gene is located at 7q35–q36, and it is expressed in endothelial cells. The endothelial isoform is the primary signal generator in the control of vascular tone, insulin secretion and airway tone. Furthermore, it is involved in the regulation of cardiac function and angiogenesis (Grande *et al.* 2000). For the last 40 years, there is some experimental evidence showing that tumour growth and metastasis are dependent upon tumour angiogenesis (Gimbrone *et al.* 1972). Furthermore, there is evidence that tumour angiogenesis correlates with metastasis in invasive PCa (Weidner *et al.* 1993). Also, the production of endogenous NO is associated with apoptosis of tumorigenic cells (Salvucci *et al.* 2001; Torok *et al.* 2002; Wartenberg *et al.* 2003; Kim & Tannenbaum 2004).

Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in the NOS3 gene. Two common polymorphisms are –786T>C (rs2070744) and 894G>T (rs1799983), but there are also reported –1468T>A, –922G>A, –764A>G, –714G>T, –690C>T, –649G>A and 4a4b polymorphism (27-bp repeat, intron 4) (Wang & Wang 2000; Marangoni *et al.* 2008; Lee *et al.* 2009). These polymorphisms have a possible role in the pathogenesis of stroke (Howard *et al.* 2005), high blood pressure (Cruz-González *et al.* 2009; Niu & Qi 2011), decreased insulin sensitivity (Yoshimura *et al.* 2003), diabetic nephropathy (He *et al.* 2011), non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy (Sakai *et al.* 2007), coronary spasm (Nakayama *et al.* 1999), erectile dysfunction (Rosas-Vargas *et al.* 2004; Sinici *et al.* 2010), male infertility (Safarinejad *et al.* 2010) and carcinogenesis (Lala & Orucevic 1998).

The results of association studies have shown that several polymorphisms in NOS3 gene are associated with PCa (Lee *et al.* 2009). A common single nucleotide genetic variant located in exon 7 (894G>T) of NOS3 gene, results in an amino acidic substitution at position 298 (Glu298Asp), which is implicated in low NOS3 level due to reduced protein stability (Tesauro *et al.* 2000). The wild type genotype at position 894 was identified as a NO-related genetic factor predictive of advanced disease and bone metastasis (Medeiros *et al.* 2002).

Earlier reports showed that the incorporation of the C allele at position –786 creates a binding site for replication protein A1 (RPA1) (Miyamoto *et al.* 2000) and reduces promoter activity (Nakayama *et al.* 1999). At the same time, the incorporation of the C allele is associated with increased levels of NOS3 transcripts in the peripheral blood of presurgical samples from patients with PCa. These results identify –786T>C polymorphism as the most important promoter alteration of the NOS3 gene that may affect the PCa progression, but not its occurrence (Marangoni *et al.* 2008).

Therefore, in the present study, we examined the potential association of 894G>T and promoter polymorphisms of the NOS3 gene with prostate cancer in Serbian population.

## Methods

### Patients

The NOS3 polymorphisms were genotyped in 303 consecutively enrolled patients, of which 150 patients with sporadic PCa (mean age: 69.8 years; range: 45–96 years) and 150 patients with benign prostate hyperplasia (BPH) (mean age: 68.7 years; range: 33–85 years) who were treated at Clinical Centre ‘dr Dragiša Mišović’, Belgrade, Serbia, in the period from 2009 to 2011. Three cases were excluded because of the lack of biopsy results. All patients were diagnosed with PCa confirmed by histopathological examination of specimens obtained by transrectal ultrasound (TRUS) biopsies, transurethral resection of the prostate and radical prostatectomy (RP). Grading was established according to the Gleason score (GS) differentiation system (Gleason & Mellinger 1974). Blood prostate-specific antigen (PSA) levels were determined using Hybritech monoclonal immunoassay (Beckman Hybritech assay; Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA), with cut-off value of 4.0 ng/μl (Catalona *et al.* 1994). One hundred healthy volunteers (mean age: 67.8 years; range: 58–83 years) with normal PSA, normal DRE and no previous personal and family history of PCa nor BPH comprised the control group. Controls were recruited after passing standard annual physical examination. This study was approved by the Ethics Committee of Clinical Centre ‘dr Dragiša Mišović’, Belgrade, Serbia.

The risk of progression was determined using two classification systems: one proposed by D’Amico *et al.* 1998 and the other by Medeiros *et al.* 2002. According to D’Amico *et al.* recommendations, PCa patients were divided into three groups with low risk (PCa patients with PSA ≤10 ng/ml, clinical stage ≤ T2a, and Gleason score ≤6), medium risk (PCa patients with PSA from 10–20 ng/ml, or clinical stage T2b-c, or Gleason score 7) and high risk (PCa patients with PSA >20 ng/ml, or clinical stage ≥ T3, or Gleason score ≥8) (D’Amico *et al.* 1998). Following the instructions of Medeiros *et al.*, patients were stratified into two groups: with high risk (Gleason ≥7, or advanced clinical stage (T3 and T4, or presence of bone metastasis)) and low risk of cancer progression (low grade, early stage and absence of bone metastasis).

Peripheral blood samples were collected in vacutainer tubes containing Na-citrate and maintained at 4 °C. All samples were obtained with the informed consent of participants before their inclusion in the study.

### Methods

Genomic DNA was extracted from 200 μl of peripheral blood using the QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the supplier’s instructions.

*Amplification and genotyping of the promoter polymorphisms.* The presence of the –786T>C, –764A>G, –714G>T, –690C>T and –649G>A polymorphisms in the 5'-flanking region of the NOS3 gene was determined by

PCR amplification with the primers 5'-ATG CTG CCA CCA GGG CAT CA-3' and 3'-GTC CTT GAC TCT GAC ATT AGG G-5' (Nakayama *et al.* 1999). A volume of 50 µl was used for each PCR reaction, which contained five pmoles of both primers, 200 µM of each dNTP (deoxyribonucleotide triphosphate), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub> and 1.5 U Taq DNA polymerase (AmpliTaq Gold; Roche, Basel, Switzerland) with 5 µl of genomic DNA (about 10–20 ng DNA). Temperature profile was as follows: 3 min at 97 °C, 35 cycles of 95 °C for 60 s, 51 °C for 60 s, and 72 °C for 60 s and final extension 10 min at 72 °C. The amplified fragments were separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel with ethidium bromide and purified using QIAquick PCR Purification Kit (QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen, Hilden, Germany). Purified PCR samples were used in sequencing reaction using BigDyeTerm v1.1 CycleSeq Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with reverse primer. Afterwards, the products of sequencing reaction were purified using EDTA/ethanol purification (Wallis & Morrell 2011) and analysed by capillary gel electrophoresis in genetic analyzer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

**RFLP analysis for NOS3 894G>T polymorphism.** Genotypization of NOS3 894G>T polymorphism was performed by RFLP analysis with forward and reverse primers (5'-CAT GAG GCT CAG CCC CAG AAC-3' and 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3') (Wilcox *et al.* 1997). A volume of 25 µl for PCR reactions contained 0.2 mM of both primers, 200 µM of each dNTP and 1 U Taq DNA polymerase (Taq polymerase, Kappa) with 5 µl of genomic DNA. After initial denaturation at 97 °C for 3 min PCR reactions were run for 35 cycles: 95 °C for 60 s, 54 °C for 60 s, and 72 °C for 60 s; and final extension 10 min at 72 °C.

The products of PCR amplification were incubated at 37 °C overnight with 1 U of the restriction enzyme *MboI* (*Fermentas*). Digested fragments' lengths were 119 bp and 87 bp for TT genotype. The restricted fragments were separated on 3% agarose gels with ethidium bromide.

Ten randomly selected samples were analysed by capillary gel electrophoresis as a control of RFLP analysis.

**Statistical analyses.** Analyses of data were performed using statistical software SPSS for Windows (Version 17.0), SNPStats software (Catalan Institute of Oncology, Barcelona, Spain) and PLINK statistical software (Purcell *et al.* 2007). Logistic regression analysis was used to compare categorical variables. A 5% level of significance was used in the analysis. Exact test implemented in PLINK was used to determine whether experimental observations departed from Hardy–Weinberg equilibrium (Purcell *et al.* 2007). For each SNP, potential dominant effects were evaluated by combining homozygous and heterozygous minor allele carriers for comparison with the reference group. The odds ratio (OR) and its 95% confidence interval (CI) were calculated as the measure of the association of NOS3 polymorphisms genotypes with PCa risk. Results were adjusted for the age confounder.

## Results

### Patients characteristics

This study was performed on the groups of 150 PCa patients, 150 BPH patients and 100 healthy control subjects. The clinical and histopathological characteristics of study groups are shown in Table 1.

### Genotyping

The distributions of NOS3 894G>T, –786T>C and –690C>T genotypes among cases of patients with PCa, BPH and controls are shown in Table 2. These distributions were consistent with Hardy–Weinberg equilibrium. There was no significant association between the alleles and genotypes of these genetic variants and PCa risk.

Next, we compared the minor allele frequencies in the probands with the values of standard prognostic parameters for PCa progression. Table 3 displays the NOS3 894G>T, –786T>C and –690C>T genotype distribution towards standard prognostic parameters and the risk of progression in PCa patients. There is evidence of an inverse correlation of the NOS3 894G>T minor allele with high serum PSA (>20 ng/ml) (dominant model,  $P = 0.013$ , OR, 0.37; 95% CI, 0.17–0.82).

For –786T>C polymorphism, we found that carriers of minor allele have 50% reduced risk of developing metastases (dominant model,  $P = 0.049$ ; OR, 0.50; 95% CI, 0.25–1.00).

Furthermore, a statistically significant difference was noted in the –690 C>T genotype distribution between patients with and without metastases (dominant model,  $P = 0.015$ , OR, 0.24; 95% CI, 0.07–0.88). We also observed that combined genotypes CT and TT confer the

**Table 1** The clinical and histopathological characteristics

Characteristics	PCa		
	patients	BPH patients	Controls
Number	150	150	100
Age	69.8 (45–96)	68.7 (33–85)	67.8 (58–83)
Serum PSA (ng/ml)	0–10	49	124
	10–20	39	20
	>20	62	6
Tumour stage	T <sub>1</sub>	28	–
	T <sub>2</sub>	72	–
	T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>	50	–
Gleason score	<7	71	–
	=7	56	–
	>7	22	–
Metastasis	Absence	95	–
	Presence	55	–
Risk of progression (D'Amico <i>et al.</i> 1998)	Low	81	–
	Medium	55	–
	High	14	–
Risk of progression (Medeiros <i>et al.</i> 2002)	Low	55	–
	High	95	–

**Table 2** Distribution of the genotype of NOS3 894G>T, -786T>C and -690C>T polymorphisms in patients with PCa, BPH and control subjects

	No. of PCa (%)	No. of BPH (%)	P-value*	OR <sup>†</sup> (95% CI)	No. of controls (%)	P-value*	OR <sup>†</sup> (95% CI)
894G>T							
Genotype							
GG	76 (50.67)	78 (52)		1 (referent)	54 (54)		1 (referent)
GT	65 (43.33)	59 (39.33)	0.62	1.13 (0.70–1.81)	40 (40)	0.60	1.15 (0.68–1.95)
TT	9 (6)	13 (8.67)	0.46	1.71 (0.29–1.76)	6 (6)	0.89	1.08 (0.36–3.23)
Alleles							
G	217 (72.33)	215 (71.67)		0.97 (0.67–1.39)	148 (74.00)		1.10 (0.72–1.68)
T	83 (27.67)	85 (28.33)	0.85		52 (26.00)	0.65	
-786T>C							
Genotype							
TT	54 (36)	57 (38)		1 (referent)	34 (34)		1 (referent)
TC	68 (45.33)	73 (48.66)	0.95	0.98 (0.60–1.62)	51 (51)	0.69	0.89 (0.50–1.57)
CC	28 (18.67)	20 (13.33)	0.23	1.53 (0.77–3.05)	15 (15)	0.60	1.22 (0.57–2.64)
Alleles							
T	176 (58.67)	187 (62.33)		1.17 (0.84–1.61)	119 (59.50)		1.06 (0.74–1.53)
C	124 (41.33)	113 (37.67)	0.36		81 (40.50)	0.74	
-690C>T							
Genotype							
CC	130 (86.67)	130 (86.67)		1 (referent)	85 (85)		1 (referent)
CT	19 (12.67)	20 (13.33)	0.89	0.96 (0.49–1.88)	14 (14)	0.87	0.94 (0.44–1.99)
TT	1 (0.66)	0 (0)	0.24	NA (0.00–NA)	1 (1)	0.73	0.61 (0.04–9.91)
Alleles							
C	279 (93.00)	280 (93.33)		1.06 (0.56–2.02)	184 (92.00)		1.15 (0.46–1.77)
T	21 (7.00)	20 (6.33)	0.86		16 (8.00)	0.77	

\*Logistic regression for the difference in genotype distributions and allelic frequencies between the PCa and BPH patients/controls, adjusted for age. <sup>†</sup>Odds Ratios adjusted for age. P-values less than 0.05 were considered significant.

reduced risk of high tumour stage ( $T_3$ ,  $T_4$ ) (dominant model,  $P = 0.046$ , OR, 0.20; 95% CI, 0.04–1.02).

Other promoter polymorphisms (-764A>G, -714G>T, -649G>A) are found to be monomorphic in Serbian population.

Capillary gel electrophoresis of ten per cent of randomly selected samples confirmed the results of RFLP analysis.

## Discussion

Molecularly, PCa cells carry multiple genetic and epigenetic alterations that generate malignant phenotype capable of uncontrolled growth, avoiding apoptosis and invasion – metastasis to other organs (Dasgupta *et al.* 2012). Recently, genome-wide association studies (GWAS) have identified over 46 SNPs associated with human PCa (Taylor *et al.* 2010; Goh *et al.* 2012).

Earlier report suggests that NO may play opposing roles in tumour growth and metastasis (Lala & Orucevic 1998). Alonso *et al.* reported that NOS3 mRNA levels from patients' blood show significant differences between PCa and BPH groups, with an occurrence chance for PCa 5.8-fold higher than BPH disease (Alonso *et al.* 2009). Furthermore, Marangoni *et al.* have shown that the incorporation of the -786T>C minor allele is associated with the increased levels of NOS3 transcripts (Marangoni *et al.* 2008).

The first study involving -786 T>C polymorphism showed that this promoter alteration may affect the PCa

progression, but not its occurrence (Marangoni *et al.* 2008). More recent study reported a significant difference in both genotype distribution and allele frequency between PCa patients and healthy controls, showing that patients with NOS3 TC and CC genotype have a 2.43-fold and 3.62-fold increased risk of PCa, respectively (Safarinejad *et al.* 2012). Similarly to the results of Marangoni *et al.*, our study shows no association between the incorporation of -786T>C minor allele and the increased risk of PCa, but unlike in their study, there is an association of this allele with the decreased risk of metastasis.

We have also shown that -690C>T minor allelic variant arises only in presence of -786T>C minor allele. This is in concordance with the earlier studies (Marangoni *et al.* 2008). Also, we found a significant difference in -690C>T genotype distributions between patients with high tumour stage ( $P = 0.046$ ), as well as between patients with and without metastasis, assuming dominant genetic model ( $P = 0.015$ ).

Along with promoter polymorphisms, our study involved the polymorphism 894G>T in exon 7. One of the previous studies demonstrated strong association between 894G>T GG genotype and advanced disease with bone metastases (Medeiros *et al.* 2002). Our results showed that 894G>T minor allele is in negative correlation with the increased serum PSA (>20 ng/ml) ( $P = 0.013$ ). 894G>T substitution results in an amino acid alteration, glutamic to aspartic acid, which leads to lower protein level (Senthil *et al.* 2005). A study involving NOS3 polymorphisms in coronary artery

**Table 3** Association of NOS3 894G>T, -786T>C and -690C>T polymorphisms with values of standard prognostic parameters and the risk of PCa progression

	894G>T genotype			-786T>C genotype			-690C>T genotype		
	GG	GT+TT	TT	TC+CC	CC	CT+TT	CC	CT+TT	OR (95% CI)*
Age, mean ± SD	68.9 ± 8	70.6 ± 8.1	70.5 ± 7.9	69 ± 8.3	70 ± 8.3	67.6 ± 9.1			
Serum PSA (ng/ml)									
<10	19	30	16	33		9			1 (referent)
10-20	19	20	12	27	0.96	6	0.98 (0.39-2.47)		0.63
>20	38	24	26	36	0.34	5	0.68 (0.31-1.50)		0.11
Tumour stage									
T <sub>1</sub>	13	15	10	18		5			1 (referent)
T <sub>2</sub>	33	39	22	50	0.69	12	1.21 (0.48-3.06)		0.78
T <sub>3</sub> , T <sub>4</sub>	30	20	22	28	0.37	3	0.64 (0.24-1.71)		0.046
Gleason score									
<7	33	38	26	45		10			1 (referent)
=7	30	27	19	38	0.72	9	1.14 (0.55-2.38)		0.82
>7	13	9	9	13	0.84	1	0.90 (0.33-2.46)		0.22
Metastasis									
Absence	45	50	29	66		17	0.50 (0.25-1.00)		0.24 (0.07-0.88)
Presence	31	24	25	30	0.049	3			
Risk of progression (D'Amico et al.)									
Low	5	9	5	9		2			1 (referent)
Medium	25	30	14	41	0.5	13	1.56 (0.44-5.52)		0.46
High	46	35	35	46	0.6	5	0.73 (0.22-2.37)		0.33
Risk of progression (Medeiros et al.)									
Low	24	31	18	37		10	0.79 (0.39-1.59)		0.52 (0.20-1.34)
High	52	43	36	59	0.50	10			0.18

\*Adjusted for age. †Statistically significant results are shown in bold.

disease reported that plasma NO level significantly depends on the genotypes of the 894G>T polymorphism; plasma NO was increased in those individuals with 894T allelic variant, but only in the control group (Yoon *et al.* 2000). On the other hand, study on human umbilical vein endothelial cell culture (HUVAC) reported that rare allele TT genotype is associated with low protein level (Senthil *et al.* 2005). They argued that 894T allelic variant in exon 7 could also affect bioavailable NOS3 by reducing protein stability. This argument was based on earlier study that had observed, beside regular 135 kDa band, nonspecific 100 kDa band in cell lysates from three primary human endothelial cell lines, one with the 894TT genotype and two with the 894GT genotype, but not in the one with the 894GG genotype (Tesauro *et al.* 2000). Unlike the earlier results (Medeiros *et al.* 2002, 2002; Marangoni *et al.* 2006), and ours as well, a recent study showed no association with PCa incidence nor PCa clinical and pathological features (Safarinejad *et al.* 2012). One explanation for the differences that have been observed is that they arise from the different ethnic backgrounds of the study populations. Thus earlier studies included patients from Portugal (Medeiros *et al.* 2002, 2002) and Brasil (Marangoni *et al.* 2006), whereas our study was performed on patients from Serbia. A further study, which also showed with opposing results (Safarinejad *et al.* 2012) was conducted on an Iranian population.

In summary, the analysed polymorphisms are not associated with PCa risk. 894T allele is inversely correlated with increased serum PSA. -786T>C and -690C>T minor allele carriers were found to have the reduced risk of developing metastases. Also, the obtained results show negative correlation of -690C>T combined CT and TT genotypes with high tumour stage.

We are fully aware that the present study is not without limitations. Because of the small subgroups of PCa patients, conclusions drawn from these subanalyses must be interpreted with caution. Since the controls were volunteers, they may not be representative of the general population. Finally, as this study is restricted to one particular population group, the Serbian population, it is not clear that these results can be generalized to other populations, since there may be important ethnic and cultural variations that need to be taken into account.

## Conclusion

Our results indicate that NOS3 894G>T, -786T>C and -690C>T genetic polymorphisms are not associated with prostate cancer risk in Serbian population but may be relevant as prognostic factors for the progression of prostate cancer and patients' outcome.

## Acknowledgements

The research was supported by the Ministry of Education and Science of Serbia (Project no. 173016). The authors wish to express their gratitude to Prof. Vladimir Filipović

and Prof. Đuro Mišljenović (Faculty of Mathematics, University of Belgrade) who were abundantly helpful and offered invaluable assistance for statistical analysis.

## References

- Cancer Registry of Central Serbia, Institute of Public Health of the Republic of Serbia 1999–2009. Available at: <http://www.batut.org.rs/> (Accessed 2 March 2012).
- Alonso V., Neves A.F., Marangoni K. *et al.* (2009) Gene expression profile in the peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Detect. Prev.* **32**, 336–337.
- Catalona W.J., Hudson M.A., Scardino P.T. *et al.* (1994) Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J. Urol.* **152**, 2037–2042.
- Center M.M., Jemal A., Lortet-Tieulent J. *et al.* (2012) International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur. Urol.* **61**, 1079–1092.
- Cruz-González I., Corral E., Sánchez-Ledesma M., Sánchez-Rodríguez A., Martín-Luengo C., González-Sarmiento R. (2009) Association between -T786C NOS3 polymorphism and resistant hypertension: a prospective cohort study. *BMC. Cardiovasc. Disord.* **9**, 35.
- D'Amico A.V., Whittington R., Malkowicz S.B. *et al.* (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* **280**, 969–974.
- Dasgupta S., Srinidhi S., Vishwanatha J.K. (2012) Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: molecular insights and future challenges. *J. Carcinog.* **11**, 4–17.
- Forstermann U., Boissel J.P., Kleinert H. (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB. J.* **12**, 773–790.
- Gimbrone M.A., Leapman S., Cotran R.S., Folkman J. (1972) Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* **136**, 261–276.
- Gleason D.F. & Mellinger G.T. (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* **111**, 58–64.
- Goh C.L., Schumacher F.R., Easton D. *et al.* (2012) Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications. *J. Intern. Med.* **271**, 353–365.
- Grande M., Carlstrom K., Stege R., Pousette A., Faxen M. (2000) Estrogens increases the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA level in LNPCa human prostate carcinoma cells. *Prostate* **45**, 232–237.
- Hällström T.M. & Laiho M. (2008) Genetic changes and DNA damage responses in the prostate. *Prostate* **68**, 902–918.
- He Y., Fan Z., Zhang J. *et al.* (2011) Polymorphisms of eNOS gene are associated with diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Mutagenesis* **26**, 339–349.
- Howard T.D., Giles W.H., Xu J. *et al.* (2005) Promoter polymorphisms in the nitric oxide synthase 3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young black women. *Stroke* **36**, 1848–1851.
- Kim J.E. & Tannenbaum S.R. (2004) S-Nitrosation regulates the activation of endogenous procaspase-9 in HT-29 human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 9758–9764.
- Konishi N., Shimada K., Ishida E., Nakamura M. (2005) Molecular pathology of prostate cancer. *Pathol. Int.* **55**, 531–539.

- Lala P.K. & Orucevic A. (1998) Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metast. Rev.* 17, 91–106.
- Lee K.M., Kang D., Park S.K. *et al.* (2009) Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 30, 621–625.
- Marangoni K., Neves A.F., Cardoso A.M., Santos W.K., Faria P.C., Goulart L.R. (2006) The endothelial nitric oxide synthase Glu-298-Asp polymorphism and its mRNA expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Detect. Prev.* 30, 7–13.
- Marangoni K., Araujo T.G., Neves A.F., Goulart L.R. (2008) The -786T>C promoter polymorphism of the NOS3 gene is associated with prostate cancer progression. *BMC Cancer.* 8, 273.
- Medeiros R.M., Morais A., Vasconcelos A. *et al.* (2002) Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin. Cancer Res.* 8, 3433–3437.
- Miyamoto Y., Saito Y., Nakayama M. *et al.* (2000) Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a 786T→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2629–2637.
- Mocellin S., Bronte V., Nitti D. (2007) Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med. Res. Rev.* 27, 317–352.
- Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. *et al.* (1999) T<sup>-786T</sup>→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99, 2864–2870.
- Niu W. & Qi Y. (2011) An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension. *PLoS ONE* 6, e24266. Epub 2011 Sep 2.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K. *et al.* (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.
- Rosas-Vargas H., Coral-Vasquez R.M., Tapia R., Borja J.L., Salas R.A., Salamanca F. (2004) Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism is a risk factor for erectile dysfunction in the Mexican Mestizo population. *J. Androl.* 25, 728–732.
- Safarinejad M.R., Shafiei N., Safarinejad S. (2010) The role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 720–727.
- Safarinejad M.R., Safarinejad S., Shafiei N., Safarinejad S. (2012) Effects of the T-786C, G894T, and intron 4 VNTR (4a/b) polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene on the risk of prostate cancer. *Urol. Oncol.* 31, 1132–1140.
- Sakai T., Shikishima K., Matsushima M., Kitahara K. (2007) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 288–292.
- Salvucci O., Carsana M., Bersani I., Tragni G., Anichini A. (2001) Antiapoptotic role of endogenous nitric oxide in human melanoma cells. *Cancer Res.* 61, 318–326.
- Senthil D., Raveendran M., Shen Y.H. *et al.* (2005) Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol.* 24, 218–224.
- Sinici I., Güven E.O., Serefoglu E., Hayran M. (2010) T-786C polymorphism in promoter of eNOS gene as genetic risk factor in patients with erectile dysfunction in Turkish population. *Urology* 75, 955–960.
- Taylor B.S., Schultz N., Hieronymus H. *et al.* (2010) Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11–22.
- Tesauro M., Thompson W.C., Rogliani P., Qi L., Chaudhary P.P., Moss J. (2000) Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate *vs.* glutamate at position 298. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 2832–2835.
- Torok N.J., Higuchi H., Bronk S., Gores G.J. (2002) Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9. *Cancer Res.* 62, 1648–1653.
- Vrdoljak E., Wojtukiewicz M.Z., Pienkowski T. *et al.* (2011) Cancer epidemiology in Central and South Eastern European countries. *Croat. Med. J.* 52, 478–487.
- Wallis Y. & Morrell N. (2011) Automated DNA sequencing. *Methods Mol. Biol.* 688, 173–185.
- Wang X.L. & Wang J. (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol. Genet. Metab.* 70, 241–251.
- Wartenberg M., Schallenberg M., Hescheler J., Sauer H. (2003) Reactive oxygen species-mediated regulation of eNOS and iNOS expression in multicellular prostate tumor spheroids. *Int. J. Cancer* 104, 274–282.
- Weidner N., Carroll P.R., Flax J., Blumenfeld W., Folkman J. (1993) Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* 143, 401–409.
- Wilcox J.N., Subramanian R.R., Sundell C.L. *et al.* (1997) Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2479–2488.
- Yoon Y., Song J., Hong S.H., Kim J.Q. (2000) Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin. Chem.* 46, 1626–1630.
- Yoshimura T., Hisatomi A., Kajihara S. *et al.* (2003) The relationship between insulin resistance and polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in patients with coronary artery disease. *J. Atheroscler. Thromb.* 10, 43–47.
- Yu Y.P. & Luo J.H. (2007) Pathological factors evaluating prostate cancer. *Histol. Histopathol.* 22, 1291–1300.



# Common Variants at 8q24 are Associated with Prostate Cancer Risk in Serbian Population

Ana S. Branković · Goran N. Brajušković · Jovan D. Mirčetić · Zorana Z. Nikolić · Predrag B. Kalaba · Vinka D. Vukotić · Saša M. Tomović · Snežana J. Cerović · Zoran A. Radojičić · Dušanka LJ Savić-Pavićević · Stanka P. Romac

Received: 6 December 2012 / Accepted: 20 February 2013 / Published online: 28 March 2013  
© Arányi Lajos Foundation 2013

**Abstract** Previous studies have shown correlation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) at 8q24 and prostate cancer (PCa) risk. This study aimed to evaluate possible association between genotypes and alleles of 8q24 polymorphisms (rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300, and rs7837688) and PCa risk and progression. 150 patients with PCa, 150 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH), and 100 healthy controls selected from the general population were recruited for this study. SNPs were genotyped by using PCR-RFLP analysis. There was a significant positive association between the A allele of the SNP rs4242382 and PCa risk

[PCa vs. BPH comparison,  $P=0.014$  for the best-fitting dominant model; odds ratio (OR) = 1.98; 95 % confidence interval (95%CI) 1.14–3.43]. We found evidence ( $P=0.0064$ ) of association between PCa risk and rs7017300 (heterozygote OR = 1.60; 95%CI 0.95–2.69) when comparing genotype distributions in PCa and BPH patients. The association between T allele rs7837688 and PCa risk was determined in PCa vs. BPH comparison with the best-fitting model of inheritance being log-additive ( $P=0.0033$ ; OR = 2.14, 95%CI 1.27–3.61). Odds ratio for carriers of rs6983267 TT genotype under recessive model of association with PCa was found to be 0.36 (PCa vs. control comparison,  $P=0.0029$ ; 95%CI 0.19–0.71). For rs1447295, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in BPH patients and controls. We found no association between parameters of PCa progression and five 8q24 SNPs. Locus 8q24 harbors genetic variants associated with PCa risk in Serbian population.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12253-013-9617-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Branković A. and Brajušković G. contributed equally to this work.

The research was supported by the Ministry of Education and Science of Serbia (Project no. 173016).

A. S. Branković · G. N. Brajušković (✉) · J. D. Mirčetić · Z. Z. Nikolić · P. B. Kalaba · D. L. Savić-Pavićević · S. P. Romac  
Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia  
e-mail: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

V. D. Vukotić  
Department of Urology, Clinical Centre “dr Dragiša Mišović”,  
Belgrade, Serbia

S. M. Tomović  
Clinical Department of Surgery, Clinical Centre “Zvezdara”,  
Belgrade, Serbia

S. J. Cerović  
Institute of Pathology, Military Medical Academy,  
Belgrade, Serbia

Z. A. Radojičić  
Faculty of Organizational Science, University of Belgrade,  
Belgrade, Serbia

**Keywords** Prostate cancer · Association study · Polymorphism · Single nucleotide polymorphism (SNP) · 8q24

## Introduction

Prostate cancer (PCa) is one of the most common cancers among men in the majority of Western countries [1]. PCa is the most commonly diagnosed cancer in American men, accounting for more than one third of all new cancer cases [2]. The only firmly established risk factors for PCa are age, family history and ethnicity [3]. An epidemiological puzzle is the geographical distribution of PCa. Substantial differences exist in age-adjusted incidence and mortality between countries in Eastern Asia and Northwestern Europe [4]. In Serbian population, PCa shows increasing trend of newly diagnosed cases, from 662 in 1999 to 1,673 in 2009 [5, 6].

Genome-wide association analyses have identified variants in seven most important chromosomal regions associated with the risk of PCa. These variants occur in five independent regions at 8q24, in one region at 17q12 and another at 17q24.3 [7]. Five regions at 8q24 are believed to harbor genes that confer susceptibility to PCa and/or regulatory sequences affecting expression of critical genes, but these hypotheses remain to be confirmed [8]. A meta-analysis conducted by *Liu et al.* through data obtained from a large number of genome-wide association studies (GWAS), demonstrated the moderate effects of 31 single nucleotide polymorphisms (SNPs) on PCa risk [9]. The analysis also confirmed that 8q24 is the most frequently gained chromosomal region in prostate tumors [9]. In their original study, *Amundadottir et al.* identified a region on chromosome 8q24 showing suggestive linkage to PCa in Icelandic families [10]. Further analysis of this region led to the identification of two common variants (rs1447295 and DG8S737) associated with PCa risk in European and African populations [11]. Afterwards, *Zheng et al.* confirmed the association of SNPs at all five 8q24 regions with PCa risk in Swedish population [8]. Associations of 8q24 variants with aggressive PCa and/or increased tumor grade have been reported, but are yet to be confirmed. In the present population-based case-control study, we tested the association between PCa risk and SNPs rs1447295, rs4242382, rs6983267, rs7017300, and rs7837688 at 8q24 in the population of Serbia.

## Materials and Methods

### Subjects

Five 8q24 polymorphisms were genotyped in 150 patients with PCa (mean age: 69 years and 10 months; range: 45–96) and 150 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) (mean age: 68 years and 8 months; range: 33–85 years) who were treated at Clinical Centre “dr Dragiša Mišović”, Belgrade, Serbia and Clinical Centre “Zvezdara”, Belgrade, Serbia, in the period from 2008 to 2011.

All patients were diagnosed with PCa confirmed by histopathologic examination of specimens obtained by transrectal ultrasound (TRUS) guided biopsies, transurethral resection of the prostate and radical prostatectomy (RP). Grading was established according to Gleason score (GS) differentiation system (range 2–10) [12]. Serum prostate-specific antigen (PSA) levels were determined using Hybritech monoclonal immunoassay (*Beckman Hybritech assay; Beckman Coulter, Inc.*, Fullerton, CA, USA), with the cutoff value of 4.0 ng/ml [13]. Patients with BPH were given a digital rectal examination (DRE) (compatible with BPH) and serum PSA analysis. One hundred healthy volunteers with normal PSA and normal DRE who had no previous history of PCa or BPH served as the control group.

The investigation was approved by the Ethics Committees of Clinical Centre “dr Dragiša Mišović” and Clinical Centre “Zvezdara”, Belgrade, Serbia.

Risk of progression was determined by using two classification systems: one proposed by *D’Amico et al* [14], and the other by *Medeiros et al* [15]. According to *D’Amico* criteria, PCa patients were divided into three groups: low risk (PSA  $\leq 10$  ng/ml, clinical stage  $\leq T2a$ , and Gleason score  $\leq 6$ ), medium risk (PSA from 10 ng/ml to 20 ng/ml or clinical stage T2b-c, or Gleason score 7), and high risk group (PSA  $\geq 20$  ng/ml, or clinical stage  $\geq T3$ , or Gleason score  $\geq 8$ ) [14]. Patients with metastases were added to high risk group. Following instructions of *Medeiros et al.*, patients were stratified into two groups: high risk (Gleason score  $\geq 7$ , or advanced clinical stage—T3 and T4, or presence of bone metastases), and low risk of cancer progression (low grade, early stage and absence of bone metastases) [16].

Peripheral blood samples were collected in vacutainer tubes containing Na-citrate, and maintained at 4 °C. All samples were obtained with the informed consent of the participants before their inclusion in the study.

### DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from 200  $\mu$ l of peripheral blood obtained from PCa and BPH patients and buccal swabs provided by control subjects by using QIAamp DNA Blood Mini Kit (*Qiagen*, Hilden, Germany) following the manufacturers’ instructions.

### Amplification of the Regions Surrounding Selected SNPs

The primer sets used for amplification of the regions surrounding selected SNPs are shown in Supplementary Table S1. Each PCR was carried out in a 15  $\mu$ l reaction mixture containing 0.3  $\mu$ M (for rs1447295 and rs7837688) or 0.2  $\mu$ M (for rs4242382, rs7017300 and rs6983267) of both primers (*Eurofins MWG Operon*, Huntsville, AL, USA), 200  $\mu$ M of each dNTP (deoxyribonucleoside triphosphate, *Fermentas*, Hanover, MD, USA), 1.5  $\mu$ l of 10X PCR buffer A (containing 15 mM MgCl<sub>2</sub>, *Kapa Biosystems*, Woburn, MA, USA), 2  $\mu$ l of genomic DNA (about 20 ng of DNA), 0.04 U/ $\mu$ l of Taq DNA polymerase (*Kapa Biosystems*, Woburn, MA, USA), and nuclease free water (*Serva*, Westbury, NY, USA). PCR amplification profiles are shown in Supplementary Table S2. The amplified fragments were separated by 1.5 % agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

### Genotyping

All five selected SNPs were genotyped by using PCR-RFLP analysis. 10  $\mu$ l of PCR products were digested at optimal temperature overnight with 1U of specific enzyme per single

reaction (15  $\mu$ l reaction mixture). Enzyme characteristics and lengths of digested PCR products are shown in Supplementary Table S3. Digested products were separated by 3 % agarose gel electrophoresis.

For each SNP, 15 random samples were chosen to be retyped by capillary gel electrophoresis in order to assess the validity of proper SNP analysis by PCR-RFLP method. Amplified fragments were purified by using QIAquick PCR Purification Kit, following manufacturers' instructions (*QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen*, Hilden, Germany). Purified PCR products were sequenced with BigDyeTerm v1.1 CycleSeq Kit (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). Afterwards, DNA sequencing reaction products were purified by using EDTA/ethanol purification method [16] and analyzed by capillary gel electrophoresis on ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

### Statistical Analysis

Descriptive statistics and exploratory analysis were used for data explanation. Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were evaluated by using exact test implemented in SNPStats software (*Catalan Institute of Oncology*, Barcelona, Spain). For each SNP, multiple logistic regression models were used to assess potential association with PCa risk (dominant, recessive, codominant, overdominant and log-additive). The best-fitting models were determined by using Akaike information

criterion (AIC). The odds ratio (OR) and its 95 % confidence interval (CI) were calculated as assessment measure of association between polymorphisms, genotypes and PCa risk.

In analyses of association between SNPs and PCa progression two-sided Pearson's chi-square test implemented in SPSS 17.0 (*SPSS Inc.*, Chicago, IL, USA) was used to assess *P* values for codominant, dominant and recessive inheritance models.

A 5 % level of significance was used in the analysis. Analyses of data were performed by using the computer software SPSS for Windows (Version 17.0, *SPSS Inc.*, Chicago, IL, USA) and SNPStats (*Catalan Institute of Oncology*, Barcelona, Spain).

### Results

The frequencies of genotypes of five polymorphisms at 8q24 were compared between groups of 150 PCa patients, 150 BPH patients and 100 healthy control subjects. The clinical characteristics of PCa and BPH patients and histopathological characteristics of PCa patients are shown in Table 1. The mean age at diagnosis was 69 years and 10 months (range, 45–96) for PCa patients and 68 years and 8 months (range, 33–85) for BPH patients.

The distribution of rs4242382, rs7017300, rs7837688 and rs6983267 genotypes among patients in both PCa and BPH

**Table 1** The clinical characteristics of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia and histopathological characteristics of patients with prostate cancer

Characteristics		PCa patients	BPH patients
Number		150	150
Mean age		69 years and 10 month (45 to 96)	68 years and 8 months (33 to 85)
Serum PSA	$\leq 10$ ng/ml	49	124
	10–20 ng/ml	39	20
	$\geq 20$ ng/ml	62	6
Tumor stage	T1	28	–
	T2	72	–
	T3 and T4	50	–
Gleason score	Gleason $< 7$	71	–
	Gleason = 7	56	–
	Gleason $> 7$	22	–
Metastases	Absent	95	–
	Present	55	–
Risk of progression ( <i>D'Amico et al.</i> )	High	14	–
	Medium	55	–
	Low	81	–
Risk of progression ( <i>Medeiros et al.</i> )	High	95	–
	Low	55	–

**Table 2** Association of five SNPs at 8q24 with prostate cancer risk, as assessed in comparison of genotype distributions between patients with prostate cancer and controls

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	OR (95 % CI)	P value	AIC
<b>rs1447295<sup>a</sup></b>	Codominant					
	CC	86 (57.3)	11 (11)	1		
	CA	61 (40.7)	82 (82)	<b>0.10 (0.05–0.19)</b>	< <b>0.0001</b> <sup>b</sup>	282
	AA	3 (2.0)	7 (7)	<b>0.05 (0.01–0.24)</b>		
	Dominant					
	CC	86 (57.3)	11 (11.0)	1	< <b>0.0001</b>	280.6
	CA+AA	64 (42.7)	89 (89.0)	<b>0.09 (0.05–0.19)</b>		
	Recessive					
	CC+CA	147 (98)	93 (93)	1	0.05	336.7
	AA	3 (2)	7 (7)	0.27 (0.07–1.07)		
	Overdominant					
	CC+AA	89 (59.3)	18 (18)	1	< <b>0.0001</b>	296.1
	CA	61 (40.7)	82 (82)	<b>0.15 (0.08–0.28)</b>		
Log-additive						
–	–	–	–	<b>0.13 (0.07–0.24)</b>	< <b>0.0001</b>	284
<b>rs4242382</b>	Codominant					
	GG	106 (70.7)	80 (80)	1		
	GA	42 (28.0)	20 (20)	1.58 (0.86–2.91)	0.11	338.2
	AA	2 (1.3)	0 (0.0)	NA (0.00–NA)		
	Dominant					
	GG	106 (70.7)	80 (80.0)	1	0.094	337.7
	GA+AA	44 (29.3)	20 (20.0)	1.66 (0.91–3.03)		
	Recessive					
	GG+GA	148 (98.7)	100 (100)	1	0.15	338.5
	AA	2 (1.3)	0 (0)	NA (0.00–NA)		
	Overdominant					
	GG+AA	108 (72)	80 (80)	1	0.15	338.4
	GA	42 (28)	20 (20)	1.56 (0.85–2.85)		
Log-additive						
–	–	–	–	1.70 (0.95–3.05)	0.068	337.2
<b>rs7017300</b>	Codominant					
	AA	100 (66.7)	84 (84.0)	1		
	AC	45 (30.0)	16 (16.0)	<b>2.36 (1.25–4.48)</b>	<b>0.0018</b>	329.9
	CC	5 (3.3)	0 (0.0)	NA (0.00–NA)		
	Dominant					
	AA	100 (66.7)	84 (84.0)	1	<b>0.0018</b>	330.8
	AC+CC	50 (33.3)	16 (16.0)	<b>2.62 (1.39–4.95)</b>		
	Recessive					
	AA+AC	145 (96.7)	100 (100)	1	<b>0.023</b>	335.3
	CC	5 (3.3)	0 (0)	NA (0.00–NA)		
	Overdominant					
	AA+CC	105 (70)	84 (84.0)	1	<b>0.01</b>	333.9
	AC	45 (30)	16 (16.0)	<b>2.25 (1.19–4.26)</b>		
Log-additive						
–	–	–	–	<b>2.63 (1.44–4.80)</b>	<b>8e-04</b>	329.2
<b>rs7837688</b>	Codominant					
	GG	101 (67.3)	82 (82.0)	1		
	GT	47 (31.3)	16 (16.0)	<b>2.38 (1.26–4.51)</b>	<b>0.02</b>	334.7
	TT	2 (1.3)	2 (2.0)	0.81 (0.11–5.89)		
	Dominant					
	GG	101 (67.3)	82 (82.0)	1	<b>0.009</b>	333.7

**Table 2** (continued)

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> value	AIC
<b>rs6983267</b>	GT+TT	49 (32.7)	18 (18.0)	<b>2.21 (1.20–4.08)</b>		
	Recessive					
	GG+GT	148 (98.7)	98 (98)	1	0.68	340.3
	TT	2 (1.3)	2 (2)	0.66 (0.09–4.78)		
	Overdominant					
	GG+TT	103 (68.7)	84 (84.0)	1	<b>0.0052</b>	332.7
	GT	47 (31.3)	16 (16.0)	<b>2.40 (1.27–4.53)</b>		
	Log-additive					
	–	–	–	<b>1.89 (1.07–3.33)</b>	<b>0.022</b>	335.3
	Codominant					
	GG	53 (35.3)	25 (25.0)	1		
	GT	80 (53.3)	49 (49.0)	0.77 (0.43–1.39)	<b>0.0081</b>	332.9
	TT	17 (11.3)	26 (26.0)	<b>0.31 (0.14–0.67)</b>		
	Dominant					
	GG	53 (35.3)	25 (25.0)	1	0.082	337.5
	GT+TT	97 (64.7)	75 (75)	0.61 (0.35–1.07)		
	Recessive					
GG+GT	133 (88.7)	74 (74.0)	1	<b>0.0029</b>	331.6	
TT	17 (11.3)	26 (26.0)	<b>0.36 (0.19–0.71)</b>			
Overdominant						
GG+TT	70 (46.7)	51 (51)	1	0.5	340.1	
GT	80 (53.3)	49 (49)	1.19 (0.72–1.97)			
Log-additive						
–	–	–	<b>0.58 (0.39–0.85)</b>	<b>0.0043</b>	332.4	

<sup>a</sup> Significant deviation from HWE

<sup>b</sup> Statistically significant results are shown in bold

groups, as well as among controls were compatible with Hardy-Weinberg equilibrium. For rs1447295, deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in groups of BPH patients and controls. For this reason, results regarding association of rs1447295 with PCa risk were not considered reliable, even though statistical significance was reached, and A allele was shown to confer reduced PCa susceptibility.

Table 2 shows genotype frequencies of 5 SNPs at 8q24 in PCa patients and controls, as well as the results of tests for association with PCa risk. Genotype distributions in PCa and BPH patients, together with the results of association tests regarding PCa risk are summarized in Table 3. Data concerning association of 8q24 SNPs with BPH risk are shown in Table 4.

When considering possible association between rs4242382 and PCa risk, the comparison of genotype frequencies in PCa patients and controls yielded no statistical significance for any genetic model tested. Nevertheless, the best-fitting log-additive model of association between A allele and PCa risk showed statistical trend ( $0.05 < P < 0.1$ ) of significance ( $P=0.068$ ; OR=1.70, 95%CI 0.95–3.05). When comparing genotype distributions in PCa and BPH patients, our results showed statistically significant association of rs4242382 with

PCa risk ( $P=0.047$ , for codominant model; GA heterozygote OR=1.97, 95%CI 1.12–3.44; AA homozygote OR=2.34, 95%CI 0.21–26.17). AIC score suggested dominant model as the best-fitting one ( $P=0.014$ ). Carriers of A allele were found to have 1.98 fold increased risk of PCa (95%CI 1.14–3.43) compared to non-carriers. No evidence of association between rs4242382 and BPH risk were obtained in our analysis ( $P=0.31$ , for the best-fitting recessive model).

Statistically significant difference in rs7017300 genotype frequencies was found between PCa patients and controls ( $P=0.0018$ , for codominant model). Minor allele C was shown to confer increased risk of PCa (heterozygote OR=2.36, 95%CI 1.25–4.48; homozygote OR not available due to lack of subjects with CC genotype in the control group). For PCa vs. controls comparison, log-additive model was selected as the best-fitting model of association between rs7017300 and PCa risk based on AIC score ( $P=8e-04$ ; OR=2.63, 95%CI 1.44–4.80). When comparing genotype distributions in PCa and BPH patients, association of C allele with PCa risk was confirmed ( $P=0.0064$ , for codominant model). According to AIC score, the best-fitting model was found to be codominant (heterozygote OR=1.60, 95%CI 0.95–2.69; homozygote OR not available due to lack of subjects with CC genotype in the group of

**Table 3** Association of five SNPs at 8q24 with prostate cancer risk, as assessed in comparison of genotype distributions between patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of BPH patients (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> value	AIC
<b>rs1447295<sup>a</sup></b>	Codominant					
	CC	86 (57.3)	96 (64.0)	1		
	CA	61 (40.7)	53 (35.3)	1.28 (0.80–2.05)	0.34	419.7
	AA	3 (2.0)	1 (0.7)	3.35 (0.34–32.80)		
	Dominant					
	CC	86 (57.3)	96 (64.0)	1	0.24	418.5
	CA+AA	64 (42.7)	54 (36.0)	1.32 (0.83–2.11)		
	Recessive					
	CC+CA	147 (98)	149 (99.3)	1	0.3	418.8
	AA	3 (2)	1 (0.7)	3.04 (0.31–29.57)		
	Overdominant					
	CC+AA	89 (59.3)	97 (64.7)	1	0.34	419
	CA	61 (40.7)	53 (35.3)	1.25 (0.79–2.00)		
Log-additive						
–	–	–	–	1.35 (0.87–2.10)	0.18	418.1
<b>rs4242382</b>	Codominant					
	GG	106 (70.7)	124 (82.7)	1		
	GA	42 (28.0)	25 (16.7)	<b>1.97 (1.12–3.44)</b>	<b>0.047<sup>b</sup></b>	415.8
	AA	2 (1.3)	1 (0.7)	2.34 (0.21–26.17)		
	Dominant					
	GG	106 (70.7)	124 (82.7)	1	<b>0.014</b>	413.8
	GA+AA	44 (29.3)	26 (17.3)	<b>1.98 (1.14–3.43)</b>		
	Recessive					
	GG+GA	148 (98.7)	149 (99.3)	1	0.56	419.5
	AA	2 (1.3)	1 (0.7)	2.01 (0.18–22.45)		
	Overdominant					
	GG+AA	108 (72)	125 (83.3)	1	<b>0.018</b>	414.3
	GA	42 (28)	25 (16.7)	<b>1.94 (1.11–3.40)</b>		
Log-additive						
–	–	–	–	<b>1.89 (1.12–3.19)</b>	<b>0.014</b>	413.9
<b>rs7017300</b>	Codominant					
	AA	100 (66.7)	117 (78.0)	1		
	AC	45 (30.0)	33 (22.0)	1.60 (0.95–2.69)	<b>0.0064</b>	411.8
	CC	5 (3.3)	0 (0.0)	NA (0.00–NA)		
	Dominant					
	AA	100 (66.7)	117 (78.0)	1	<b>0.028</b>	415
	AC+CC	50 (33.3)	33 (22.0)	<b>1.77 (1.06–2.96)</b>		
	Recessive					
	AA+AC	145 (96.7)	150 (0)	1	<b>0.0081</b>	412.9
	CC	5 (3.3)	0 (0)	NA (0.00–NA)		
	Overdominant					
	AA+CC	105 (70)	117 (78.0)	1	0.11	417.4
	AC	45 (30)	33 (22.0)	1.52 (0.90–2.56)		
Log-additive						
–	–	–	–	<b>1.87 (1.16–3.02)</b>	<b>0.0091</b>	413.1
SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> value	AIC
<b>rs7837688</b>	Codominant					
	GG	101 (67.3)	122 (81.3)	1		
	GT	47 (31.3)	28 (18.7)	<b>2.03 (1.19–3.47)</b>	<b>0.0082</b>	412.3
	TT	2 (1.3)	0 (0.0)	NA (0.00–NA)		
	Dominant					

**Table 3** (continued)

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of BPH patients (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> value	AIC	
<b>rs6983267</b>	GG	101 (67.3)	122 (81.3)	1	<b>0.0053</b>	412.1	
	GT+TT	49 (32.7)	28 (18.7)	<b>2.11 (1.24–3.61)</b>			
	Recessive						
	GG+GT	148 (98.7)	150 (0)	1	0.095	417.1	
	TT	2 (1.3)	0 (0)	NA (0.00–NA)			
	Overdominant						
	GG+TT	103 (68.7)	122 (81.3)	1	<b>0.011</b>	413.4	
	GT	47 (31.3)	28 (18.7)	<b>1.99 (1.16–3.40)</b>			
	Log-additive						
	–	–	–	–	<b>2.14 (1.27–3.61)</b>	<b>0.0033</b>	411.3
	Codominant						
	GG	53 (35.3)	44 (29.3)	1	0.83 (0.50–1.38)	0.25	419.2
	GT	80 (53.3)	80 (53.3)	0.83 (0.50–1.38)			
	TT	17 (11.3)	26 (17.3)	0.54 (0.26–1.13)			
	Dominant						
	GG	53 (35.3)	44 (29.3)	1	0.76 (0.47–1.23)	0.27	418.7
	GT+TT	97 (64.7)	106 (70.7)	0.76 (0.47–1.23)			
	Recessive						
	GG+GT	133 (88.7)	124 (82.7)	1	0.61 (0.32–1.18)	0.14	417.7
	TT	17 (11.3)	26 (17.3)	0.61 (0.32–1.18)			
Overdominant							
GG+TT	70 (46.7)	70 (46.7)	1	1.00 (0.64–1.57)	1	419.9	
GT	80 (53.3)	80 (53.3)	1.00 (0.64–1.57)				
Log-additive							
–	–	–	–	0.76 (0.54–1.07)	0.11	417.4	

<sup>a</sup> Significant deviation from HWE

<sup>b</sup> Statistically significant results are shown in bold

BPH patients). No significant association was found between rs7017300 and BPH risk.

Genotype frequencies of SNP rs7837688 were found to differ significantly between PCa patients and controls ( $P=0.02$ , for codominant model; GT heterozygote OR=2.38, 95%CI 1.26–4.51; TT homozygote OR=0.81, 95%CI 0.11–5.89). The best-fitting model for association between rs7837688 and PCa risk was found to be overdominant ( $P=0.0052$ ). Men with GT genotype were shown to have 2.40 fold increased risk of PCa compared to men with homozygous genotypes (95%CI 1.27–4.53). The association between this SNP and PCa risk was confirmed by comparing genotype distributions among PCa and BPH patients ( $P=0.0082$ , for codominant model; heterozygote OR=2.03, 95%CI 1.19–3.47; homozygote OR not available due to lack of subjects with TT genotype in the group of BPH patients). The best-fitting model was shown to be log-additive ( $P=0.0033$ ; OR=2.14, 95%CI 1.27–3.61). The comparison of genotype distributions among BPH patients and controls yielded no evidence of association of rs7837688 with BPH. Nevertheless, statistical trend of significance was determined for association of rs7837688 with

BPH under recessive model, which is the best-fitting model according to AIC ( $P=0.055$ ).

The comparison of rs6983267 genotype distribution among PCa patients and controls showed a 0.77 fold decrease in PCa risk for men with GT genotype compared to men homozygous for the G allele ( $P=0.0081$ , 95%CI 0.43–1.39). As for the men with TT genotype, the observed decrease in PCa risk compared to carriers of GG genotype was 0.31 fold (95%CI 0.14–0.67). Odds ratio for carriers of TT genotype under the best-fitting recessive model of association was found to be 0.36 ( $P=0.0029$ ; 95%CI 0.19–0.71). Observed association of rs6983267 was not confirmed by comparing genotype frequencies in PCa and BPH patients. Comparison of genotype distributions among BPH patients and controls yielded no evidence of association between rs6983267 and BPH risk ( $P=0.098$ , for the best-fitting recessive model; OR=0.60, 95%CI 0.32–1.10).

When analyzing whether these 5 SNPs are in association with PCa progression, no correlation has been found (Supplementary Tables S4–S6). Genotype distributions among groups of patients have led to forming a great proportion of contingency tables with more than 20 % of cells

**Table 4** Association of five SNPs at 8q24 with the risk of benign prostatic hyperplasia, as assessed in comparison of genotype distributions between patients with benign prostatic hyperplasia and controls

SNP	Genetic model	No of BPH patients (%)	No of controls (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> value	AIC
<b>rs1447295<sup>a</sup></b>	Codominant					
	CC	96 (64.0)	11 (11)	1		
	CA	53 (35.3)	82 (82)	<b>0.07 (0.04–0.15)</b>	<b>&lt;0.0001<sup>b</sup></b>	263.8
	AA	1 (0.7)	7 (7)	<b>0.02 (0.00–0.15)</b>		
	Dominant					
	CC	96 (64.0)	11 (11.0)	1	<b>&lt;0.0001</b>	264.5
	CA+AA	54 (36.0)	89 (89.0)	<b>0.07 (0.03–0.14)</b>		
	Recessive					
	CC+CA	149 (99.3)	93 (93)	1	<b>0.0045</b>	332.4
	AA	1 (0.7)	7 (7)	<b>0.09 (0.01–0.74)</b>		
	Overdominant					
	CC+AA	97 (64.7)	18 (18)	1	<b>&lt;0.0001</b>	284.7
	CA	53 (35.3)	82 (82)	<b>0.12 (0.07–0.22)</b>		
Log-additive						
–	–	–	–	<b>0.08 (0.04–0.16)</b>	<b>&lt;0.0001</b>	262.5
<b>rs4242382</b>	Codominant					
	GG	124 (82.7)	80 (80)	1		
	GA	25 (16.7)	20 (20)	0.81 (0.42–1.55)	0.49	341.1
	AA	1 (0.7)	0 (0.0)	NA (0.00–NA)		
	Dominant					
	GG	124 (82.7)	80 (80.0)	1	0.6	340.2
	GA+AA	26 (17.3)	20 (20.0)	0.84 (0.44–1.60)		
	Recessive					
	GG+GA	149 (99.3)	100 (100)	1	0.31	339.5
	AA	1 (0.7)	0 (0)	NA (0.00–NA)		
	Overdominant					
	GG+AA	125 (83.3)	80 (80)	1	0.5	340.1
	GA	25 (16.7)	20 (20)	0.80 (0.42–1.53)		
Log-additive						
–	–	–	–	0.88 (0.47–1.65)	0.7	340.4
<b>rs7017300</b>	Codominant					
	AA	117 (78.0)	84 (84.0)	1		
	AC	33 (22.0)	16 (16.0)	1.48 (0.77–2.86)	0.24	–
	CC	0 (0.0)	0 (0.0)	–		
	Dominant					
	AA	117 (78.0)	84 (84.0)	–	–	–
	AC+CC	33 (22.0)	16 (16.0)	–	–	–
	Recessive					
	AA+AC	150 (0)	100 (100)	–	–	–
	CC	0 (0)	0 (0)	–	–	–
	Overdominant					
	AA+CC	117 (78.0)	84 (84.0)	–	–	–
	AC	33 (22.0)	16 (16.0)	–	–	–
Log-additive						
–	–	–	–	–	–	
SNP	Genetic model	No of controls (%)	No of controls (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> value	AIC
<b>rs7837688</b>	Codominant					
	GG	122 (81.3)	82 (82.0)	1		
	GT	28 (18.7)	16 (16.0)	1.18 (0.60–2.31)	0.14	338.6
	TT	0 (0.0)	2 (2.0)	0.00 (0.00–NA)		



**Table 4** (continued)

SNP	Genetic model	No of BPH patients (%)	No of controls (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> value	AIC
<b>rs6983267</b>	Dominant					
	GG	122 (81.3)	82 (82.0)	1	0.89	340.5
	GT+TT	28 (18.7)	18 (18.0)	1.05 (0.54–2.01)		
	Recessive					
	GG+GT	150 (0)	98 (98)	1	0.055	336.8
	TT	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00–NA)		
	Overdominant					
	GG+TT	122 (81.3)	84 (84.0)	1	0.59	340.2
	GT	28 (18.7)	16 (16.0)	1.20 (0.61–2.36)		
	Log-additive					
	–	–	–	0.93 (0.50–1.70)	0.8	340.4
	Codominant					
	GG	44 (29.3)	25 (25.0)	1		
	GT	80 (53.3)	49 (49.0)	0.93 (0.51–1.70)	0.25	339.8
	TT	26 (17.3)	26 (26.0)	0.57 (0.27–1.18)		
	Dominant					
	GG	44 (29.3)	25 (25.0)	1	0.45	339.9
	GT+TT	106 (70.7)	75 (75)	0.80 (0.45–1.42)		
	Recessive					
	GG+GT	124 (82.7)	74 (74.0)	1	0.1	337.8
TT	26 (17.3)	26 (26.0)	0.60 (0.32–1.10)			
Overdominant						
GG+TT	70 (46.7)	51 (51)	1	0.5	340.1	
GT	80 (53.3)	49 (49)	1.19 (0.72–1.97)			
Log-additive						
–	–	–	0.76 (0.53–1.10)	0.15	338.4	

<sup>a</sup>Significant deviation from HWE

<sup>b</sup>Statistically significant results are shown in bold

having expected counts less than 5 (codominant and recessive model).

## Discussion

The identification of prostate cancer susceptibility loci has proven to be challenging. Over the years, GWA studies have shown that the frequencies of risk alleles vary considerably across ethnic groups and that association of some SNPs with PCa is significant only in populations with specific ancestral background. These results are supportive to the hypothesis that the effect of genetic factors on PCa risk may be heterogeneous among different ethnic populations. The variations in results of studies on gene polymorphisms in PCa may be explained partially by ethnic differences, as well as with limited sample size, and other risk or protective factors [17].

First reported GWAS of PCa examined possible association of markers at chromosome 8q24 with the risk of PCa in

Icelandic population [10]. Further analyses found a larger number of PCa risk markers in this region, of which many were replicated in multiple populations [3, 7–9, 17–42].

In this study, we examined the possible association of allelic variants of 5 SNPs at 8q24 with PCa risk in Serbian population for the first time. Additionally, we evaluated the possible linkage of these SNPs with standard prognostic parameters of PCa progression, as well as with the risk of disease progression assessed according to two classification systems.

Due to observed deviation from HWE, the statistically significant difference in rs1447295 genotype frequencies in PCa and BPH patients compared to controls should not be considered valid. Nevertheless, these findings are in concordance with the results of previous studies that characterized SNP rs1447295 as significantly associated with PCa risk [20]. Our data showing that A allele confers decreased risk of PCa are in contrast to the results of other GWA studies, which identified CA and AA genotypes as associated with PCa susceptibility [9, 19–21, 23–26, 36, 38, 39]. Studies conducted in European and several other populations

showed similar results [1, 3, 8, 10, 11, 18, 27–30]. However, study involving Dutch population did not replicate the previously observed association of rs1447295 allele A ( $P=0.10$ ) and PCa risk [31]. Lack of evidence for this association was also observed in African American population [32, 33], as well as in European Americans [34]. Obtained results require a confirmation in further analyses that would include an increase in sample size in the population of Serbia in order to validate whether they are influenced by the interpopulational genetic differences.

We have detected the existence of statistically significant differences in rs4242382 genotype frequency between PCa and BPH patients. Results suggesting that A allele confers increased risk of PCa are consistent with findings obtained in studies conducted in other populations [8, 9, 18, 25, 36, 37, 39].

Evidence of association between rs7017300 and PCa risk were found by comparing genotype frequencies in PCa patients with those in both BPH and controls. C allele was identified as risk allelic variant, which is in consistence with other findings obtained in studies involving men of European ancestry [8, 18, 39, 40]. Furthermore, Xu et al. showed that rs7017300 C allele is associated with the increased risk of PCa in African Americans ( $P=0.03$ ; allelic OR=1.2; 95%CI 1.00–1.5) [40].

When considering association between rs7837688 and PCa risk, we found that there is statistically significant difference in the genotype frequencies between PCa patients and controls, as well as between PCa and BPH patients. Our results regarding elevated PCa risk associated with T allele are consistent with finding of Salinas et al. who observed that allele T confers susceptibility to PCa in Caucasians ( $P=0.0006$ , for codominant model; heterozygote OR=1.37, 95%CI 1.13–1.67, homozygote OR=2.14, 95%CI 1.12–4.10), but not in African Americans ( $P=0.18$ , for dominant model OR=1.69, 95%CI 0.77–3.73) [22].

Several studies have suggested association between rs6983267 and PCa risk [8, 9, 23, 24, 26, 28, 35, 38–42]. Our results showing decreased risk of PCa associated with GT and TT genotypes, which is demonstrated by comparing genotype frequencies in PCa patients and controls, were consistent with previously published data. However, some studies did not replicate the previously observed association of rs6983267 allele G with PCa susceptibility [18, 29, 32–34, 36, 37].

We found that the values of parameters of PCa progression were independent of five PCa-susceptibility SNPs in Serbian population. Similarly, no association of these SNPs and PCa aggressiveness was previously determined in Swedish (for all five SNPs), African-American (for rs1447295), and European American (for rs4242382 and rs6983267) populations [8, 19, 37]. Conversely, association between rs1447295 and PCa aggressiveness was reported among European American and Polish populations [11, 30],

as well as in Japanese population [3], in which association between rs1447295 and high Gleason score was shown [1, 27]. When interpreting our results, it is of great importance to consider possible errors and misleadingness associated with violations of Cochran's rule about small expected cell counts [43].

## Conclusion

Five SNPs included in our study appear to be associated with the risk of prostate cancer in general, rather than with the more or less aggressive form of disease.

**Conflict of Interest** The Authors declare that there is no conflict of interest.

**Grant Support** The research was supported by the Ministry of Education and Science of Serbia (Project no. 173016).

## References

1. Hamano T, Matsui H, Sekine Y, Ohtake N, Nakata S, Suzuki K (2010) Association of SNP rs1447295 and microsatellite marker DG8S737 with familial prostate cancer and high grade disease. *J Urol* 184:738–742
2. Chang YM, Kung HJ, Evans C (2007) Nonreceptor tyrosine kinases in prostate cancer. *Neoplasia* 9:90–100
3. Terada N, Tsuchiya N, Ma Z, Shimizu Y, Kobayashi T, Nakamura E et al (2008) Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *Prostate* 68:1689–1695
4. Schulz W, Hatina J (2006) Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med* 10:100–125
5. Vrdoljak E, Wojtukiewicz MZ, Pienkowski T, Bodoky G, Berzinec P, Finek J et al (2011) South Eastern European Research Oncology Group. Cancer epidemiology in Central, South and Eastern European countries. *Croat Med J* 52:478–487
6. Cancer Registry of Central Serbia, Institute of Public Health of the Republic of Serbia 1999–2009. Available at: <http://www.batut.org.rs/> Accessed: March 2, 2012
7. Wasserman NF, Aneas I, Nobrega MA (2010) An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a MYC enhancer. *Genome Res* 20:1191–1197
8. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G et al (2008) Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med* 358:910–919
9. Liu H, Wang B, Han C (2011) Meta-analyses of genome-wide and replication association studies on prostate cancer. *Prostate* 71:209–224
10. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA et al (2006) A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet* 38:652–658
11. Wang L, McDonnell SK, Slusser JP, Hebring SJ, Cunningham JM, Jacobsen SJ et al (2007) Two common chromosome 8q24 variants are associated with increased risk for prostate cancer. *Cancer Res* 67:2944–2950

12. Gleason DF, Mellinger GT (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111:58–64
13. Catalona WJ, Hudson MA, Scardino PT, Richie JP, Ahmann FR, Flanigan RC et al (1994) Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol* 152:2037–2042
14. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA et al (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280:969–974
15. Medeiros RM, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J et al (2002) Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin Cancer Res* 8:3433–3437
16. Wallis Y, Morrell N (2011) Automated DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 688:173–185
17. Dianat SS, Margreiter M, Eckersberger E, Finkelstein J, Kuehas F, Herwig R et al (2009) Gene polymorphisms and prostate cancer: the evidence. *BJU Int* 104:1560–1572
18. Zheng SL, Sun J, Cheng Y, Li G, Hsu FC, Zhu Y et al (2007) Association between two unlinked loci at 8q24 and prostate cancer risk among European Americans. *J Natl Cancer Inst* 99:1525–1533
19. Freedman ML, Haiman CA, Patterson N, McDonald GJ, Tandon A, Waliszewska A et al (2006) Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14068–14073
20. Chen M, Huang YC, Ko IL, Yang S, Chang YH, Huang W et al (2009) The rs1447295 at 8q24 is a risk variant for prostate cancer in Taiwanese men. *J Urol* 181:698–701
21. Schumacher FR, Feigelson HC, Cox DG, Haiman CA, Albanes D, Buring J et al (2007) A common 8q24 variant in prostate and breast cancer from a large nested case-control study. *Cancer Res* 67:2951–2956
22. Salinas CA, Kwon E, Carlson CS, Koopmeiners JS, Feng Z, Karyadi DM et al (2008) Multiple independent genetic variants in the 8q24 region are associated with prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 17:1203–1213
23. Penney KL, Salinas CA, Pomerantz M, Schumacher FR, Beckwith CA, Lee GS et al (2009) Evaluation of 8q24 and 17q risk loci and prostate cancer mortality. *Clin Cancer Res* 15:3223–3230
24. Okobia MN, Zmuda JM, Ferrell RE, Patrick AL, Bunker CH (2011) Chromosome 8q24 variants are associated with prostate cancer risk in a high risk population of African ancestry. *Prostate* 71:1054–1063
25. Cussenot O, Azzouzi AR, Bantsimba-Malanda G, Gaffroy C, Mangin P, Cormier L et al (2008) Effect of genetic variability within 8q24 on aggressiveness patterns at diagnosis and familial status of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14:5635–5639
26. Troutman SM, Sissung TM, Cropp CD, Venzon DJ, Spencer SD, Adesunloye BA et al (2012) Racial disparities in the association between variants on 8q24 and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncologist* 17:312–320
27. Suuriniemi M, Agalliu I, Schaid DJ, Johanneson B, McDonnell SK, Iwasaki L et al (2007) Confirmation of a positive association between prostate cancer risk and a locus at chromosome 8q24. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 16:809–814
28. Os'kina NA, Boiarskikh UA, Lazarev AF, Petrova VD, Ganov DI, Tonacheva OG et al (2012) Association of chromosome 8q24 variants with prostate cancer risk in the Siberian region of Russia and meta-analysis. *Mol Biol (Mosk)* 46:234–241
29. Joung JY, Park S, Yoon H, Lee SJ, Park WS, Seo HK et al (2012) Association of common variations of 8q24 with the risk of prostate cancer in Koreans and a review of the Asian population. *BJU Int* 110:E318–E325
30. Wokolorczyk D, Gliniewicz B, Stojewski M, Sikorski A, Złowocka E, Debniak T et al (2010) The rs1447295 and DG8S737 markers on chromosome 8q24 and cancer risk in the Polish population. *Eur J Cancer Prev* 19:167–171
31. Zeegers MP, Khan HS, Schouten LJ, van Dijk B, Goldbohn AR, Shalken J et al (2010) Genetic marker polymorphisms on chromosome 8q24 and prostate cancer in the Dutch population: DG8S737 may not be the causative variant. *Eur J Hum Genet* 19:118–120
32. Robbins C, Torres JB, Hooker S, Bonilla C, Hernandez W, Candreva A et al (2007) Confirmation study of prostate cancer risk variants at 8q24 in African Americans identifies a novel risk locus. *Genome Res* 17:1717–1722
33. Murphy AB, Ukoli F, Freeman V, Bennett F, Aiken W, Tulloch T et al (2012) 8q24 risk alleles in West African and Caribbean men. *Prostate* 72:1366–1373
34. Pal P, Xi H, Guha S, Sun G, Helfand BT, Meeks JJ et al (2009) Common variants in 8q24 are associated with risk for prostate cancer and tumor aggressiveness in men of European ancestry. *Prostate* 69:1548–1556
35. Beuten J, Gelfond JA, Martinez-Fierro ML, Weldon KS, Crandall AC, Rojas-Martinez A et al (2009) Association of chromosome 8q variants with prostate cancer risk in Caucasian and Hispanic men. *Carcinogenesis* 30:1372–1379
36. Bao BY, Pao JB, Lin VC, Huang CN, Chang TY, Lan YH et al (2010) Individual and cumulative association of prostate cancer susceptibility variants with clinicopathologic characteristics of the disease. *Clin Chim Acta* 411:1232–1237
37. Fitzgerald LM, Kwon EM, Koopmeiners JS, Salinas CA, Standford JL, Ostrander EA (2009) Analysis of recently identified prostate cancer susceptibility loci in a population-based study: associations with family history and clinical features. *Clin Cancer Res* 15:3231–3237
38. Yeager M, Xiao N, Hayes RB, Bouffard P, Desany B, Burdett L et al (2008) Comprehensive resequence analysis of a 136 kb region of human chromosome 8q24 associated with prostate and colon cancers. *Hum Genet* 124:161–170
39. Sun J, Lange EM, Isaacs SD, Liu W, Wiley KE, Lange L et al (2008) Chromosome 8q24 risk variants in hereditary and non-hereditary prostate cancer patients. *Prostate* 68:489–497
40. Xu Z, Bensen JT, Smith GJ, Mohler JL, Taylor JA (2011) GWAS SNP replication among African American and European American men in the North Carolina—Louisiana prostate cancer project. *Prostate* 71:881–891
41. Chan JY, Li H, Singh O, Mahajan A, Ramasamy S, Subramanian K, et al. (2012) 8q24 and 17q prostate cancer susceptibility loci in a multiethnic Asian cohort. *Urol Oncol* 1–8
42. Papanikolopoulou A, Landt O, Ntoumas K, Bolomitis S, Tyrizis SI, Constantinides C et al (2012) The multi-cancer marker, rs6983267, located at region 3 of chromosome 8q24, is associated with prostate cancer in Greek patients but does not contribute to the aggressiveness of the disease. *Clin Chem Lab Med* 50:379–385
43. Cochran WG (1954) Some methods for strengthening the common  $\chi^2$  tests. *Biometrics* 10:417–451

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Ана С. Бранковић

број уписа М3002/2008

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Студија асоцијације генетичких варијанти у регионима 7q36, 8q24 и 17q12 са ризиком за развој и прогресију карцинома простате"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013. године

Бранковић Ана

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана С. Бранковић

Број уписа М3002/2008

Студијски програм молекуларна биологија/ молекуларна биологија еукариота

Наслов рада "Студија асоцијације генетичких варијанти у регионима 7q36, 8q24 и 17q12 са ризиком за развој и прогресију карцинома простате"

Ментор доц. др Горан Брајушковић

Потписани Ана С. Бранковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013. године



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Студија асоцијације генетичких варијанти у регионима 7q36, 8q24 и 17q12 са ризиком за развој и прогресију карцинома простате”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.11.2013. године



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.