

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.579>

<https://orcid.org/0009-0006-6109-6597>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Augustinas Matulevičius

# Naujos kartos vaizdinimo technologijos ir genetiniai testai kliniškai reikšmingo prostatos vėžio nustatymui

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biologija (N 010)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2018–2022 metais Vilniaus universitete.  
Mokslinius tyrimus rėmė Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras ir  
Nacionalinis vėžio institutas

**Mokslinis vadovas** – prof. dr. **Feliksas Jankevičius** (Vilniaus universitetas,  
medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M001)

**Mokslinė konsultantė** – prof. dr. **Sonata Jarmalaitė** (Vilniaus universitetas,  
gamtos mokslai, biologija – N 010)

Gynimo taryba:

**Pirmininkas** – prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilniaus universitetas, gamtos  
mokslai, biochemija – N 004)

Nariai:

dr. **Jonathan Arias** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N  
010),

prof. dr. **Vilnis Lietuvietis** (Rygos universitetinė ligoninė, Latvija, medicinos  
ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

dr. **Daiva Dabkevičienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija –  
N 010),

prof. dr. **Edita Mišeikytė Kaubrienė** (Nacionalinis vėžio institutas,  
medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. gruodžio 29 d.  
14 val. Vilniaus universitete GMC, R401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +370 69387889, el. paštas  
[augustinas.matulevicius@santa.lt](mailto:augustinas.matulevicius@santa.lt)

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto  
svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.579>

<https://orcid.org/0009-0006-6109-6597>

VILNIUS UNIVERSITY

Augustinas Matulevičius

# Innovative Imaging Technologies and Genetic Tests for the Detection of Clinically Significant Prostate Cancer

**DOCTORAL DISSERTATION**

Natural Sciences,  
Biology (N 010)

VILNIUS 2023

The dissertation was prepared between 2018 and 2022 at Vilnius University. The research was supported by Vilnius University, Life Sciences Center and NCI.

**Academic supervisor** – Prof. Dr. **Feliksas Jankevičius** (Vilnius University, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

**Academic consultant** – Prof. Dr. **Sonata Jarmalaitė** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

**Chairman** – Prof. Dr. **Daumantas Matulis** (Vilnius University, Biochemistry – N 004)

**Members:**

Dr. **Jonathan Arias** (Vilnius University, Natural Sciences, Biology –N 010),  
Dr. **Daiva Dabkevičienė**, PhD (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – (N 010) ,

Prof. Dr. **Edita Mišeikytė Kaubrienė** (NCI, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. **Vilnis Lietuvielis** (Riga East Clinical University Hospital, Medicine and Health Sciences, Medicine – M 001).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 2 PM on 29 December 2023 in R401 meeting room, Life Sciences Center, Vilnius University.

Address: Saulėtekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania, +370 69387889,

e-mail: [augustinas.matulevicius@santa.lt](mailto:augustinas.matulevicius@santa.lt)

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## TURINYS

1.	SANTRUMPŲ SAŖAŠAS.....	7
2.	ĮVADAS.....	8
	2.1. Darbo aktualumas .....	8
	2.2. Darbo tikslas .....	9
	2.3. Darbo uždaviniai.....	9
	2.4. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė .....	9
	2.5. Disertacijos ginamieji teiginiai .....	10
3.	LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
	3.1. Prostatos vėžio epidemiologija .....	11
	3.2. Prostatos vėžio etiologija .....	13
	3.3. Prostatos vėžio klasifikacija ir stadijavimas.....	14
	3.4. Prostatos vėžio histologinis vertinimas .....	15
	3.5. Prostatos vėžio rizikos vertinimas.....	16
	3.6. Kliniškai reikšmingas prostatos vėžys .....	17
	3.7. Magnetinio rezonanso tomografijos reikšmė diagnozuojant prostatos vėžį.....	18
	3.8. Klinikinis diagnostinis rodiklis PSA tankis (PSAD).....	18
	3.9. Komerciniai neinvaziniai PV testai.....	19
	3.10. Prostatos vėžio epigenetiniai pokyčiai .....	20
	3.11. Genų hipermetilinimas.....	21
	3.12. Genų hipometilinimas.....	23
4.	GENAI SUSIJĘ SU PROSTATOS VĖŽIO VYSTIMUSI .....	24
	4.1. Ras sąveikos domeną turinčių baltymų 1 šeimos ( <i>RASSF1</i> ) baltymas .....	24
	4.2. Retinoinės rūgšties receptoriaus $\beta$ ( <i>RARB</i> ) baltymas .....	25
	4.3. Adenominės polipozės coli ( <i>APC</i> ) baltymas.....	26
	4.4. Glutationo S-transferazės pi 1 klasės ( <i>GSTP1</i> ) baltymas .....	27
	4.5. Genų hipermetilinimas sveikame prostatos audinyje ir kancerizacijos lauke.....	28
5.	TYRIMO METODOLOGIJA.....	29
	5.1. Įtraukimo kriterijai.....	29
	5.2. Atmetimo kriterijai .....	29
	5.3. Pacientai ir ėminiai .....	30
	5.4. Pritaikomosios biopsijos atlikimo schema ir mėginių skaičius .....	31

5.5. DNR išskyrimas ir bisulfitinė konversija .....	33
5.6. Kiekybinė metilnimui specifinė PGR .....	33
5.7. Statistinė analizė ir duomenų apdorojimas.....	34
5.8. Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis.....	34
6. REZULTATAI.....	36
6.1. Pritaikomosios ir sisteminės prostatos biopsijų diagnostinių verčių palyginimas .....	36
6.2. Klinikiniai ir radiologiniai duomenimis.....	39
6.3. Epigenetinio lauko efekto nustatymas aplink vėžio židinių. ....	40
6.4. Naviko židinio DNR metilnimo koreliacijos su klinikiniais duomenimis. ....	50
6.5. Epigenetiniai žymenys šlapimo nuosėdose .....	52
6.6. Kliniškai reikšmingo prostatos vėžio žymenys iš šlapimo nuosėdų.....	55
7. REZULTATŲ APTARIMAS.....	57
8. IŠVADOS.....	64
10. PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS .....	66
10.1. Straipsniai disertacijos tema.....	66
10.2. Pranešimai disertacijos tema.....	67
11. SUMMARY .....	68
12. PADĖKA.....	100
13. CURRICULUM VITAE.....	101
14. LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	103
15. PRIEDAI.....	117
UŽRAŠAMS.....	118

## 1. SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AdPB –	adaptuota sisteminė prostatos biopsija
cISUP –	klinikinis ISUP balas
cTNM –	klinikinė TNM stadija
DNR –	deoksiribonukleorūgštis
DRT –	Digitalinis rektalinis tyrimas
EAU –	Europos urologų asociacija, angl. <i>European Association of Urology</i>
EPI –	angl. Prostate (IntelliScore) EPI
GPH –	Gėrybinė prostatos hiperplazija
<i>GSTP1</i> –	glutathiono S-transferazės pi 1 klasės genas, angl. <i>Glutathione S-transferase pi 1</i>
iRNR –	baltymą koduojanti informacinė ribonukleorūgštis
ISUP –	tarptautinė urologinės patologijos draugija, angl. <i>International Society of Urological Pathology</i>
mpMRT/UG –	multiparametrinė magnetinio rezonanso tomografija ir ultragarsu kontroliuojama prostatos biopsija
NCCN –	Jungtinių Amerikos Valstijų vėžio draugija, angl. <i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NPV –	neigiama prognostinė vertė
NVI –	Nacionalinis vėžio institutas
OR –	šansų santykis, angl. odds ratio
PB –	prostatos biopsija
PCA3 –	Prostatos vėžio antigenas 3 angl. ( <i>Prostate cancer antigen 3</i> )
PIN –	prostatos intraepitelinė neoplazija, angl. <i>Prostate intraepithelial neoplasia</i>
pISUP –	patologinis ISUP balas
PGR –	polimerazinė grandininė reakcija
PSA –	prostatos specifinis antigenas
pTNM –	patologinė TNM stadija
PV –	prostatos vėžys
<i>RARB</i> –	retinoinės rūgšties receptoriaus $\beta$ genas, angl. <i>retinoic acid receptor <math>\beta</math></i>
<i>RASSF1</i> –	Ras sąveikos domeną turinčių baltymų 1 šeimos genas, angl. <i>association domain family member 1</i>
RAS –	
RP –	radikali prostatektomija
TNM –	TNM klasifikacijos sistema, angl. <i>Tumour, Node, Metastasis</i>
TPV –	teigiama prognostinė vertė
VPC –	Valstybinis patologijos centras

## 2. ĮVADAS

### 2.1. Darbo aktualumas

Prostatos vėžys – tai labiausiai paplitęs piktybinis susirgimas tarp vyrų ir antroji pagrindinė vyrų mirties priežastis visame pasaulyje.<sup>1</sup> 2020 metais pasaulyje buvo užregistruota daugiau nei 1,41 mln. naujų prostatos vėžio atvejų, kurie sudarė apie 15 proc. naujų vyrų vėžio atvejų (<http://www.wcrf.org>). Lietuvoje prostatos vėžys (PV) yra dažniausia vyrų onkologinė liga ir sudarė 29 proc. naujų diagnozuotų vėžio atvejų 2012 m. (Vėžio registras, Nacionalinis vėžio institutas; <http://www.nvi.lt>). PV ankstyva diagnostika, remiantis prostatai specifinio antigeno (PSA) nustatymu, laikoma kontroversiška dėl nepakankamo tyrimo specifiskumo kliniškai reikšmingam prostatos vėžiui identifikuoti. Ankstesni moksliniai tyrimai parodė, kad PV ankstyvai diagnostikai buvo sėkmingai naudojamas PSA testas ir pasiekė mirštamumo nuo prostatos vėžio sumažėjimą 30 proc.<sup>2,3</sup> Tačiau didžiausia problema šiuose tyrimuose laikomas išaugęs kliniškai nereikšmingo PV atvejų skaičius ir nereikalingo gydymo mastai. Hiperdiagnostika remiantis PSA testu lėmė tai, kad nuo 5 iki 45 proc. atvejų buvo atliktos nereikalingos prostatos biopsijos 50–59 m. amžiaus vyrams.<sup>4</sup> Pats tiksliausias šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamas vaizdinio tyrimo metodas, siekiant diagnozuoti kliniškai reikšmingą PV yra multiparametrinė magnetinio rezonanso tomografija (mpMRT). Per pastaruosius 10 metų, prostatos mpMRT įgijo labai didelę reikšmę diagnozuojant kliniškai reikšmingą PV.<sup>5,6</sup> PV aptikimo lygis naudojant mpMRT siekia nuo 80 iki 100 proc., kai *Gleason* balų suma > 7; nuo 63 iki 97 proc. kai *Gleason* 7; nuo 21 iki 75 proc. kai *Gleason* balų suma 6.<sup>7</sup> Per pastaruosius metus atsirado nauja programinė įranga skirta sulieti mpMRT ir ultragarso vaizdus atliekant prostatos biopsiją.<sup>8,9</sup> Lyginant su standartine transrektaline ultragarsu kontroliuojama prostatos biopsija, naudojant mpMRT/UG suliejimo technologiją padidėjo kliniškai reikšmingo prostatos vėžio aptikimo dažnis ir sumažėjo žemos rizikos PV nustatymo skaičius, kas yra laikoma dideliu privalumu.<sup>9–13</sup> Taip pat tyrimai rodo, kad naudojant mpMRT ir UG suliejimo programą ženkliai pagerėjo kliniškai reikšmingo PV aptikimo dažnis po buvusių neigiamų biopsijų.<sup>14</sup> Naujausi technologiniai pasiekimai lėmė didelę pažangą (epi)genominių tyrimų srityje. Klinikinėje praktikoje vis plačiau taikomi naujos kartos molekuliniai žymenys, kurie tinkami ankstyvai PV diagnostikai, gydymo apimčiai planuoti ir leidžia specifiskai stebėti ligos eigą po operacijos, bei sekti atsaką į gydymą. *GSTPI*, *RARB*, *APC* ir *RASSF1* yra naviką slopinantys genai, kurių raiškos sumažėjimas dėl promotoriaus DNR



metilinimo aukšto lygio nustatomas nuo 70–90% navikinių PV mėginių. Šių genų metilinimas taip pat gali būti aptinkamas PV sergančių pacientų šlapimo nuosėdose, dėl to šie epigenetiniai žymenys gali tapti naudingais ir potencialiais neinvaziškai aptinkamais diagnostiniais ir / ar prognostiniais prostatos vėžio žymenimis.<sup>15–17</sup> Šių molekulinį žymenų dinamikos stebėjimas gydymo laikotarpiu gali padėti prognozuoti terapijos efektyvumą ir numatyti ligos atkryčio riziką.<sup>15–17</sup> Epigenetinius pokyčius tiriant biopsinėje medžiagoje atsiranda galimybė patikslinti vietinį ligos išplitimą, nustatant epigenetiškai pakitusį kancerizacijos lauką aplink vėžio židinį.<sup>17</sup> Atliekant kiekybinius *RASSF1*, *GSTP1*, *RARB* ir *APC* genų metilinimo tyrimus nustatomas prostatos audinių kancerizacijos mastas taip patikslinant radiologinių vaizdų radinius, kas leidžia tiksliau diagnozuoti ligą, sukurti radiogenominius įrankius židininės terapijos planavimui.<sup>17</sup>

## 2.2. Darbo tikslas

Pagrindinis tyrimo tikslas yra įvertinti pritaikomosios mpMRT/UG kontroliuojamos prostatos biopsijos bei epigenetinių žymenų diagnostinį potencialą nustatant kliniškai reikšmingą prostatos vėžį.

## 2.3. Darbo uždaviniai

- Nustatyti mpMRT ir ultragarso vaizdų suliejimo technologijos jautrumą ir specifiskumą, siekiant verifikuoti kliniškai reikšmingą prostatos vėžį transperinealinės prostatos biopsijos metodu.
- Palyginti prostatos vėžio aptikimo dažnį atliekant tikslinę pritaikomąją prostatos biopsiją su standartine sisteminė prostatos biopsija.
- Ištirti vietinį ligos išplitimą, nustatant genų *RASSF1*, *GSTP1*, *RARB* ir *APC* genų metilinimą prostatos biopsiatuose paimtuose iš mpMRT nustatyto vėžio židinio ir iš kancerizacijos lauko (10 ir 20 mm atstumu nuo židinio), bei epigenetinių pokyčių koreliaciją su mpMRT įverčiu.
- Įvertinti neinvazinių epigenetinių žymenų ir klinikinių rodiklių potencialą nustatant kliniškai reikšmingą prostatos vėžį.

## 2.4. Darbo naujumas ir praktinė reikšmė

Tyrimas leido įvertinti pritaikomosios prostatos biopsijos specifiskumą ir jautrumą siekiant nustatyti kliniškai reikšmingą prostatos vėžį. Remiantis šio tyrimo rezultatais, klinikinėje praktikoje būtų galima sumažinti kliniškai nereikšmingo prostatos vėžio aptikimo dažnį, pilnai atsisakius sisteminės

prostatos biopsijos ir pakeičiant ją į tik pritaikomąją (MRT/UG vadovaujamą) prostatos biopsiją. Tai leistų sumažinti hiperdiagnostiką ir su ja susijusias nepageidaujamas išeitis bei išlaikyti tokį pat kliniškai reikšmingo prostatos vėžio nustatymo dažnį. Taip pat tyrimas leido įvertinti galimybę pagerinti prognostinę MRT vertę, numatant vėžio progresavimo riziką, pasirenkant gydymo taktiką ar taikant aktyvų stebėjimą. Mūsų tyrimas parodė, kad visų tirtų genų DNR metilinimo lygis mpMRT užfiksuotame židinyje buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginti su perifokalniais mėginiais, o hipermetilinimas reikšmingai sumažėja pasiekiant >10 mm atstumą nuo navikinio židinio. Remdamiesi tuo, galime daryti išvadą, kad saugus atstumas nuo navikinio židinio yra ne mažesnis kaip 10 mm, ir klinikinėje praktikoje, kaip radikalus gydymo variantas, esant vidutinės rizikos prostatos vėžiui, būtų laikomas saugia riba židininei prostatos liaukos hemiablacijai. Neinvaziniai šlapimo tyrimai yra labai vertingi tolesniam pacientų stebėjimui po prostatos vėžio gydymo, tačiau testo patikimumo validavimui reikalingi perspektyvūs tyrimai didesnėse kohortose.

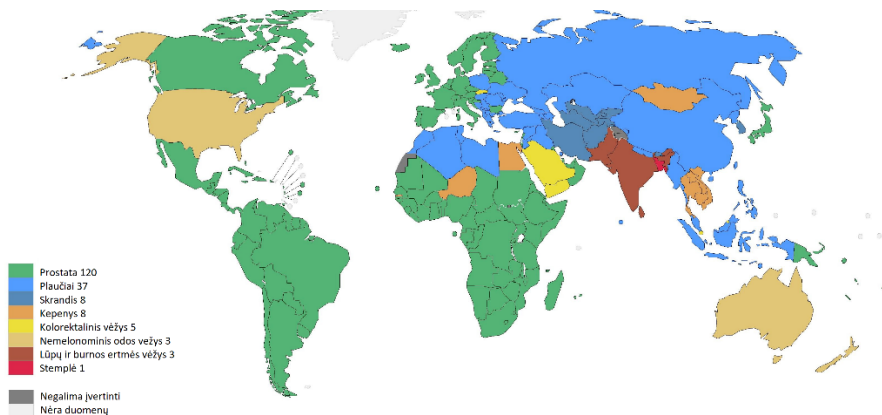
## 2.5. Disertacijos ginamieji teiginiai

1. Pritaikomoji mpMRT/UG kontroliuojama prostatos biopsija yra patikimas diagnostinis metodas, nustatant kliniškai reikšmingą PV.
2. Mūsų tyrimo duomenys patvirtina, kad pirminiems pacientams užtenka atlikti tik pritaikomą mpMRT/UG kontroliuojamą prostatos biopsiją, atsisakant adaptuotos sisteminės prostatos biopsijos, siekiant tiksliai nustatyti kliniškai reikšmingą PV.
3. Tolstant nuo pagrindinio vėžio židinio *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC* genų promotorių metilinimo intensyvumas patikimai mažėja, todėl epigenetiniai žymenys gali būti naudojami pirminei PV diagnostikai ir gydymo apimčiai parinkti.
4. *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC* genų promotorių metilinimas šlapime derinamas su mpMRT gali būti naudojamas PV agresyvumui ir rizikos grupei vertinti.

### 3. LITERATŪROS APŽVALGA

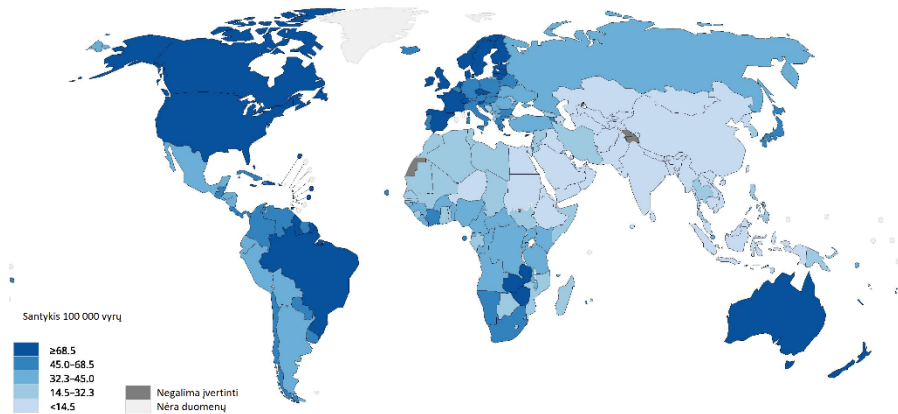
#### 3.1. Prostatos vėžio epidemiologija

2020 metais prostatos vėžys buvo antras pagal dažnumą vyrų piktybinis susirgimas visame pasaulyje – apskaičiuota 1,41 mln. naujų atvejų, tik 20 000 atvejų atsiliko nuo sergamumu plaučių vėžiu. Prostatos vėžys turi didžiausią paplitimą tarp vyrų 120/185 (65 %) šalių ( 1 pav. ).<sup>18</sup>



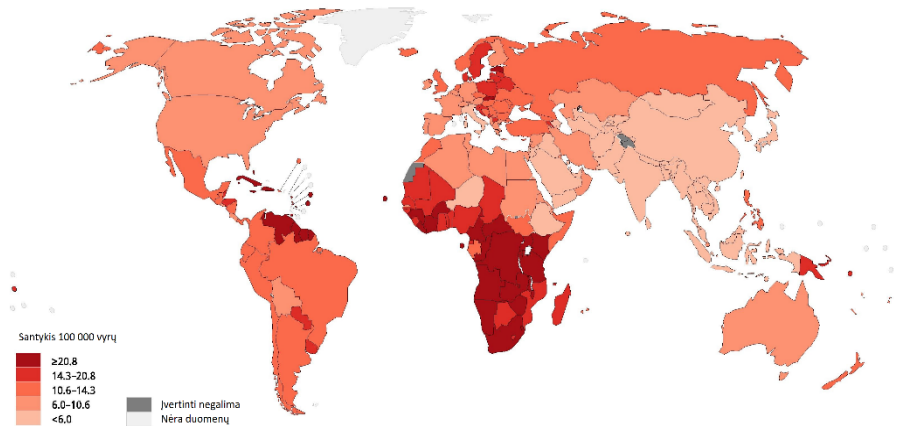
1 pav . Dažniausi vėžio atvejai šalyje, apskaičiuoti pagal amžių standartizuoti sergamumo rodikliai vyrams 2020 m.

Bendras standartizuotas pagal amžių sergamumo rodiklis 100 000 vyrų siekė 31 atvejį, o suminė rizika susirgti per visą gyvenimą buvo 3,9%. Apskaičiuoti sergamumo rodikliai ( 2 pav. ) labai skyrėsi visame pasaulyje. Didžiausias standartizuotas pagal amžių sergamumo rodiklis nustatytas Šiaurės Europoje (83 iš 100 000), po to seka Vakarų Europa (78), Karibai (76), Šiaurės Amerikoje (72), tuo tarpu Lietuvoje – 70. Mažiausias standartizuotas pagal amžių sergamumo rodiklis buvo užfiksuotas Pietų ir Vidurio Azijoje (6,3 iš 100 000), Pietryčių Azijoje (14) ir Šiaurės Afrikoje (17).



2 pav . Apskaičiuoti pagal amžių standartizuoti vyrų sergamumo prostatos vėžiu rodikliai pasaulyje 2020 m.

Prostatos vėžys buvo penkta mirties nuo vėžio priežastis visame pasaulyje, o 2020 m. apskaičiuotas 375 304 mirčių skaičius, ir buvo pirmoji mirties nuo vėžio priežastis 48 iš 185 (26 %) šalių. Apskaičiuotas standartizuotas pagal amžių mirštamumo rodiklis 2020 m. buvo 7,7 ir labai skyrėsi įvairiose geografinėse vietovėse (3 pav.). Europoje – (11,1 iš 100 000), Šiaurės Amerikoje (8,2), Lietuvoje – (18,4).<sup>1</sup>



3 pav. Apskaičiuoti pagal amžių standartizuoti vyrų mirtingumo nuo prostatos vėžio rodikliai pasaulyje 2020 m.

### 3.2. Prostatos vėžio etiologija

Prostata yra vyriškos lyties liaukinės struktūros organas, kilęs iš urogenitalinio sinuso. Pagrindinės jos funkcijos yra suteikti jėgą ejakuliuoti spermą ir spermą papildyti maistinėmis medžiagomis turinčio šarminio skysčio, kad būtų palaikoma spermatozoidų sveikata po ejakuliacijos ir pagerintas vaisingumas. Liauka yra labai jautri piktybinei transformacijai ir dėl to jos piktybinių navikų dažnis yra didesnis nei kitose urogenitalinio trakto struktūrose. Tyrimai parodė, kad prostatos kancerogenezės apibūdinimas yra glaudžiai susijęs su organogeneze, įskaitant didelę priklausomybę nuo androgeninių hormonų signalų, pvz., testosterono, taip pat diskutuota apie galimus ryšius su embriologiniais ląstelinių signalų keliais, tokiais kaip Sonic Hedgehog ekspresija (Shh) ir netinkama Gli-1 onkogeno ekspresija, lemianti stromos naviko augimą ir proliferaciją.

Manoma, kad prostatos kancerogenezėje yra svarbi genetinė predispozicija ir išoriniai aplinkos veiksniai. Literatūros duomenimis tikėtini rizikos veiksniai, lemiantys PV išsivystymą ir progresavimą, yra šeimninė anamnezė, rasė ir geografinė vietovė.<sup>19,20</sup> Didžioji dalis (85 proc.) naujų prostatos vėžio ligos atvejų yra priskiriami sporadiniams, o likę 15 proc. priklauso genetiškai paveldimų navikų grupei. Šeimos istorija ir etninė kilmė yra susijusi su padidėjusiu prostatos vėžio dažniu, o tai rodo genetinę ligos riziką.<sup>19,20</sup> Tik nedidelė PV sergančių vyrų dalis turi genetiškai patvirtintą paveldimą ligą. Paveldima prostatos vėžio forma siejama su šešeriais-septyneriais metais anksčiau pasireiškusia liga, tačiau panašu, kad ligos agresyvumas ir klinikinė eiga kitais atžvilgiais nesiskiria.<sup>20,21</sup>

Viso genomo asociacijos tyrimai nustatė daugiau nei 100 bendrų jautrumo lokusų, prisidedančių prie PV rizikos.<sup>22,23</sup> Daug įvairių egzogeninių/aplinkos veiksnių yra traktuojami kaip susiję su PV išsivystymo rizika arba kaip etiologiškai svarbūs progresuojant nuo latentinės iki klinikinės PV formos.<sup>24</sup> Japonijos vyrai turi mažesnę riziką sirgti PV, palyginti su vyrais iš Vakarų pasaulio. Tačiau japonams persikėlus iš Japonijos į Kaliforniją, jų PV rizika didėja, priartėja prie amerikiečių vyrų, o tai reiškia aplinkos ar mitybos veiksnių vaidmenį.<sup>25</sup>

Tačiau šiuo metu nėra aiškiai žinomų veiksmingų prevencinių priemonių ar farmakologinių intervencijų. Pavieniai metabolinio sindromo (MetS) komponentai, hipertenzija ( $p = 0,035$ ) ir juosmens apimtis  $> 102$  cm ( $p = 0,007$ ), buvo siejami su žymiai didesne PV rizika, tačiau, priešingai,  $> 3$  MetS komponentai yra susijusi su sumažėjusia rizika (AR: 0,70, 95 % PI: 0,60-0,82).<sup>26,27</sup> Ryšys tarp metformino vartojimo ir PV yra prieštaringas. Nustatyta, kad populiacijos lygmeniu metformino (bet ne kitų geriamųjų hipoglikeminių

preparatų) vartotojams yra mažesnė PV diagnozės rizika, palyginti su niekada nevartojusiaisiais (koreguotas OR: 0,84, 95 % PI: 0,74–0,96).<sup>28</sup> 14 didelių perspektyvinių tyrimų metaanalizė neparodė jokio ryšio tarp bendrojo cholesterolio koncentracijos kraujyje, didelio tankio lipoproteinų cholesterolio, mažo tankio lipoproteinų cholesterolio koncentracijos ir bendros PV ar didelio laipsnio PV rizikos.<sup>26</sup> REDUCE tyrimo rezultatai taip pat neparodė prevencinio statinų poveikio PV rizikai.<sup>27</sup> Buvo ištirtas ryšys tarp įvairių mitybos veiksnių ir PV, tačiau vis dar yra mažai kokybiškų įrodymų.

### 3.3. Prostatos vėžio klasifikacija ir stadijavimas

PV išplitimo vertinimas, gavus galutinį patologinio tyrimo atsakymą, remiasi 2017 m. TNM klasifikacija ir atitinka klinikinį PV vertinimą, išskyrus T1c ir T2 stadijas (1 lentelė).

T1c stadija taikoma tik klinikiniam ligos įvertinimui. Patologiniame PV vertinime visi prostatose aptikti navikai vertinami kaip T2, pogrupiai nebenaudojami.<sup>29</sup> Pastaroji klasifikacija pagrįsta pacientų, kuriems yra panaši biocheminio atkryčio rizika po radikalių prostatektomijos (RP) ar išorinės spindulinės terapijos, grupavimu. Magnetinio rezonanso tomografija ir tikslinė biopsija ateityje gali lemti PV rizikos klasifikacijos pasikeitimą.

1 lentelė. Prostatos vėžio 2017 m. TNM klasifikacija.

<b>T – pirminis navikas</b>	
Tx	Pirminio naviko įvertinti neįmanoma
T0	Nėra pirminio naviko požymių
<b>T1</b>	<b>Kliniškai neaptinkamas, neapčiuopiamas navikas:</b>
T1a	Atlikus atsitiktinį rezekuoto audinio histologinį tyrimą nustatoma, kad iki 5 proc. rezekuoto audinio sudaro navikinės ląstelės
T1b	Atlikus atsitiktinį rezekuoto audinio histologinį tyrimą, nustatoma, kad naviko ląstelės sudaro daugiau kaip 5 proc. rezekuoto audinio
T1c	Navikas nustatomas prostatos biopsijos būdu, kai tyrimas atliekamas dėl PSA koncentracijos padidėjimo ar pakitimų mpMRT.
<b>T2</b>	<b>Navikas, kuris yra apčiuopiamas ir apribotas prostatose.</b>
T2a	Navikas apima pusę ar mažiau vienos skilties
T2b	Navikas apima daugiau kaip pusę vienos skilties
T2c	Navikas apima abi skiltis

<b>T – pirminis navikas</b>	
<b>T3</b>	Navikas išplitęs už prostatos kapsulės ribų <sup>1</sup>
T3a	Navikas išplitęs už vienos arba abiejų skilčių kapsulės ribų, įskaitant ir mikroskopinį šlapimo pūslės kaklelio pažeidimą
T3b	Navikas apima sėklinės pūsleles (vienos ar abiejų pusių)
<b>T4</b>	Navikas yra suaugęs su aplinkiniais organais (ne sėklinėmis pūslelėmis) arba į juos išplitęs (pažeidžia šlapimo pūslės kaklelį, išorinį rauką, tiesiąją žarną, keliamuosius raumenis arba dubens sieną)
<b>N – sritiniai limfmazgiai<sup>2</sup></b>	
Nx	Sritinių limfmazgių įvertinti neįmanoma
N0	Sritiniuose limfmazgiuose metastazių nėra
N1	Sritiniuose limfmazgiuose yra metastazių
<b>M – tolimosios metastazės<sup>3</sup></b>	
Mx	Tolimųjų metastazių įvertinti neįmanoma
M0	Tolimųjų metastazių nėra
M1	Yra tolimųjų metastazių
M1a	Yra metastazių nesritiniuose limfmazgiuose
M1b	Yra metastazių kauluose
M1c	Yra metastazių kitose organizmo vietose

<sup>1</sup> Naviko plitimas į prostatos viršūnę ar į prostatos kapsulę (bet ne už jos ribų) vertinama kaip T2, o ne kaip T3 liga.

<sup>2</sup> Ne didesnės kaip 0,2 cm metastazės gali būti žymimos pNmi.

<sup>3</sup> Kai metastazių randama keliuose vietose, pasirenkama blogesnė klasifikacijos kategorija. (p)M1c laikoma blogiausia klasifikacijos kategorija.

### 3.4. Prostatos vėžio histologinis vertinimas

*Gleason* vertinimo sistemoje buvo išskirti 5 *Gleason* laipsniai (nuo 1 iki 5), pagrįsti histologine naviko struktūra, tačiau 2005 m. ir vėlesniuose 2014 m. tarptautinės urologinės patologijos draugijos (ISUP) *Gleason* balo (GS) modifikacijose *Gleason* laipsniai 1 ir 2 buvo eliminuoti ir toliau yra pagrįsti *Gleason* skalės dviejų balų suma, kuri gali svyruoti nuo 2 iki 10 (2 žymi mažiausiai agresyvų, o 10 – agresyviausią naviką). Pirmasis *Gleason* skalės balas žymi prostatos patologinėje medžiagoje ar PB stulpelyje pagal dydį dominuojantį naviką, kitas balas – antrą pagal dydį naviką. Norint palengvinti prostatos adenokarcinomos agresyvumo žymėjimą, 2014 m. buvo suvienodinta PV ir kitų lokalizacijų navikų klasifikacija, gerai diferencijuotam PV nebenaudojant *Gleason* 6 žymėjimo bei išskiriant kliniškai skirtingos

elgsenos *Gleason 7 (3+4)* ir *Gleason 7 (4+3)* navikus, ir *Gleason* skalės balų sistemą pasiūlyta pakeisti ISUP balais (2 lentelė).<sup>29</sup>

2 lentelė. Prostatos vėžio vertinimo sistema pagal ISUP.

<b><i>Gleason</i> skalės balų suma</b>	<b>ISUP laipsnis</b>
2-6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 arba 3+5 arba 5+3)	4
9-10	5

### 3.5. Prostatos vėžio rizikos vertinimas

Pagrindinis prostatos vėžio rizikos vertinimo tikslas yra sugrupuoti vienodas klinikines išėtis turinčius ligonius, tam, kad kiekvienai rizikos grupei būtų galima parinkti tinkamiausią gydymo būdą. Europoje prostatos vėžio rizikai įvertinti yra naudojama Europos urologų asociacijos (EAU, angl. European Association of Urology) modifikuota D'Amico sistema.<sup>30-32</sup> Jungtinėse Amerikos Valstijose plačiausiai paplitęs NCCN (angl. National Comprehensive Cancer Network) rizikos vertinimo modelis (3 lentelė).<sup>33</sup> Šiuo metu abiejose rizikos vertinimo sistemose naudojamos tik klinikinės ir patloginės PV charakteristikos.

3 lentelė. EAU rizikos grupės dėl lokalizuoto ir lokaliai išplitusio prostatos vėžio biocheminio atkryčio.

Prostatos vėžio rizikos grupės			
Žema rizika	Vidutinė rizika	Didelė rizika	
PSA < 10 ng/mL ir GS < 7 (ISUP 1 laipsnis) ir <b>cT1-2a</b>	PSA 10–20 ng/mL arba GS 7 (ISUP 2/3 laipsnis) arba <b>cT2b</b>	PSA > 20 ng/mL arba GS > 7 (ISUP 4/5 laipsnis) arba <b>cT2c</b>	bet koks PSA bet koks GS (bet koks ISUP laipsnis) <b>cT3-4 arba cN+</b>
Lokali liga			Lokaliai išplitusi liga

GS = *Gleason* balas; ISUP = Tarptautinė urologinės patologijos draugija; PSA = prostatos specifinis antigenas.



### 3.6. Kliniškai reikšmingas prostatos vėžys

Prostatos vėžys yra heterogeninis onkologinis susirgimas, kurio eiga ir progresavimas gali būti skirtingi. Dalis PV turi didelį potencialą lokaliai plisti, greitai progresuoti bei metastazuoti ir tais atvejais PV laikomas kliniškai reikšmingu. Kita PV forma gali neturėti tokių požymių ir paprastai nesukelti paciento žūties. Šis atskyrimas yra ypač svarbus, nes kliniškai nereikšmingas PV, kuris nedaro didelės žalos, yra dažnai diagnozuojamas.<sup>34</sup> Jei diagnozuojant PV šios dvi grupės neatskiriamos, tokie kliniškai nereikšmingo vėžio atvejai gali būti intensyviai gydomi, o pats gydymas gali sukelti žalingą šalutinį poveikį pacientams. Dėl to vien tik PSA rodiklio padidėjimas nėra patikimas rodiklis PV diagnostikoje.<sup>35</sup>

Tačiau šiai dienai vis dar sunku apibrėžti, kas yra kliniškai reikšminga, o kas nereikšminga. Atliekant didelius radikaliąsias prostatektomijos mėginių tyrimus, kurie parodė tik 1 laipsnio ISUP ligą, ekstraprostatinis išplitimas (EPE) buvo itin retas (0,28 % iš 2502 atvejų), o sėklinių pūslelių (SV) invazija ar limfmazgių (LN) metastazių iš viso nepasireiškė.<sup>36,37</sup> Todėl pati tarptautinės urologinės patologijos draugijos 1 laipsnio liga gali būti laikoma kliniškai nereikšminga.

Dabartinė standartinė mpMRT pritaikomųjų ir sisteminių biopsijų praktika sumažino diagnostinį netikslumą, tačiau vis tiek gali įvykti biopsijos mėginių ėmimo klaida, todėl aukštesnio laipsnio vėžys gali likti nepastebėtas.<sup>38</sup> Tai turėtų būti ypač svarbu, jei ankstesnis mpMRT parodė įtartina prostatos pažeidimą, tačiau biopsijos metu buvo nustatytas tik ISUP 1 laipsnis. Kitas svarbus aspektas apibrėžiant kliniškai nereikšmingą prostatos vėžį yra tai, kad ISUP 1 laipsnis laikui bėgant gali progresuoti į aukštesnius laipsnius ir tapti kliniškai reikšmingu vėlesnės biopsijos metu.<sup>39</sup>

Todėl, nors pats ISUP 1 laipsnis gali būti apibūdinamas kaip kliniškai nereikšmingas, svarbu atsižvelgti į kitus veiksnius, įskaitant mpMRT atliktą prieš biopsiją ir tinkamą mėginių ėmimo skaičių. Reikėtų pažymėti tai, kad ISUP 1 laipsnio apibrėžimas kaip kliniškai nereikšmingas vėžys nereiškia, kad jį reikia ignoruoti, bet rekomenduojama saugiai stebėti. Epidemiologiniai ir skrodimo duomenys taip pat rodo, kad dalis ISUP 2 laipsnio PV liktų neaptinkami per vyro gyvenimą. Dabartinėse gairėse atidėtas gydymas gali būti pasiūlytas atrinktiems pacientams, turintiems vidutinės rizikos PV, tačiau trūksta įrodymų dėl tinkamų atrankos kriterijų.<sup>40</sup>

Naujausiuose straipsniuose kliniškai reikšmingas vėžys apibrėžiamas skirtingai, dažniausiai naudojamas 2 ir aukštesnio laipsnio ISUP ir net 3 ir aukštesnio laipsnio ISUP, o tai rodo, kad nėra sutarimo, dėl to yra svarbu, kad

klinikiniame tyrime būtų aiškiai apibrėžta, kokie pakitimai yra vertinami, kaip klinikškai reikšmingas prostatos vėžys ir tyrėjas tuo remtųsi.

### 3.7. Magnetinio rezonanso tomografijos reikšmė diagnozuojant prostatos vėžį

Koreliacija su radikaliąs prostektomijos mėginiais rodo, kad mpMRT turi gerą jautrumą ISUP > 2 laipsnio vėžio aptikimui ir lokalizavimui, ypač kai jų skersmuo didesnis nei 10 mm.<sup>7,41,42</sup> Šis geras jautrumas buvo patvirtintas pacientams, kuriems buvo atlikta saturacinė biopsija (>20 biopatų). *Cochrane* metaanalizėje, kurioje MRT buvo lyginamas su saturacine biopsija pirminiams ir antriniam pacientams, MRT bendras jautrumas buvo 0,91 (95 % PI: 0,83–0,95), o bendras specifiškumas – 0,37 (95 % PI: 0,29–0,46) esant > 2 laipsnio ISUP vėžiui.<sup>43</sup> ISUP klasės >3 vėžio atveju, MRT bendras jautrumas ir specifiškumas buvo atitinkamai 0,95 (95 % PI: 0,87–0,99) ir 0,35 (95 % PI: 0,26–0,46). Magnetinio rezonanso tomografija yra mažiau jautri nustatant ISUP 1 laipsnio PV. Ji nustato mažiau nei 30 % visų ISUP 1 laipsnio prostatos vėžio atvejų, kai navikas yra mažesnis nei 0,5 cm<sup>3</sup> dydžio, radikaliąs prostektomijos mėginiuose.<sup>7</sup>

Tikimybė aptikti piktybinį naviką pagal MRT identifikuotus pažeidimus buvo standartizuota pirmiausia naudojant 5 laipsnių Likert balų sistemą, o vėliau – PI-RADS balą, kuris buvo kelis kartus atnaujintas nuo jo įvedimo.<sup>6,44,45</sup> PI-RADS (prostatos vaizdinimo ataskaitų ir informacijos sistema) yra struktūrizuota ataskaitų teikimo schema, skirta multiparametrinei prostatos MRT, siekiant įvertinti įtariamą prostatos vėžį neįgydytose prostatos liaukose. PI-RADS sistemoje yra naudojama penkių balų skalė ir įvertinama kliniškai reikšmingo prostatos vėžio rizika.

PI-RADS 1 ir PI-RADS 2 nurodo, kad kliniškai reikšmingo prostatos vėžio rizika yra labai maža ar maža, o PI-RADS 4 ir PI-RADS 5 parodo aukštą arba labai aukštą navikinio proceso riziką. PI-RADS 3 nurodo vidutinę onkologinio susirgimo riziką, todėl šių pakitimų vertinimo, gydymo ir sekimo taktika visada sukelia daugiausia klausimų.

### 3.8. Klinikinis diagnostinis rodiklis PSA tankis (PSAD)

Prostatos specifinio antigeno tankis yra PSA kiekis serume, padalintas iš prostatos tūrio. Kuo didesnis PSAD, tuo didesnė tikimybė, kad PV yra kliniškai reikšmingas, ypač kai prostatos tūris yra mažas (PSAD ribinis dydis yra 0,15 ng/mL/cc).<sup>46,47</sup> Keletas tyrimų nustatė, kad kai PSAD viršija 0,1–0,15 ng/mL/cc, yra didelė rizika, kad pacientas serga PV.<sup>48</sup> Taip pat, mažai

tikėtina, kad pacientams, kurių PSAD yra mažesnis nei 0,09 ng/mL/cc, bus diagnozuotas kliniškai reikšmingas PV, tikimybė siekia tik (4 %).<sup>49</sup>

Sisteminė apžvalga parodė nevienalytiškumą tarp tyrimų, kuriuose PSAD buvo naudojamas siekiant atrinkti vyrus prostatos biopsijai pagal MRT rodmenis turinčius PI-RADS 3. Šiame tyrime buvo siūloma ribinę vertę laikyti kai PSAD yra 0,15 ng/mL/cc.<sup>47</sup> Kiti tyrėjai nustatė, kad PSAD pridėtinė vertė, kai yra atliekamos pritaikomosios prostatos biopsijos yra neaiški, nes plotas po kreive (AUC) yra 0,87–0,95, kai nustatomas kliniškai reikšmingas PV, remiantis mpMRT, ir plotas po kreive (AUC) yra 0,91–0,95 remiantis mpMRT ir PSAD kombinacija.<sup>50</sup>

### 3.9. Komerciniai neinvaziniai PV testai

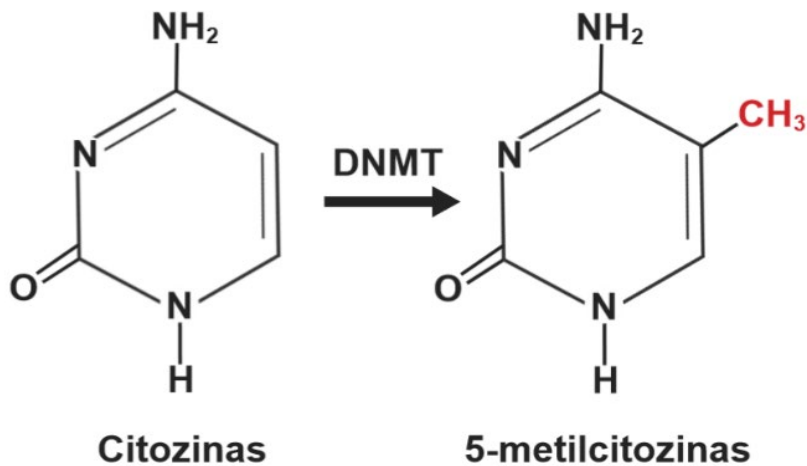
- Prostatos vėžio antigenas 3 (*PCA3*) yra ilga nekoduojanti RNR, taip pat žinoma kaip DD3, turinti didesnę raiškos lygį PV ląstelėse nei sveikose prostatos ląstelėse.<sup>51</sup> Prostatos vėžio genas 3 (*PCA3*) yra (*lncRNR*) biomarkeris, kuris aptinkamas šlapimo nuosėdose, gautose po prostatos masažo DRT metu. Tačiau komerciškai prieinamo šlapimo tyrimo *PCA3* klinikinis naudingumas priimant sprendimus dėl biopsijos lieka neaiškus. Visgi derinant MRT rezultatus su *PCA3* raiška galima pagerinti PV rizikos stratifikaciją.<sup>52</sup>
- *SelectMDX* testas yra pagrįstas mRNR biomarkerio aptikimu šlapime. Tyrimo metu yra vertinama *HOXC6* ir *DLX1* biomarkerių mRNR raiška, tam, kad būtų galima nustatyti ar pacientas serga PV ir taip pat nustatyti, kokia yra kliniškai reikšmingo PV tikimybė.<sup>53</sup> Naudojant *SelectMDX* testą ir mpMRT pacientams, kurių PSA yra 3–10 ng/mL, NPV buvo 93 %.<sup>54</sup> Tačiau klinikinė pridėtinė *SelectMDX* vertė mpMRT/UG kontroliuojamų pritaikomųjų prostatos biopsijų eroje lieka neaiški.<sup>55</sup>
- *TMPRSS2-ERG* - transmembraninės proteazės serino 2 (*TMPRSS2*) ir *ERG* genų susiliejimas gali būti aptiktas 50 % PV atveju.<sup>56</sup> Kai *TMPRSS2-ERG* genų aptikimas šlapime buvo panaudotas pridėdant prie *PCA3* ekspresijos ir serumo PSA reikšmės (Mi(chigan)Prostate Score [MiPS] testas), tomet kliniškai reikšmingo PV nustatymas ženkliai pagerėjo.<sup>57, 58,59,</sup>
- *ExoDx Prostate(IntelliScore)* EPI testas, yra šlapimo nuosėdose tiriamų egzosomose esančių genų ekspresijos tyrimas skirtas atrinkti pacientus prostatos biopsijai. Šis testas yra skirtas 50 metų ir vyresniems vyrams, kurių prostatos specifinis antigenas (PSA) yra 2–10 ng/ml arba PSA „pilka zona“, atsižvelgiant į pirminės prostatos biopsijos rezultatą. Naudojant *ExoDx Prostate IntelliScore* šlapimo egzosomų tyrimą, buvo

išvengta 27 % nereikalingų prostatos biopsijų, palyginti su standartiniu ištyrimu. Tačiau šiuo metu tiek MiPS balas, tiek ExoDx tyrimas yra laikomi tiriamaisiais ir klinikinėje praktikoje šių testų panaudojimas nėra iki galo iširtas.

### 3.10. Prostatos vėžio epigenetiniai pokyčiai

Prostatos vėžio atveju DNR metilinimo profiliui būdingi dveji pokyčiai: DNR gali būti hipermetilinta, ypač CpG salų, persidengiančių su reguliaciniais genomo elementais, srityse, arba hipometilinta, kai dėl demetilinimo tam tikri genomo regionai būna mažiau metilinti nei įprastai. Abu šie procesai itin svarbūs kancerogenezei, tačiau jų veikimo mechanizmai vėžio formavimosi metu yra skirtingi.

DNR metilinimas yra vienas iš geriausiai iširtų epigenetinių genų raiškos reguliacijos mechanizmų. Žinduolių organizmuose DNR metiltransferazės (DNMT) atlieka metilo grupės perkėlimą nuo S-adenozil-L-metionino (SAM) ant citozino ir guanino dinukleotidų (CpG) kontekste esančio citozino pirimidino žiedo 5 anglies atomo. Metilo grupę perkėlus ant citozino susidaro 5-metilcitozinas (5mC) (4 pav.), o SAM virsta S-adenozil-L-homocisteinu (SAH).



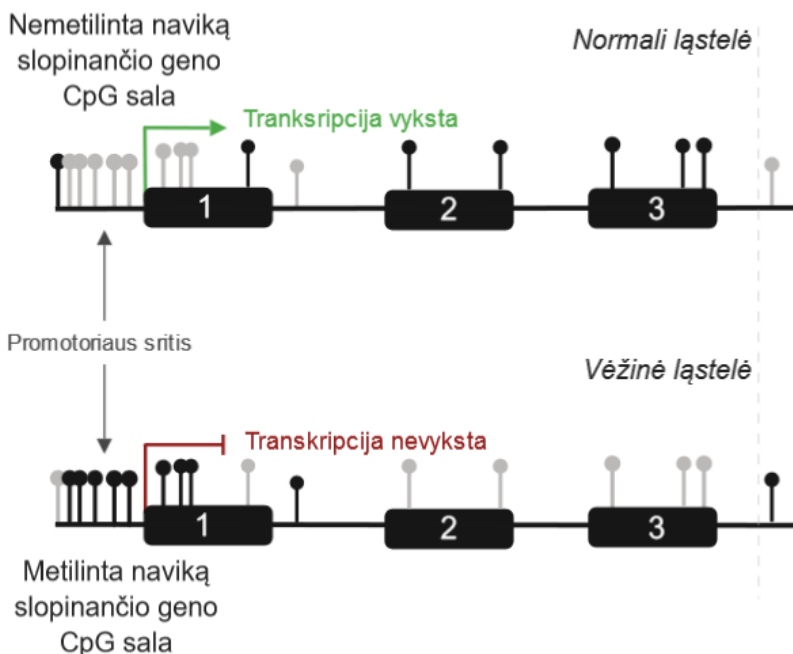
4 pav. DNR metiltransferazės (DNMT) perkelia metilo grupę ant citozino ir pakeičia vandenilio atomą, susidaro 5-metilcitozinas (5mC). Raudona spalva pažymėta metilo grupė.

Epigenetiniai pakitimai itin svarbūs PV vystymuisi ir progresijai. Jie sukelia genų raiškos pokyčius, lemiančius ląstelės fenotipo kaitą.

### 3.11. Genų hipermetilinimas

Manoma, kad dažniausias epigenetinis pakitimas PV atveju yra DNR hipermetilinimas. Hipermetilinimo metu yra nuslopinama genų raiška, kurie yra atsakingi už DNR pažaidų taisymą, apoptozę, ląstelės ciklo kontrolę ar metastazių susidarymą.<sup>60</sup> Tai siejama su chromatino struktūrą reguliuojančių baltymų raiškos pokyčiais, ypač su PRC2 (angl. polycomb repressive complex 2) baltymo raiška. Nustatyta, kad hipermetilinimas PV atveju tiesiogiai koreliuoja su PRC2 aktyvinančio baltymo EZH2 (angl. enhancer of zeste homolog 2) raiška. Šie baltymai sąveikauja su DNMT ir reguliuoja kitų genų hipermetilinimą, kartais šis reiškinys dar vadinamas „epigenetine katastrofa“.<sup>60</sup>

Taigi, DNR metilinimo pokyčiai prostatos audiniuose itin svarbūs vėžio vystymuisi ir progresijai. Pasitelkus naujausius molekulinės genetikos metodus ne tik identifikuojami nauji taikiniai, tačiau nustatomi tinkamiausi biožymenys bei jų kombinacijos PV diagnostikai bei prognostikai. Genominės DNR hipermetilinimas gali atsirasti tiek ankstyvose, tiek ir vėlyvose PV stadijose. CpG salų metilinimas promotoriaus srityje yra geriausiai ištirtas epigenetinis pokytis PV atveju.<sup>61</sup> Dėl šių priežasčių manoma, jog promotoriaus metilinimo tyrimai gali padėti identifikuoti potencialius biožymenis, kurie padėtų diagnozuoti PV ankstyvose stadijose ir prognozuoti ligos eigą. Naviką slopinančių genų promotoriaus hipermetilinimas itin svarbus PV kancerogenezei. Sveikose ląstelėse naviką slopinančių genų promotoriai yra nemetilinti, tačiau vėžinėse ląstelėse nustatomas šių sekų hipermetilinimas. Taip nuslopinama geno raiška ir jis tampa nefunkcionalus (5 pav.).



5 pav. CpG metilinimo pokyčiai normaliose ir vėžinėse ląstelėse. Schemoje vaizduojamas naviką slopinantis genas su prieš srove esančios CpG salos fragmentu. Juodi stačiakampiai – egzoniai, pilki skrituliai – nemetilinti CpG dinukleotidai, juodi skrituliai – metilinti CpG dinukleotidai.

Hipermetilinus naviką slopinančių genų reguliacinius elementus ląstelė pradeda nekontroliuojamai dalytis, o tokių ląstelių sankaupos formuoja navikus.

Žinoma daugiau nei 100 genų, kurių hipermetilinimas yra susijęs su PV vystymusi.<sup>60</sup> Dar 1994 m. nustatyta, kad PV atveju vienas ankstyviausių pokyčių yra glutationo S-transferazės pi 1 geno promotoriaus (angl. glutathione S-transferase pi 1; *GSTP1*) hipermetilinimas.<sup>62</sup> *GSTP1* hipermetilinimas tirtas įvairiuose klinikiniuose PV mėginiuose.<sup>60</sup> Nustatyta, kad *GSTP1* ir retinoinės rūgšties receptoriaus  $\beta$  (angl. retinoic acid receptor  $\beta$ ; *RARB*) kombinacija pagerino PV diagnozės nustatymą<sup>63</sup>, o *GSTP1* kombinacija su *APC* (angl. adenomatous polyposis coli), *MDR1* (angl. multidrug resistance gene 1) ir *RAS* sąveikos domeną turinčių baltymų šeimos 1 genas (angl. RAS association domain family member 1; *RASSF1*) taip pat padidino tyrimo jautrumą ir specifiškumą.<sup>60</sup>

Ieškant hipermetilavimo sąsajų su PV rizikos faktoriais pastebėta, kad *RARB*, *NKX2-5* (angl. NK2 homeobox 2-5) ir *ESR1* (angl. human estrogen receptor 1) genų promotoriai buvo dažniau metilinti vyresnio amžiaus PV ligonių grupėje, o *AR* (angl. androgen receptor), *RARB*, *NKX2-5*, *SPARC* (angl. secreted protein acidic and cysteine-rich) ir *TIMP3* (angl. tissue inhibitor of metalloproteinase 3) metilavimas buvo dažnesnis PV sergančių afroamerikiečių grupėje, palyginus su baltaodžiais amerikiečiais.<sup>64</sup>

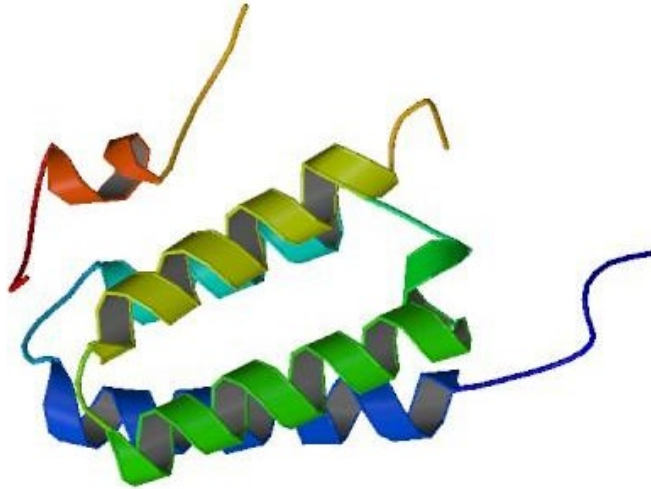
Kai kurių DNR hipermetilavimas gali būti siejamas ne tik su vėžio diagnoze, bet ir su ligos progresija bei atsaku į gydymą. 2016 m. nustatyta specifinė *TERT* (angl. telomerase reverse transcriptase) geno promotoriaus sritis vadinama *THOR* (angl. *TERT* hypermethylated oncological region), kuri hipermetilinta vėžio atveju ir jos metilavimas nėra nustatomas sveikame audinyje. PV atveju šios srities hipermetilavimas papildė PSA tyrimą ir gali padėti prognozuoti ligos eigą. Taip pat buvo nustatyta ir *CDO1* (angl. cysteine dioxygenase 1) geno promotoriaus hipermetilavimo prognostinė vertė PV atveju. Ištyrus PV sergančių ligonių kraujo serumo ir šlapimo mėginius šio geno promotoriaus hipermetilavimas buvo susietas su biochemine ligos progresija ir agresyvesne ligos forma. Nustatyta *CDO1* promotoriaus metilavimo reikšmė vertinant atsaką į PV gydymą pirmos eilės chemoterapiu vaistu docetakseliu bei kombinuojant jį su androgenų terapija.

### 3.12. Genų hipometilavimas

Kitas epigenetinis reiškinys - globalus genomo hipometilavimas - atsiranda dėl demetilavimo, kuris vyksta, kai 5mC oksiduojamas iki 5-hidroksimetilcitozino (5hmC). Tuomet TET dioksidogenazė oksiduoja 5hmC iki 5-formilcitozino (5fC) ir 5-karboksicitozino (5caC). Timino-DNR glikozilazė ekscizijos būdu pakeičia 5fC ir 5caC į citoziną.<sup>65</sup> Taip iš 5mC gaunamas citozinas. Tiriant DNR metilavimo pokyčius navikuose, pirmiausiai buvo nustatyta, kad vėžinių ląstelių genomas, palyginus su sveikomis ląstelėmis, patiria 5mC kiekio sumažėjimą.<sup>66</sup> Vėžinė ląstelė turi 20-60 % mažiau 5mC nei to paties audinio sveika ląstelė.<sup>67</sup> Globalaus hipometilavimo tyrimai parodė, kad PV atveju būdinga padidėjusi proteazė urokinazė (uPA; angl. urokinase-type plasminogen activator) koduojančio geno raiška ir nustatytas šio geno promotoriaus hipometilavimas.<sup>68</sup> Vėžio atveju nustatomas ne tik globalus genomo hipometilavimas, bet genai būna inaktyvuojami hipermetilavimą reguliacines jų sekas.

## 4. GENAI SUSIJĘ SU PROSTATOS VĖŽIO VYSTIMUSI

### 4.1. Ras sąveikos domeną turinčių baltymų 1 šeimos (*RASSF1*) baltymas



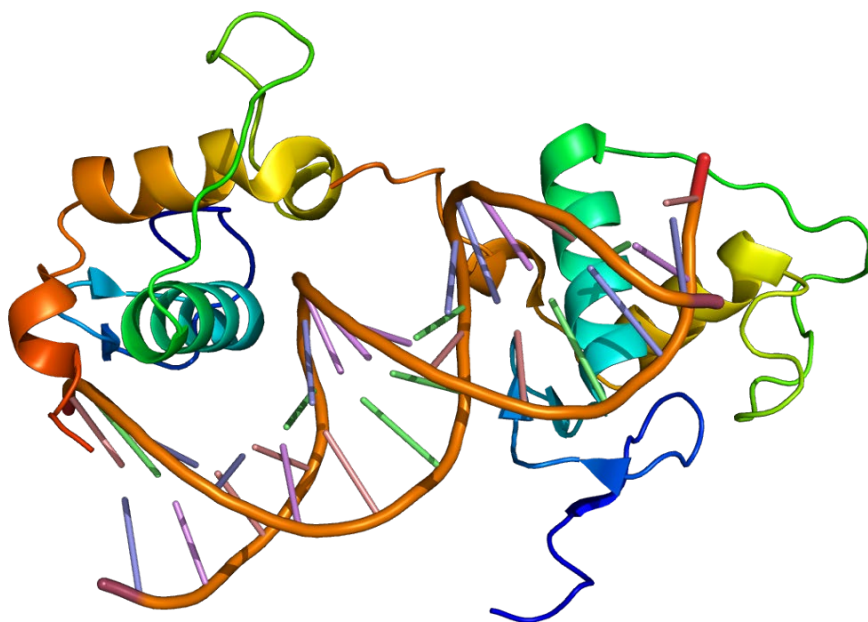
6 pav. Ras sąveikos domeną turinčių baltymų 1 šeimos (*RASSF1*) baltymas

*RASSF1* tai yra naviko augimą slopinantis genas, esantis 3p21 regione. Šis genas priklauso Ras GTPazės šeimai (RASSF), kurią sudaro dešimt skirtingų genų (*RASSF1–RASSF10*), koduojančių dešimt skirtingų baltymų.<sup>69</sup> Visi šios šeimos genai atsakingi už signalų perdavimą ląstelės signaliniuose keliuose, susijusiuose su ląstelių proliferacija, diferenciacija, apoptoze ir kt.<sup>70</sup> Iš viso nustatytos aštuonios skirtingos *RASSF1* izoformos A–H,<sup>70</sup> iš kurių *RASSF1* raiškos sumažėjimas, sukeltas *RASSF1* (toliau *RASSF1*) promotoriaus metilinimo, nustatytas įvairių lokalizacijų navikuose, tokiuose kaip: sėklidžių, inkstų, šlapimo pūslės, skydliaukės, plaučių, kiaušidžių bei prostatos.<sup>71–77</sup>

Autorių duomenimis, *RASSF1* geno hipermetilinimas nustatytas 28–99 proc. prostatos navikinių audinių. 8 iš 12 studijų metilinimo dažnis siekė 54 proc. Prostatos vėžiu sergančių ligonių šlapime *RASSF1* hipermetilinimas aptinkamas 38–78 proc. tiriamųjų, kraujo.



## 4.2. Retinoinės rūgšties receptoriaus $\beta$ (*RARB*) baltymas



7 pav. Retinoinės rūgšties receptoriaus  $\beta$  (*RARB*) baltymas

Iš viso nustatyti trys RAR tipai: *RAR $\alpha$* , *RARB* ir *RAR $\gamma$* . Minėtinas *RARB*, itin svarbus epitelinių ląstelių augimui ir diferenciacijai. *RARB* geno, randamo 3p24 regione<sup>78</sup>, metilinant promotorių sutrinka *RARB* geno raiška, kartu ir apsauginė jo funkcija<sup>79</sup>. *RARB* hipermetilinimas nustatytas prostatos, plaučių, krūties, kiaušidžių, inkstų ir kitų lokalizacijų navikuose. Literatūros duomenimis, hipermetilintas *RARB* promotorius randamas tarp 40–96 proc. prostatos navikinių audinių.

Minėtina, kad 8 iš 12 studijų metilinimo dažnis siekė  $\geq 69$  proc. PV sergančių ligonių šlapime hipermetilintas *RARB* nustatytas 35–62 proc., kraujo mėginiuose – 79–98 proc. atvejų. I. Steiner ir bendraautorių duomenimis<sup>80</sup>, *RARB* hipermetilinimas susijęs su PV agresyvumu. Neinvaziniai šlapimo tyrimai parodė, kad *RARB* promotoriaus hipermetilinimas gali būti siejamas su klinikiniais rodikliais, pavyzdžiui, aukštesniu *Gleason* balu.

### 4.3. Adenominės polipozės coli (*APC*) baltymas

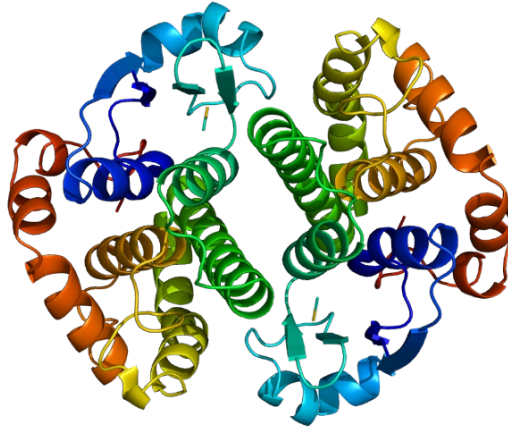


8 pav. Adenominės polipozės coli (*APC*) baltymas

*APC* baltymas padeda kontroliuoti, kaip dažnai ląstelė dalijasi, kaip ji prisijungia prie kitų audinio ląstelių, kaip ląstelė poliarizuojasi. Šis baltymas taip pat padeda užtikrinti, teisingą chromosomų skaičių dalijantis ląstelėmis. Šias užduotis *APC* baltymas atlieka daugiausia sąveikaudamas su kitais baltymais, ypač susijusiais su ląstelių sąveikomis ir signalų perdavimu.<sup>81</sup> Adenominės polipozės coli (*APC*) baltymas, turi svarbų vaidmenį PV onkogenezės procesuose.<sup>82</sup> *APC* hipermetilinimas yra stebimas sergant agresyvia PV forma.<sup>83</sup>

Keliuose tyrimuose *APC* kartu su *GSTP1* hipermetilimu buvo naudojamas kaip prognostinis faktorius nustatant kliniškai reikšmingą PV, bei turintis sąsają su ligos progresavimu ir mirtimi nuo PV.<sup>84,85</sup> Taip pat buvo pastebėta, kad *APC* hipermetilinimas yra individualus prostatos vėžio biocheminio progresavimo žymuo<sup>86</sup> ir susijęs su ankstyvu PV metastazavimu ir progresavimu. Henrique ir kt. tyrime vertinant sekstantines prostatos biopsijas (n = 83), išanalizavo 5 genų (*APC*, *CCND2*, *GSTP1*, *RARB*, *RASSF1*) metilinimo lygį, iš kurių *APC* buvo susijęs su biocheminiu progresavimu ir mirtimi nuo PV.<sup>84</sup>

#### 4.4. Glutatio S-transferazės pi 1 klasės (*GSTP1*) baltymas



9 pav. Glutatio S-transferazės pi 1 klasės (*GSTP1*) baltymas

Šios šeimos baltymai pasižymi antioksidaciniu poveikiu. Glutatio, prisijungia prie žalingų junginių ir taip apsaugo DNR nuo galimų pažeidimų.<sup>87,88</sup> Viso yra nustatytos aštuonios GST klasės: alpha, kapa, mu, omega, pi, sigma, theta ir zeta.<sup>89</sup> *GSTP1* – naviko augimą slopinantis genas, esantis 11q13 regione yra atsakingas už glutatio S-transferazės pi 1 baltymo sintezę.<sup>89</sup> *GSTP1* geno promotoriaus metilinimo metu dalinai sutrinka *GSTP1* baltymų sintezė,<sup>90</sup> o kartu ir DNR apsauginė funkcija. *GSTP1* hipermetilinimas labiausiai ištirtas kaip PV žymuo.<sup>60,91</sup> Tačiau yra tirtas ir hepatoceliulinėje karcinomoje, krūties, plaučių ir storžarnos navikuose.<sup>92</sup> Įvairių autorių duomenimis, *GSTP1* hipermetilinimas nustatytas 17–95 proc. prostatos navikinių audinių. Minėtina, kad 17 iš 24 studijų metilinimo dažnis siekė  $\geq 72$  proc. PV sergančių ligonių šlapime *GSTP1* buvo hipermetilintas 27–83 proc. atvejų, kraujo mėginių metilinimo dažnis siekė 28–95 proc.

Atskirų studijų duomenimis, *GSTP1* hipermetilinimas taip pat buvo nustatytas 86 proc. prostatos sekreto<sup>93</sup> ir 44–50 proc. sėklos mėginių.<sup>94,95</sup> Metaanalizės<sup>53</sup> duomenimis, *GSTP1* hipermetilinimas yra glaudžiai susijęs su prostatos vėžiu (šansų santykis (OR; angl. odds ratio) – 18,6 95 proc. pasikliautinis intervalas (CI; angl. confidence interval): 9,60–35,95;  $p < 0,001$ ). *GSTP1* mažai tirtas kaip prognostinis ar predikcinis PV žymuo, tačiau mokslinėje literatūroje aprašytas jo ryšys su ligos agresyvumu ir patologine stadija<sup>80,96–98</sup>, biocheminiu,<sup>99</sup> lokaliu ir sisteminiu ligos atkryčiu,<sup>100</sup> atsaku į chemoterapinį gydymą docetakseliu bei bendru išgyvenamumu.<sup>101</sup>

#### 4.5. Genų hipermetilinimas sveikame prostatos audinyje ir kancerizacijos lauke

Prostatos lauko kancerizacijos reiškinys atsiranda, kai organo ar audinio paviršiaus plotas yra paveiktas kancerogeninio pažeidimo, dėl kurio aptinkami daugiažidiniai epigenetiniai pokyčiai ir molekuliniai pažeidimai, kurie lemia histologinius pokyčius. Iki šiol buvo nustatyti kancerizacijos lauko efektai, apimantys branduolio morfometrinius pokyčius, baltymų ekspresiją, genų promotoriaus metilinimą, DNR pažeidimus ir angiogenezę. *RASSF1* promotoriaus hipermetilinimas 93 proc. atvejų nustatytas ir normaliame prostatos ir gėrybinės prostatos hiperplazijos audinyje. Minėtina, kad 11 iš 12 studijų jis siekė < 29 proc. ir tik vienoje studijoje<sup>97</sup> nustatytas itin aukštas (93 %) metilinimo dažnis esant gėrybinės prostatos hiperplazijai. PV nesergančių vyrų šlapime *RASSF1* geno hipermetilinimas nustatytas tik 8–29 proc. atvejų. Panašūs rezultatai nustatyti kraujo mėginiuose – 23–25 proc. Metaanalizės<sup>77</sup> duomenimis, testo jautrumas prostatos vėžiui nustatyti siekia 76 proc., o specifiskumas – 87 proc. *RASSF1* promotoriaus metilinimas rastas ir PIN atveju.<sup>102–104</sup> J. Mehrots ir kt.,<sup>105</sup> *RASSF1* promotoriaus metilinimas taip pat nustatytas morfologinių naviko požymių neturinčiuose prostatos perinavikiniuose audiniuose (kancerizacijos lauke).

*RARB* promotoriaus hipermetilinimas normaliame prostatos ar GPH audinyje nustatomas retai vos 0–30 proc. atvejų. 10 iš 11 studijų duomenimis, jis siekė  $\leq 3$  proc. ir tik vienoje studijoje<sup>106</sup> nustatytas aukštesnis (30 %) metilinimo dažnis, esant GPH kontrolei. PV nesergančių vyrų šlapime *RARB* buvo hipermetilintas tik 0–9 proc. tiriamųjų. Panašūs rezultatai gauti ir kraujo mėginiuose – 9–11 proc. atvejų. *RARB* promotoriaus metilinimas nustatytas ir PIN metu<sup>96,102</sup>, taip pat perinavikiniuose prostatos audiniuose.<sup>53,105,107,108</sup> Svarbius *RARB* geno metilinimo skirtumus tarp prostatos navikinio ir sveiko audinio patvirtina 2018 m. atlikta metaanalizė: OR – 21,65; 95 % CI: 9,27–50,57;  $p < 0,001$ .<sup>108</sup>

*GSTP1* promotoriaus metilinimas prostatos normaliame ar GPH audinyje rastas 0–24 proc. atvejų. Minėtina, kad 15 iš 19 studijų jis siekė tik 0–6 proc. PV nesergančių vyrų šlapime *GSTP1* buvo hipermetilintas 0–28 proc. tiriamųjų, panašūs rezultatai pastebėti ir kraujo mėginiuose – 0–21 proc. atvejų. *GSTP1* promotoriaus metilinimas nustatytas PIN metu,<sup>96,102,103,109</sup> taip pat normaliuose perinavikiniuose prostatos audiniuose.<sup>85,107,110</sup> Tai patvirtina epigenetinio lauko efektą (kancerizacijos lauką) morfologiškai nepakitusiame prostatos audinyje.

## 5. TYRIMO METODOLOGIJA

Šiam biomedicininam tyrimui atlikti 2019-11-05 Vilniaus regioninis biomedicininų tyrimų etikos komitetas (VRBTEK) išdavė leidimą NR 2019/11-166-654. Leidimas išduotas iki 2022-11-01. 2020-10-27 VRBTEK gautas leidimas dėl papildymo ir pratęsimo iki 2023-11-01 NR 2020-LP-68.

Dalyvauti tyrime buvo kviečiami ligoniai, tirti ir gydyti Nacionaliniame vėžio institute (NVI), kurie atitiko įtraukimo į tyrimą kriterijus ir kuriems nenustatyta atmetimo kriterijų, bei buvo gautas informuotas sutikimas. Prostatos biopsijos atliktos NVI Onkourologijos skyriuje. Molekuliniai tyrimai atlikti NVI Genetinės diagnostikos laboratorijoje.

### 5.1. Įtraukimo kriterijai

- 5.1.1. mpMRI su pažeidimais, turinčiais PI-RADS rezultata, lygų arba didesni kaip 3;
- 5.1.2. Amžius > 18 m;
- 5.1.3. Padidėjęs arba augantis PSA (PSA > 2,5 ng / ml (30–50 metų amžiaus) arba PSA > 4,0 amžiaus (50–79));
- 5.1.4. Įtartinas DRE;
- 5.1.5. Pasirašytas informuoto asmens sutikimo formos dokumentas;
- 5.1.6. Planuojama atlikti arba pirminę biopsiją, arba pakartotinę biopsiją, kai informacijos apie buvusius rezultatus nepakanka gydymo taktikai numatyti.

### 5.2. Atmetimo kriterijai

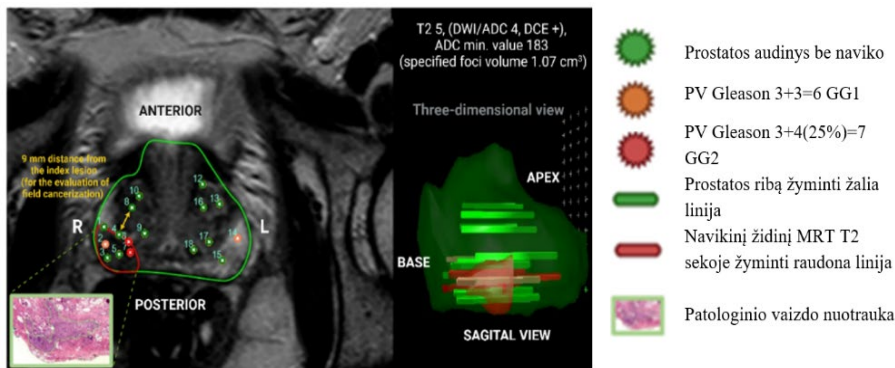
- 5.2.1. Amžius < 18 m. arba >80 m.;
- 5.2.2. Gdomas prostatos vėžys (radioterapija, antiandrogenų terapija, brachiterapija);
- 5.2.3. Ankstesnis gydymas dėl prostatos vėžio;
- 5.2.4. Bet kokia kontraindikacija prie standartinės prostatos biopsijos procedūros;
- 5.2.5. Atsisakyta pasirašyti informuoto asmens sutikimo formos dokumentą;
- 5.2.6. Neatliktas prostatos mpMRT;
- 5.2.7. PI-RADS v2.1 klasifikacija 2 ar mažesnė.

### 5.3. Pacientai ir ėminiai

Į tyrimą buvo įtraukti visi pacientai, kuriems 2019 m. lapkričio – 2022 m. vasario mėn. NVI buvo atlikta pirminė mpMRT/UG kontroliuojama pritaikomoji prostatos biopsija dėl įtariamos lokalizuotos prostatos karcinomos. Visi 1,5 teslų ir 3 teslų mpMRT tyrimai buvo atlikti toje pačioje įstaigoje (NVI) pagal standartizuotą protokolą, o išoriniai vaizdai buvo iš naujo įvertinti prieš atliekant prostatos biopsiją. PI-RADSV2.1 balų sistema buvo naudojama mpMRT rezultatams įvertinti.

Prostatos ribų ir tikslinių pažeidimų kontūravimą atliko du patyrę radiologai, naudodami skersinius T2 sekos vaizdus. mpMRT/UG kontroliuojamos biopsijos buvo atliktos naudojant „BioJet“ sistemą (D&K Technologies, Barum, Vokietija), naudojant transperinealinį metodą, kurias atliko vienas intervencinis radiologas. Be to, naudojome šią techniką tam, kad tai leido išvengti prasiskverbimo į tiesiosios žarnos sienelę ir dėl to traktuota, kad esama nulinė infekcijos rizika.<sup>111</sup> Visiems pacientams buvo atlikta prostatos biopsija taikant bendrąją nejautrą.

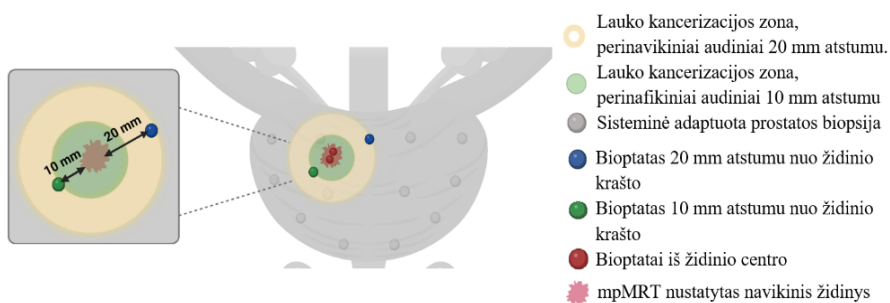
Remiantis literatūros metaanalizės išvadomis, šlapimo takų infekcijos profilaktikai procedūros metu buvo skirtas tik 1 gramas cefazolino.<sup>112</sup> Visiems pacientams buvo atlikta pritaikomoji ir adaptuotos sisteminės biopsijos. Iš kiekvieno PI-RADS v2.1 3-5 pažeidimo buvo paimtos 2–4 biopsijos, o po to – papildomai atlikta sisteminė dvyliktinė biopsija, ignoruojant mpMRT stebimus pažeidimus. Taigi, pritaikomosios prostatos biopsijos metu iš pažeidimų paimtų biopsijų skaičiaus mediana buvo 4 (DS = 1, 68), o sisteminio mėginių ėmimo metu buvo paimta 12 bioptatų, kai mediana (SD = 4,8). Apskritai, vienos procedūros metu atliktas biopsijų skaičiaus vidurkis buvo 16 (SD = 4,5). Esant didelio tūrio prostatai ir (arba) didelio dydžio navikinių pažeidimų atveju buvo leidžiami nedideli biopsijos skaičiaus skirtumai. Prostatos biopsijos procedūros atlikimo schema patikslinanti bioptatų vietą (10 pav.).



10 pav. Prostato liaukos mpMRT trimatis vaizdas po prostato biopsijos patikslintas histologiniu rezultatu. Originalus vaizdas modifikuotas <https://www.biorender.com/>

#### 5.4. Pritaikomosios biopsijos atlikimo schema ir mėginių skaičius

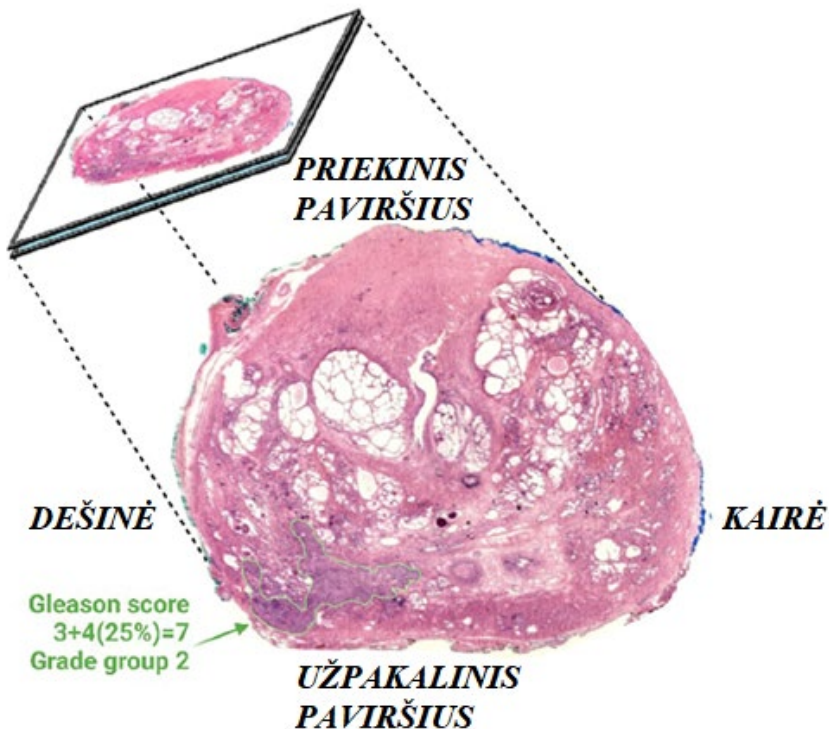
Iš kiekvieno PI-RADS 3-5 pažymėto židinio buvo atlikta pritaikomoji MRT/UG kontroliuojama 2–4 branduolių biopsija, po to atlikta sisteminė adaptuota 12 bioptatų biopsija, bei paimtos papildomos 4 biopsijos iš skirtingų 10 mm ir 20 mm atstumų nuo židinio krašto DNR metilinimo analizei. Kiekvienam pacientui, naudojant 22 mm automatinį biopsinį įrenginį, buvo paimti keturi biopsiniai mėginiai: 2 mėginiai iš židinio, vienas iš perifokalinės zonos 10 mm atstumu nuo esančio židinio ir kitas (kontrolinis mėginys) – 20 mm atstumu nuo židinio (20 mm atstumu nuo židinio buvo imti mėginiai iš priešingos prostato skilties (11 pav.).



11 pav. Prostato biopsijos technika ir lauko vėžio nustatymo schema. Sukurta naudojant <https://www.biorender.com/>.

Visi biopsijos mėginiai įvertinti Valstybinio patologijos centro (Vilnius, Lietuva) specializuotų urologų ir išvados pateiktos pagal EAU

rekomendacijas.<sup>113,114</sup> Kliniškai reikšmingas prostatos vėžys buvo apibrėžtas kaip ISUP laipsnio grupė  $\geq 2$ , nustatyta nors viename bioplate. Visi išanalizuoti mėginiai, buvo išsiųsti į NVI Genetinės diagnostikos laboratoriją DNR gryninimo procedūrai ir tolesnei epigenetinei analizei atlikti. Radikalios prostatektomijos mėginys buvo fiksuotas 10% neutraliame buferiniame formaline 24 valandas. Valstybiniame patologijos centre po fiksavimo audinys buvo nuosekliai padalintas 3-5 mm intervalais į statmenas dalis (apie 4 mm storio). Sekcijos buvo dehidratuotos ir įterptos į parafino vašką. H&E dažytos sekcijos (5  $\mu$ m storio) buvo pagamintos mikroskopiniam vertinimui naudojant viso pjūvio (angl. Wholemout) vaizdus. Buvo įvertinta visa RP mėginių histopatologija (12 pav.) ir lyginama su mpMRT vaizdais tuose pačiuose pjūviuose.<sup>115,116</sup> Šis vaizdų suliejimas buvo naudojamas prostatos biopsijų vietai patikslinti ir tiksliai įvertinti perifokalinio lauko biopsijų atstumus nuo pagrindinio navikinio pažeidimo siekiant atlikti kokybinę hipermetilintų genų analizę.



12 paveikslas. Viso pjūvio (angl. Wholemout) histopatologinis vaizdas. Prostatos vidutiniškai diferencijuota (*Gleason* 3 + 4(25%) = 7, Grade Group 2) acininė adenokarcinoma (su intraduktaliniu naviko plitimu).



## 5.5. DNR išskyrimas ir bisulfitinė konversija

Formaline fiksuoti ir parafine įlieti (FFPE) prostatos audiniai buvo iš anksto apdoroti 1 ml ksileno (Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija) 10 min. 55 °C temperatūroje du kartus. Ksilenas buvo pašalintas iš mėginių, inkubuojant juos su 1 ml 96% etanolio 55 °C temperatūroje 10 minučių. Mėginiai toliau buvo apdoroti 25 µl proteinazės K (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, JAV) 18 valandų 55 °C temperatūroje ir 500 µl lizės buferio, sudaryto iš 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 1. mM EDTA, 0,5 % Tween-20 (visi iš Carl Roth, Karlsruhe, Vokietija). Visi šlapimo mėginiai (n = 272) buvo paruošti ir toliau apdoroti pagal standartinį protokolą.<sup>117</sup>

DNR grynimui iš šlapimo nuosėdų mėginių naudotas lizės buferis, susidedantis iš 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 % SDS ir 75 mM NaCl (visi iš Carl Roth Germany). DNR buvo išgryninta naudojant standartinį fenolio-chloroformo gryninimo ir nusodinimo etanoliumi metodą. Kokybinei DNR metilinimo analizei atlikti iki 400 ng išgryninta DNR buvo modifikuota bisulfitu, naudojant EZ DNA Methylation™ rinkinį (Zymo Research, Irvine, CA, JAV) pagal gamintojo protokolą, išskyrus tai, kad pradinė mėginių inkubacija buvo atlikta 42 °C 15 min., o ne 37 °C.

## 5.6. Kiekybinė metilinimui specifinė PGR

*RARB* ir *GSTP1* genų tyrimui qMSP pradmenys ir zondai, būdingi metilintai DNR, buvo sukurti naudojant Methyl Primer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, JAV) ir užsakyti iš Metabion (Martinsried, Vokietija). *APC*, *RASSF1* ir *ACTB* pradmenų sekos buvo sukurtos ankstesniuose tyrimuose.<sup>116,118</sup> *ACTB* buvo naudojamas kiekviename bandyme DNR įvesties normalizavimui. qMSP buvo atliekamas trimis pakartojimais kiekvienam pradmenų rinkiniui atskiruose šuliniuose. Reakcijos mišinį (iš viso 20 µl) sudarė 1 × TaqMan® Universal Master Mix II, be UNG (Applied Biosystems™), 300 nM kiekvieno pradmens, 50 nM zondo ir ~ 10 ng bisulfitu konvertuotos DNR. Visi tyrimai buvo atlikti tokiomis sąlygomis: 95 °C 10 min., po to 45–50 ciklų 95 °C temperatūroje 15 s ir 60 °C 1 min., naudojant QuantStudio™ 5 Real-Time PGR sistemą (Applied Biosystems™). Tik tie bandymai, kai kontrolė be DNR matricos (NTC) nedavė amplifikacijos produkto, o dirbtinai metilinta kontrolė (MC) davė teigiamą signalą, buvo laikomi tinkamais. Kiekybinio įvertinimo ciklo (Cq) vertei nustatyti buvo pritaikytas foninio slenksčio algoritmas. Tam tikro geno metilinimo lygis buvo įvertintas remiantis  $\Delta\Delta Cq$  algoritmu ir išreiškiamas procentais nuo MC.<sup>119</sup>

## 5.7. Statistinė analizė ir duomenų apdorojimas

Aprašomoji statistika buvo naudojama apibendrinti pagrindines paciento charakteristikas (amžių, PSA, PSA tankį (PSAD), prostatos tūrį ir mpMRT radinius), skirtumai buvo lyginami naudojant nepriklausomą  $t$  testą, o vertės pateikiamos kaip mediana  $\pm$  standartinis nuokrypis (SD). mpMRT/UG kontroliuojamos biopsijos jautrumas, specifiškumas, neigiama prognostinė vertė (NPV) ir teigiama prognostinė vertė (PPV) diagnozuojant kliniškai reikšmingą PV (ISUP $\geq$ 2), kai PI-RADS balas yra  $\geq$  3, buvo įvertintas atsižvelgiant į PV histologinį variantą.

Genetinės tyrimo dalies statistinė analizė ir duomenų vizualizacija buvo atlikta naudojant MedCalc® v12.7 programinę įrangą (MedCalc Software, Ostenda, Belgija) ir GraphPad Prism v8.0.1 programinę įrangą (GraphPad Software, Inc., La Jolla, JAV). Mann-Whitney U testas buvo naudojamas dviejų grupių nuolatiniais duomenims lyginti. Biomarkerių gebėjimas atskirti grupes buvo įvertintas atliekant (ROC) kreivės analizę ir įvertinus ploto po kreive (AUC) reikšmes. P reikšmė  $< 0,05$  buvo laikoma reikšminga.

## 5.8. Doktoranto ir kitų tyrėjų indėlis

- Doktorantas Augustinas Matulevičius dalyvavo kuruojant visą tyrimo eigą. Buvo atsakingas už pacientų įtraukimą į klinikinę studiją. Doktorantas dalyvavo multidisciplininės gydytojų komandos vedamose susirinkimuose atrenkant pacientus į klinikinę studiją. Surinko visus klinikinius ir patologinius pacientų duomenis. Augustinas Matulevičius analizavo šių tyrimų rezultatus ir siejo juos su klinikiniais ir patologiniais duomenimis. Taip pat doktorantas buvo atsakingas už bendradarbiavimą tarp medicinos genetikų, urologų, radiologų ir patologų bei už tyrimų rezultatų apibendrinimą. Doktorantas buvo pagrindinis autorius, rengiant pirmuosius du mokslinius straipsnius. Taip pat pristatė biomedicininio tyrimo duomenis mokslinėse konferencijose ir vykdė klinikinio tyrimo viešinimo ir sklaidos darbus.
- Med. Dr. Mantas Trakymas buvo pagrindinis intervencinis radiologas, kuris atliko visas pritaikomas MRT/UG kontroliuojamas prostatos biopsijas, prieš tai vertinęs ir paruošęs mpMRT vaizdus pritaikomosios prostatos biopsijos procedūrai atlikti.
- Ieva Naruševičiūtė buvo pagrindinė radiologė, kuri atliko prostatos mpMRT vertinimus bei paruošė mpMRT vaizdus pritaikomosios prostatos biopsijos procedūrai atlikti.

- Med. Dr. Arnas Bakavičius aktyviai dalyvavo konsultuojant ir rengiant pirmąją publikaciją, kurioje atsispindi klinikiniai šio tyrimo rezultatai.
- Pagrindinę molekulinį tyrimų dalį atliko dr. Rasa Sabaliauskaitė bei Kristina Žukauskaitė. Kristina Žukauskaitė taip pat analizavo molekulinis duomenis ir aktyviai dalyvavo rengiant pirmąjį bei antrąjį tyrimo duomenimis paremtą mokslinį straipsnį.
- Aistė Gerulaitytė (NVI, Vilnius) atliko darbus su DNR išskyrimu su qMSP analize.
- Gydytojas Darius Dasevičius išanalizavo tiriamųjų prostatos biopsijos bei radikalią prostatektomijos mėginius.
- Med. Dr. Albert Ulys dalyvavo rengiant klinikinio tyrimo dizainą, bei buvo atsakingas už pacientų įtraukimą į klinikinį tyrimą ir tolimesnį pacientų stebėjimą bei gydymą.
- Prof. Sonata Jarmalaitė buvo doktoranto pagrindinė konsultantė, atsakinga už biomedicininio tyrimo molekulinę dalį, aktyviai prisidėjo prie tyrimo dizaino kūrimo ir koordinavimo. Profesorė aktyviai prisidėjo kuruojant ir rengiant mokslines publikacijas.
- Prof. Feliksas Jankevičius buvo doktorantūros darbo vadovas, atsakingas už šio biomedicininio tyrimo dizainą, ir pagrindinis konsultantas, sprendžiant visus kilusius klinikinius klausimus. Profesorius taip pat vertino parengtas mokslines publikacijas, pateikė svarbių pastabų dėl jų turinio ir pateikimo spaudai.

## 6. REZULTATAI

### 6.1. Pritaikomosios ir sisteminės prostatos biopsijų diagnostinių verčių palyginimas

Iš viso į tyrimą buvo įtraukti 283 pacientai (17 atvejų neįtraukta dėl klinikinių ir anatominių priežasčių, šių atvejų duomenys nerodomi). Tyrimo kohortos klinikinės ir radiologinės charakteristikos pateiktos 4 lentelėje.

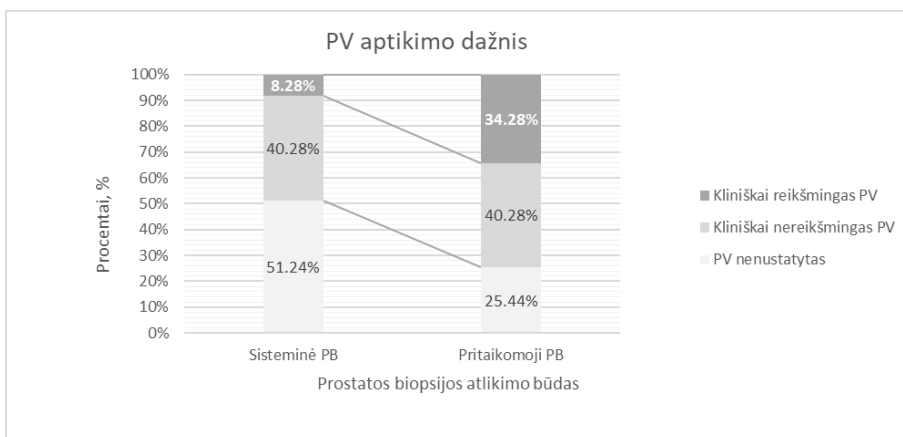
4 lentelė. Tyrimosios grupės klinikinės ir radiologinės charakteristikos. PSA – prostatos specifinis antigenas, mpMRT – multiparametrinis magnetinio rezonanso tomografijos tyrimas, ADC – tariamasis difuzijos koeficientas, ISUP – The International Society of Urological Pathology, GG – prostatos vėžio diferenciacijos laipsnis.

<b>Kintamieji</b>	<b>Pacientai (n=283)</b>	
Amžius, metais	Mean	63.59
	SD	7.41
PSA, ng/mL	Mean	7.67
	SD	5.89
PSA tankis, ng/mL/cc	Mean	0.19
	SD	0.49
Prostatos tūris, mL	Mean	50.84
	SD	23.18
mpMRT židinių skaičius, <i>n</i>	Mean	1.51
	SD	0.65
mpMRT židinio tūris, mL	Mean	1.21
	SD	1.96
mpMRT ADC vitutinė reikšmė $\mu\text{m}^2/\text{s}$	Mean	634.56
	SD	204.85
PI-RADS v2.1 balai, <i>n</i> (%)	3	11 (3.9 %)
	4	190 (67.1 %)
	5	82 (29.0 %)
ISUP reikšmė pagal grupes, <i>n</i> (%)	Ne PV	56 (19.8 %)
	GG1	130 (45.9 %)
	GG2	62 (21.9 %)
	GG3	28 (9.9%)
	GG4	7 (2.5 %)

Bendras PV aptikimo dažnis kohortoje buvo 80,21 % (227/283), o pritaikomoji MRT/UG kontroliuojama biopsija ir adaptuota sisteminė biopsija

(AdSB) PV aptiko 74,56 % (211/283) ir 48,76 % (138/283) PV ( $p < 0,001$ ), atitinkamai.

Kliniškai reikšminga liga nustatyta 34,3% (97/283) pacientų, kuriems buvo atlikta prostatos biopsija. Kliniškai reikšmingos ligos aptikimo dažnis taikant pritaikomąją MRT/UG kontroliuojamą biopsiją buvo 34,28 % (97/283), o tai sudarė 45,97 % (97/211) visų PV diagnozių. Tuo tarpu kliniškai reikšmingos ligos aptikimo dažnis po AdSB buvo žymiai mažesnis (8,48 %; 24/283;  $p < 0,001$ ), o tai sudarė tik– 17,39 %; (24/138) visų PV atvejų, lyginant tik su pritaikomosios biopsijos metodika (17,39 % vs 45,97 %;  $p < 0,001$  13 pav.).

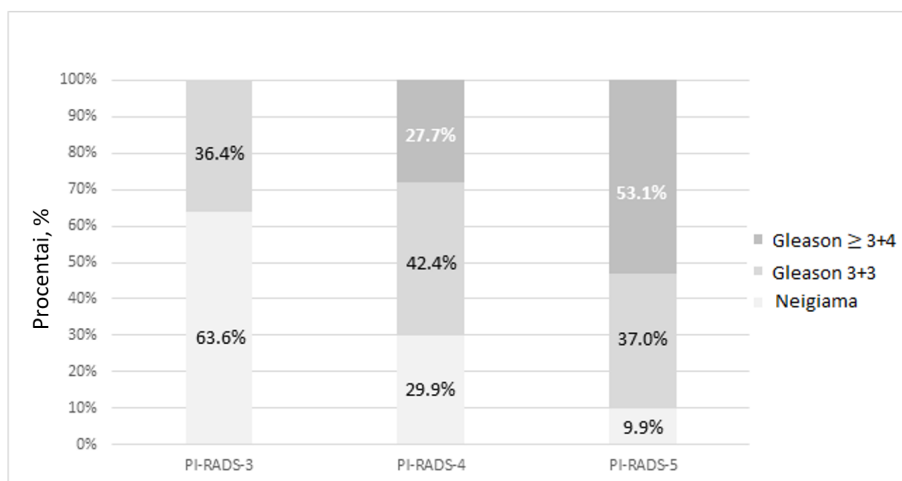


13 pav. Pritaikomosios ir sisteminės prostatos biopsijos diagnostinės vertės palyginimas ( $n=283$ ). PB – prostatos biopsija, PV – prostatos vėžys.

Tarp pacientų, kuriems kliniškai reikšmingas PV buvo nustatytas pritaikomosios prostatos biopsijos metu ( $n=97$ ), AdSB kliniškai reikšmingą PV diagnozę patvirtino tik 24,74 % ( $n=24$ ) pacientų.

Pacientams, kuriems pritaikomosios biopsijos būdu nebuvo nustatyta kliniškai reikšmingo prostatos vėžio, AdSB taip pat nenustatė kliniškai reikšmingo vėžio. Be to, AdSB nustatė 16 papildomų kliniškai nereikšmingo prostatos vėžio atvejų pacientams, kuriems nebuvo vėžio požymių, atlikus pritaikomąją prostatos biopsiją.

Remiantis PI-RADS v2.1 sistema, kliniškai reikšmingos ligos aptikimo dažnis po pritaikomosios prostatos biopsijos priklausė nuo PI-RADS grupės ir buvo vyraujantis tarp PI-RADS 5 atvejų (PI-RADS 3 vs PI-RADS 4 vs PI-RADS 5, kai  $p < 0,001$ ; 14 pav.).



14 pav. PI-RADS v2.1 kategorijos ir histologijos atitikimas po pritaikomosios prostatos biopsijos. Pastaba – statistiškai reikšmingas ryšys tarp kliniškai reikšmingų pažeidimų dalies (*Gleason 3 + 4* arba didesnis) kiekvienai PI-RADS v2.1 kategorijai ( $p < 0,001$ ,  $n = 283$ ).

Tuo tarpu AdSB rezultatai neparodė jokių sąsajų su mpMRT PI-RADS balais (PI-RADS-3 0,00% vs PI-RADS-4 7,92% vs PI-RADS-5 11,00%,  $p = 0,415$ ). ISUP GG balas taip pat buvo didesnis PI-RADS 5 grupėje, palyginti su PI-RADS 4 ir PIRADS 3 grupėmis, kurių rezultatai pateikti 5 lentelėje.

5 lentelė. Skirtingi prostatos vėžio laipsnio grupių aptikimo rodikliai pagal PI-RADS v2.1 balus.

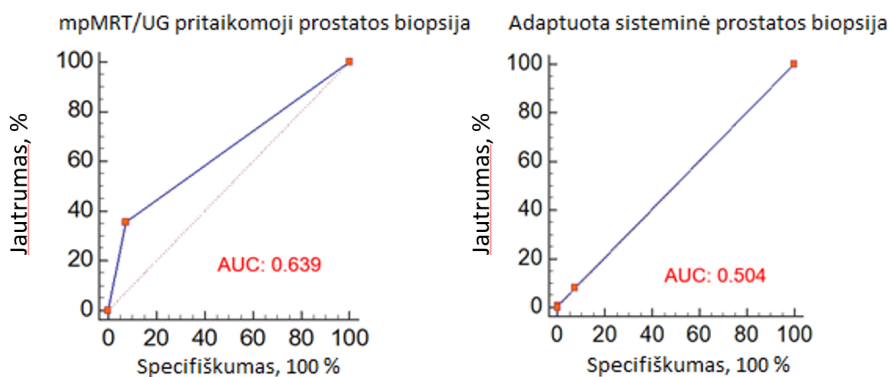
	Skirtingos PIRADS v2.1 vertės							
	PI-RADS-3		PI-RADS-4		PI-RADS-5		Viso, n=283	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Ne PV</b>	7	63.63	57	30.00	8	9.76	72	25.44
<b>GG1</b>	4	36.37	80	42.10	30	36.59	114	40.28
<b>GG2</b>	0	0.0	35	18.42	27	32.92	62	21.90
<b>GG3</b>	0	0.0	16	8.42	12	14.63	28	9.89
<b>GG4</b>	0	0.0	2	1.05	5	6.10	7	2.47
<b>Viso</b>	11	100	190	100	82	100	283	100

$p < 0.001$

**PI-RADS v2.1 - magnetinio rezonanso vaizdų ir pokyčių interpretavimo sistema versija 2.1 ne PV – audinys be prostatos vėžio ląstelių. GG – prostatos vėžio laipsnio grupė.**

Naudojant radiologinio įverčio PI-RADS v2.1 balą 4 ir 5 kaip teigiamą testo rezultatą, siekiant aptikti ISUP  $\geq 2$  prostatos adenokarcinomą, MRT/UG kontroliuojamos pritaikomosios biopsijos jautrumas ir specifiškumas pasiekė 35,56 % ir 92,31 % su Youdeno pasirinkta ribine verte. PI-RADS v2.1  $\geq 4$  (plotas po kreive (AUC) = 0,639 (95 % pasikliautinis intervalas (PI): (0,6–0,7)). MRT/UG pritaikomosios biopsijos NPV buvo 7,02 % (95 % PI: 3,792–11,677), o TPV buvo 98,88 % (95 % PI: 94,22–99,96,  $p=0,0007$ ).

AdSB biopsijos jautrumas ir specifiškumas buvo atitinkamai 8,52 % ir 92,31 %, o Youdeno pasirinkta ribinė vertė PI-RADS v2.1  $\geq 4$  (AUC = 0,504; 95 % PI: (0,6–0,7)). Metodo NPV buvo 5,04 % (95 % PI: 2,717–8,459), o TPV buvo 95,47 % (95 % PI: 78,33–99,85;  $p=0,91$ ); 15 pav.



15 pav. Pritaikomosios ir sisteminės biopsijos jautrumas ir specifiškumas diagnozuojant ISUP  $\geq 2$  prostatos vėžį taikant mpMRT/UG pritaikomą prostatos biopsiją ir atliekant sisteminę prostatos biopsiją. AUC – plotas po kreive.

## 6.2. Klinikiniai ir radiologiniai duomenimis

Statistinė analizė atskleidė, kad pacientai, turintys kliniškai reikšmingą PV, buvo vyresni (65,08 (SD=7,24) vs 62,82 (SD=7,4) metų,  $p=0,007$ ) ir turėjo reikšmingai mažesnį prostatos tūrį (44,25 ml (SD=17,83) vs 54,27 (SD=24,89),  $p<0,001$ ), palyginti su kliniškai nereikšmingos ligos atvejais. PSAD reikšmė ir židinio dydis reikšmingo skirtumo tarp pritaikomosios ir sisteminės biopsijos grupių nenustatyta (visos  $p>0,05$ ).

Dauguma kliniškai reikšmingos ligos atvejų 54,64 % (53/97) nustatyta tiriant pirmąjį biopstatą, o antrajame ir trečiajame tirtuose mėginiuose buvo aptikta dar 16,49 % (16/97) ir 28,87 % (28/97) PV atvejų, atitinkamai. 78,95

% pacientų, kuriems buvo paimti papildomi biopstatai, radiologinio vaizdo dominančios sritys (ROI) buvo didesnės nei 0,5 cm<sup>3</sup> arba 8 mm skersmens. Pagal mpMRT, dažniausiai ROI buvo periferinėje prostatos zonoje (66,10%), po to sekė pereinamoji zona (27,51%) ir fibromuskulinė stroma (6,39%). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp kliniškai reikšmingų ir nereikšmingų PV aptikimo rodiklių pritaikomoje ir AdSB, atsižvelgiant į pažeidimo vietą mpMRT, nenustatyta.

### 6.3. Epigenetinio lauko efekto nustatymas aplink vėžio židinį.

Mūsų tyrimo tikslas buvo molekuliniais metodais patvirtinti MRT/UG kontroliuojamos pritaikomosios biopsijos iš židinio tikslumą nustatant kliniškai reikšmingą PV. Dėl to epigenetiniai pakitimai buvo vertinami mpMRT identifikuotame naviko židinyje, bei 10 mm ir 20 mm nuo jo. Siekiant įvertinti kancerizacijos lauko mastą, 44 tiriamųjų pacientų DNR metilimo lygis *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC* genuose buvo ištirtas biopsijos mėginiuose paimtuose iš PV židinio (n = 83), perifokalinio audinio (n = 80) ir kontrolinio nevėžinio audinio (n = 39). Visiems šiame tyrime dalyvavusiems pacientams buvo atlikta pritaikomoji MRT/UG kontroliuojama prostatos biopsija.

Tuo tikslu atliekant pritaikomą transperinę prostatos biopsiją, papildomai buvo paimti du biopstatai, nutolę 10 mm ir 20 mm nuo navikinio židinio stebimo mpMRT krašto. Į šio tyrimo dalį įtraukti 44 pacientai, kuriems po patvirtinto kliniškai reikšmingo PV buvo taikytas radikalus operacinis gydymas – radikali prostatektomija, 6 lentelė.

6 lentelė. Radikalios prostatektomijos kohortos klinikinės ir radiologinės charakteristikos.

<b>Kintamieji</b>	<b>Patientai (n = 44)</b>	
<b>Amžius, metais</b>	Vidurkis	62.92
	SD	7.29
<b>PSA, ng/mL</b>	Vidurkis	8.24
	SD	6.68
<b>PSA tankis, ng/mL/cc</b>	Vidurkis	0.19
	SD	0.18
<b>Prostatos tūris, mL</b>	Vidurkis	46.64
	SD	20.71
<b>mpMRT židinių skaičius, n</b>	Vidurkis	1.54
	SD	0.66



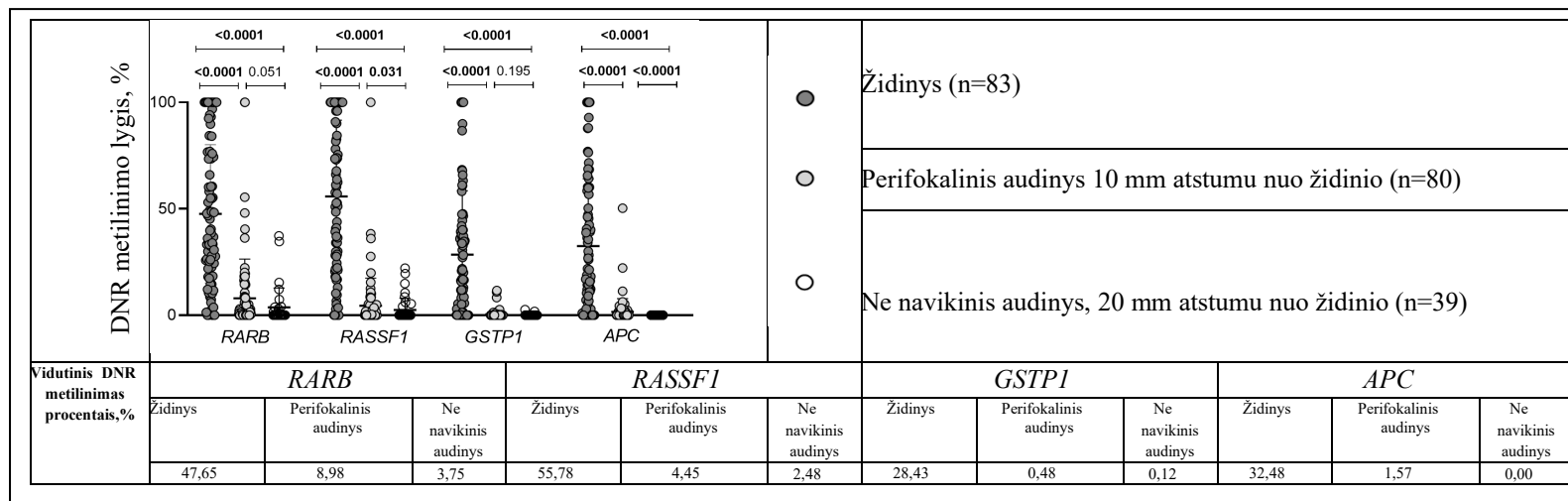
Kintamieji	Patientai (n = 44)	
Židinių skaičius po RP galutiniame patologiame atsakyme, n	Vidurkis	2.72
	SD	1.82
mpMRT židinių dydis, mL	Vidurkis	1.37
	SD	1.69
mpMRT ADC vidutinė vertė $\mu\text{m}^2/\text{s}$	Vidurkis	543.70
	SD	250.64
PI-RADS V2.1 balai, n (%)	4	25 (56.82%)
	5	19 (43.18%)
ISUP grupė, n (%)	GG1	15 (34.1%)
	GG2	19 (43.2%)
	GG3	9 (20.5%)
	GG4	1 (2.3%)

PSA – prostatos specifinis antigenas, mpMRT – multiparametrinė magnetinio rezonanso tomografija, RP – radikali prostatektomija, ADC – tariamasis difuzijos koeficientas, ISUP – The International Society of Urological Pathology, GG – prostatos vėžio laipsnio grupė.

Siekiant įvertinti biožymenų diagnostinę vertę, keturių genų *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC* promotoriaus srities DNR metilinimas buvo kiekybiškai ištirtas formalinu fiksuotuose parafine impregnuotuose prostatos audinių blokuose. Prostatos biopsijos buvo atliktos pacientams, kuriems, reminatis prostatos mpMRT tyrimo išvadomis įtartas kliniškai reikšmingas prostatos vėžys.

Analizė parodė, kad visų keturių genų reguliacinių sričių DNR metilinimas buvo žymiai intensyvesnis naviko židiniuose, palyginti su nutolusios zonos mėginiais. Kiekybinė analizė atskleidė, kad visų tirtų genų DNR metilinimo lygis pagrindiniame navikiniame židinyje buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginti su perifokaliniiais mėginiais, esančiais 10 mm atstumu nuo navikinio pažeidimo ( $p < 0,0001$ ; 13 pav.).

Be to, nevėžiniai audiniai, paimti 20 mm atstumu nuo mpMRT matomo pažeidimo, parodė dar mažesnę DNR metilinimo lygį, palyginti su perifokaliniiais mėginiais arba mėginiais iš židinio ( $p < 0,0001$ ; 16 pav.).



16 paveikslėlis. Kancerizacijos lauko epigenetinio profilio palyginimas su naviko židiniu. Genų *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC* promotorių DNR metilimo intensyvumas FFPE prostatos audinių mėginiuose pagal jų histologiją. Linijos rodo medianą su 95 % pasikliautiniais intervalais. Lentelėje parodytas vidutinis DNR metilimo lygis navikiniuose, 10 mm atstumu nuo jų perifokaliniuose audinių mėginiuose ir ne vėžinių audinių mėginiuose, 20 mm atstumu nuo navikinio pažeidimo

Vidutiniškai *RARB* metilinimo lygis židinyje buvo 6 kartus didesnis, palyginti su perifokaliniu audiniu, ir 13 kartų didesnis nei nevėžinio audinio. Vidutinis *RASSF1* metilinimo lygis židinyje buvo 13 kartų didesnis, palyginti su perifokaliniu audiniu, ir 23 kartus didesnis nei nevėžiniame audinyje. Vidutinis *GSTP1* ir *APC* metilinimo lygis židinyje palyginti su perifokaliniu audiniu, buvo atitinkamai 60 ir 21 kartą didesnis. Vidutinis *GSTP1* metilinimo lygis buvo 234 kartus didesnis nei nevėžiniame audinyje, o *APC* metilinimas nevėžiniame audinyje apskritai nebuvo aptiktas. Tai rodo MRT / UG vaizdu kontroliuojamos prostatos biopsijos tikslumą nustatant židinius pažeidimus ir fokalinės PV terapijos saugumą, atsižvelgiant į PV ląstelių plitimą už mpMRT stebimo židinio.

Siekiant gauti daugiau įžvalgų apie epigenetinių pokyčių plitimą prostatos audinyje, buvo atlikta detali analizė, kuri leido mums nustatyti kiekvieno mėginio DNR metilinimo lygį (17 pav.). Kai kuriais atvejais (B20-19937, B20-26292, B20-33989, B20-5479, B20-36740, B20-33707, B20-20740) perifokaliniuose ir net nevėžiuose mėginiuose buvo pastebėta gana didelis DNR metilinimo lygis, pavyzdžiai (B20-33707, B21-3263, B20-20740). Daugeliu atvejų, kai į analizę buvo įtraukti du mėginiai iš židinio (n = 34), epigenetinių pakitimų mastas buvo gana vienodas, tačiau kai kuriais atvejais (B20-20740; B20-33707; B20-36740; B20-2088; B20-33989, B20-7272) buvo pastebėtas tam tikras nesutapimas.



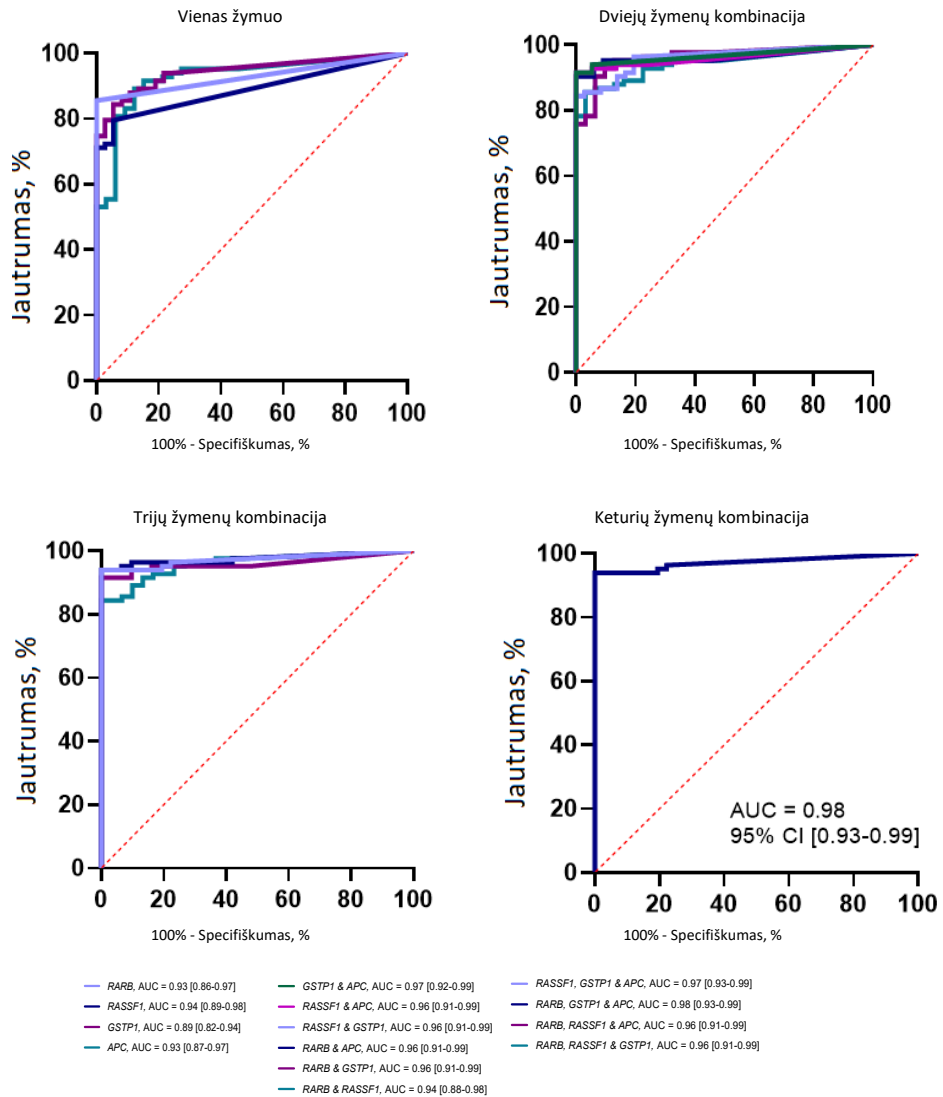
17 paveikslėlis. Molekulinių žymenų analizė, išskirianti prostatos vėžio židinio pažeidimus (IL), perifokalinių audinių mėginius (PerIF) ir nevėžinį prostatos audinį. Tai rodo vidutinį kiekvieno mėginio geno DNR metilinimo lygį.

Neatitinkančius atvejus papildomai tikrino patologas ir radiologas. B20-20740 ir B20-2088 atvejai parodė aukštą *RARB*, *GSTP1*, *APC* ir *RASSF1* DNR metilinimo lygį perifokaliniuose mėginiuose (2 papildoma medžiaga). Sulyginus radiologinę ir histologinę medžiagas pasirodo, kad atstumas nuo židinio buvo neišlaikytas ir tikrasis atstumas buvo atitinkamai 6 mm ir 5 mm, o ne 10 mm. B20-33707 atvejis taip pat parodė aukštus *RARB*, *GSTP1*, *APC* ir *RASSF1* DNR metilinimo lygius perifokaliniuose mėginiuose ir remiantis patologo nuomone, šiame mėginyje buvo keletas GG1 prostatos adenokarcinomos ląstelių, kurios galėjo turėti įtakos epigenetiniams radiniams. Kaip mūsų tyrimas rodo, šis kancerizacijos lauke esantis vėžys yra nematomas mpMRT vaizduose, tačiau aptinkamas atliekant genetinius tyrimus. Remiantis galutiniu patologijos protokolus po RP šiuo atveju pacientui nustatyta (*Gleason* 3+4(5%)=7, 2 laipsnio grupė) acininė prostatos

adenokarcinoma, pT3a (papildomas prostatos išplitimas 6 mm ilgio dešinėje), dėl to aukštas metilinimo lygis galėjo būti susijęs su dideliu lokaliai išplitusios ligos kiekiu. Panaši situacija buvo ir B20-33989 atveju. B20-36740 atvejis taip pat parodė aukštus *RARB*, *GSTPI*, *APC* ir *RASSF1* DNR metilinimo lygius perifokaliniuose mėginiuose, galimai dėl to, kad šis mėginys turėjo aukšto laipsnio prostatos intraepitelinės neoplazijos diagnozę pagal histologijos protokolą, o atstumas nuo navikinio pažeidimo buvo 6 mm. Įdomu tai, kad B20-7272 atvejis turėjo žemą metilinimo lygį visuose tirtuose genuose, išskyrus *GSTPI*, nors tirtas FFPE biopatas buvo (*Gleason* 3+3=6 / 1 laipsnio grupė) acininė prostatos adenokarcinoma, sudaranti 30% (4,0 mm).

Po šio papildomo įvertinimo darome išvadą, kad kuo mažesnis atstumas nuo židinio, tuo didesnis pasirinktų genų hipermetilinimo intensyvumas histologiškai normaliame prostatos audinyje. Tai reiškia, kad hipermetilinimas yra proporcingas atstumui nuo židinio, kuris taip pat stebimas kontroliniuose mėginiuose. Be to, didelis metilinimo lygis gali būti susijęs su didesniu lokaliai pažengusios ligos kiekiu arba GG1 PV buvimu, kuris išlieka nematomas mpMRI vaizduose.

Tinkamiausių žymenų parinkimui molekulinei PV diagnostikai ir kancerizacijos lauko dydžio įvertinimui atlikta ROC kreivės analizė. Palyginus mėginių paimtų iš židinio pažeidimą su nevėžiniais audiniais, didžiausias jautrumas ir specifiškumas buvo pasiektas analizuojant *RARB*, *GSTPI* ir *APC* genų hipermetilimą (AUC = 0,98;  $p < 0,0001$ ) ir *RARB*, *RASSF1*, *GSTPI* ir *APC* genų hipermetilimą (AUC = 0,98;  $p < 0,0001$ ) biožymenų derinių (18 pav., 7 lentelė). Vertinant kiekvieno iš tirtų genų diagnostinį potencialą, didžiausiu jautrumu ir specifiškumu pasižymėjo *RASSF1* genas (AUC = 0,94;  $p < 0,0001$ ).

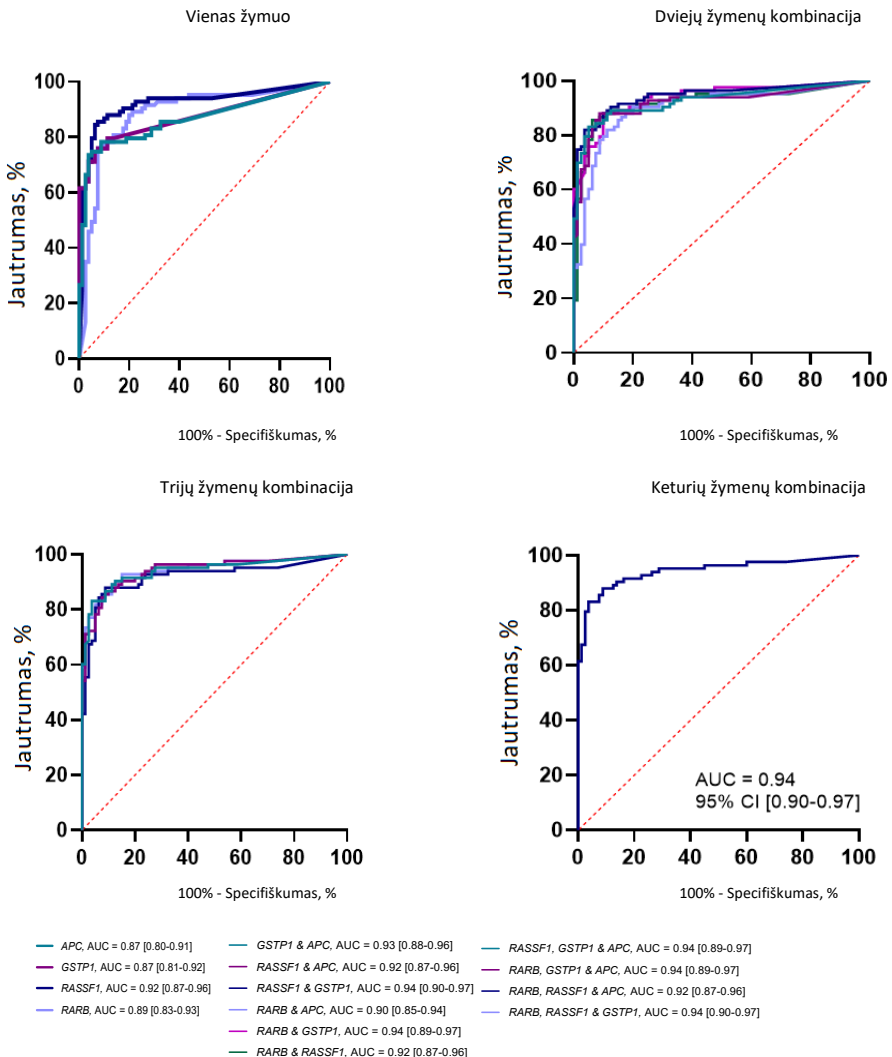


18 pav. Pavienių žymenų bei žymenų derinių ROC kreivių analizė, išskiriant PV židinio ir nevėžinių audinių mėginius. 95 % pasikliautinis intervalas nurodytas skliausteliuose, AUC – plotas po kreive

7 lentelė. Pavienių žymenų ir žymenų derinių ROC kreivių analizė, siekiant atskirti PV židinio pažeidimus ir sveikų audinių mėginius. AUC – plotas po kreive, PI – pasikliautinis intervalas, ACV – susijusi kriterijaus vertė, PPV – teigiama predikcinė vertė, NPV – neigiama predikcinė vertė

Žymuo	AUC	95% CI	p-vertė	Specifiškumas, %	Jautrumas, %	Youden indeksas J	ACV	TPV, %	NPV, %
<b>Vienas žymuo</b>									
<i>RARB</i>	0.93	0.86-0.97	<0.0001	87.88	89.16	0.77	>7.40	93.9	79.23
<i>RASSF1</i>	0.94	0.89-0.98	<0.0001	94.59	84.34	0.79	>14.90	97.1	73.98
<i>GSTPI</i>	0.89	0.82-0.94	<0.0001	94.59	79.52	0.74	>0	96.9	68.49
<i>APC</i>	0.93	0.87-0.97	<0.0001	100	85.54	0.86	>0	100	76.50
<b>Dviejų žymenų derinys</b>									
<i>RARB &amp; RASSF1</i>	0.94	0.88-0.98	<0.0001	96.77	85.54	0.82	>0.76	98.3	75.90
<i>RARB &amp; GSTPI</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	93.55	90.36	0.84	>0.48	96.8	82.04
<i>RARB &amp; APC</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	90.36	0.90	>0.75	100	83.00
<i>RASSF1 &amp; GSTPI</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	84.34	0.84	>0.72	100	75.03
<i>RASSF1 &amp; APC</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	91.57	0.92	>0.53	91.6	84.81
<i>GSTPI &amp; APC</i>	0.97	0.92-0.99	<0.0001	100	91.57	0.92	>0.23	91.6	84.81
<b>Trijų žymenų derinys</b>									
<i>RARB, RASSF1 &amp; GSTPI</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	84.34	0.84	>0.83	100	75.03
<i>RARB, RASSF1 &amp; APC</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	91.57	0.92	>0.55	100	84.81
<i>RARB, GSTPI &amp; APC</i>	0.98	0.93-0.99	<0.0001	100	93.98	0.94	>0.60	100	88.66
<i>RASSF1, GSTPI &amp; APC</i>	0.97	0.93-0.99	<0.0001	100	93.98	0.94	>0.31	100	88.66
<b>Keturių žymenų derinys</b>									
<i>RARB, RASSF1, GSTPI &amp; APC</i>	0.98	0.93-0.99	<0.0001	100	93.98	0.94	>0.46	100	88.66

Analogiškai, kai PV židinio pažeidimai buvo lyginami su perifokalniais audiniais, *RARB* ir *GSTP1* bei *RASSF1* ir *GSTP1* (abiejų AUC = 0,94;  $p < 0,0001$ ) deriniai turėjo didžiausią plotą po kreive (19 pav., 8 lentelė). Toks pats AUC (AUC = 0,94;  $p < 0,0001$ ) buvo pasiektas naudojant tris (*RARB*, *RASSF1* ir *GSTP1*; *RARB*, *GSTP1* ir *APC*; *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC*) arba visus keturis biologinius žymenis. Kaip ir anksčiau, genas *RASSF1* turėjo didžiausią jautrumą ir specifiškumą (AUC = 0,92;  $p < 0,0001$ ), kaip savarankiškas PV žymuo.



19 pav. Pavienių žymenų ir žymenų derinių ROC kreivių analizė, išskiriant PV židinio ir perifokalinių audinių mėginius. 95 % pasikliautinis intervalas nurodytas skliausteliuose, AUC – plotas po kreive

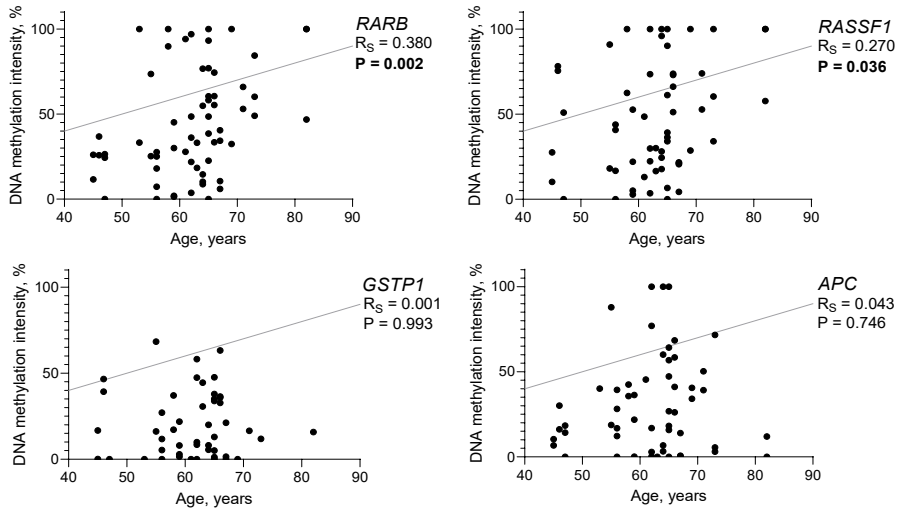


8 lentelė. Pavienių žymenų ir žymenų derinių ROC kreivių analizė, skiriant PV židinio pažeidimus ir perifokaliųjų audinių mėginius. AUC – plotas po kreive, PI – pasikliautinis intervalas, ACV – susijusi kriterijaus vertė, PPV – teigiama predikcinė vertė, NPV – neigiama nuspėjama vertė.

Žymuo	AUC	95% CI	p-value	Specifiškumas, %	Jautrumas, %	Youden indeksas J	ACV	TPV, %	NPV, %
<b>Vienas žymuo</b>									
<i>RARB</i>	0.89	0.83-0.93	<0.0001	92.50	75.90	0.68	>22.26	91.33	78.67
<i>RASSF1</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	93.75	84.34	0.78	>15.44	93.35	85.19
<i>GSTP1</i>	0.87	0.81-0.92	<0.0001	93.75	74.70	0.68	>1.32	92.56	78.07
<i>APC</i>	0.87	0.80-0.91	<0.0001	96.25	73.49	0.70	>6.28	95.33	77.72
<b>Dviejų žymenų derinys</b>									
<i>RARB &amp; RASSF1</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	93.75	85.54	0.79	>0.41	93.44	86.17
<i>RARB &amp; GSTP1</i>	0.94	0.89-0.97	<0.0001	90.00	87.95	0.78	>0.27	90.16	87.77
<i>RARB &amp; APC</i>	0.90	0.85-0.94	<0.0001	88.75	81.93	0.71	>0.37	88.34	82.51
<i>RASSF1 &amp; GSTP1</i>	0.94	0.90-0.97	<0.0001	96.25	81.93	0.78	>0.56	95.79	83.65
<i>RASSF1 &amp; APC</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	91.25	87.95	0.79	>0.31	91.28	87.92
<i>GSTP1 &amp; APC</i>	0.93	0.88-0.96	<0.0001	95.00	83.13	0.78	>0.40	94.54	84.40
<b>Trijų žymenų derinys</b>									
<i>RARB, RASSF1 &amp; GSTP1</i>	0.94	0.90-0.97	<0.0001	92.50	85.54	0.78	>0.35	92.23	86.00
<i>RARB, RASSF1 &amp; APC</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	91.25	87.95	0.79	>0.31	91.28	87.92
<i>RARB, GSTP1 &amp; APC</i>	0.94	0.89-0.97	<0.0001	92.50	84.34	0.77	>0.41	92.13	85.02
<i>RASSF1, GSTP1 &amp; APC</i>	0.94	0.89-0.97	<0.0001	96.25	83.13	0.79	>0.47	95.85	84.57
<b>Keturių žymenų derinys</b>									
<i>RARB, RASSF1, GSTP1 &amp; APC</i>	0.94	0.90-0.97	<0.0001	96.25	83.13	0.79	>0.56	95.85	84.57

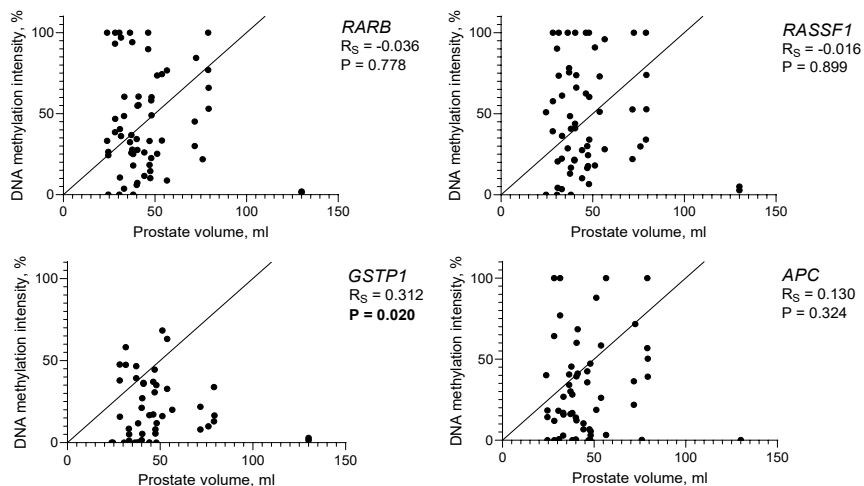
#### 6.4. Naviko židinio DNR metilinimo koreliacijos su klinikiniais duomenimis.

Spearmano koreliacinė analizė atskleidė statistiškai reikšmingą silpną teigiamą koreliaciją tarp *RARB* ( $r_S = 0,380$ ,  $P = 0,002$ ) ir *RASSF1* ( $r_S = 0,270$ ,  $P = 0,036$ ) reguliacinių sričių DNR metilinimo intensyvumo ir vyresnio pacientų amžiaus (20 pav.).



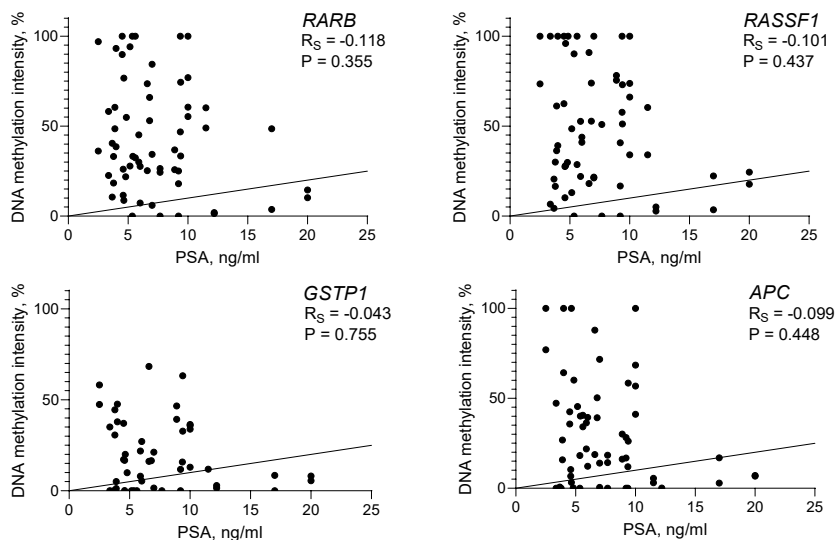
20 pav. DNR metilinimo priklausomybė nuo paciento amžiaus analizė.  $R_S$  – Spearmano koreliacijos koeficientas

Analizė taip pat nustatė statistiškai reikšmingą silpną teigiamą koreliaciją tarp *GSTP1* DNR metilinimo ( $R_S = 0,312$ ,  $P = 0,020$ ) ir didesnio prostatos tūrio (21 pav.).

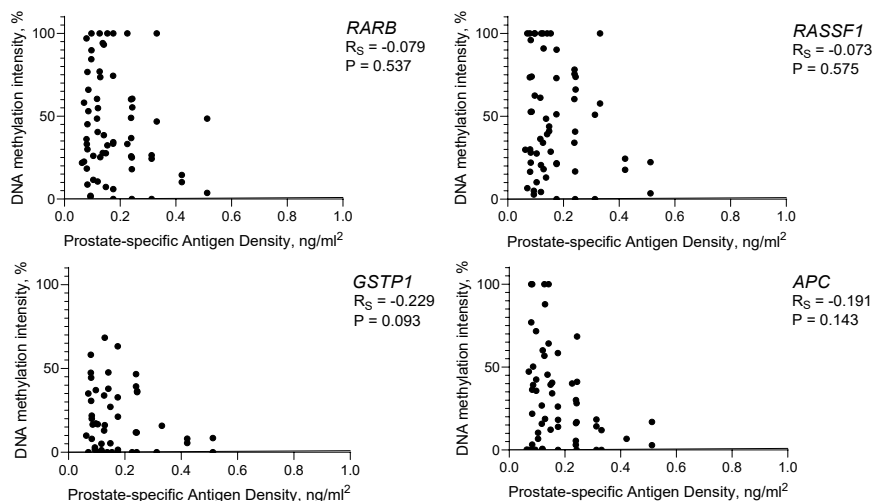


21 pav. DNR metilinimo priklausomybė nuo prostatos tūrio analizė.  $r_S$  – Spearmano koreliacijos koeficientas.

Koreliacinė analizė neatskleidė reikšmingų koreliacijų tarp DNR metilinimo žymenų ir PSA bei PSAD – pagrindinių prostatos vėžio diagnostikos rodiklių (visi  $P > 0,050$ , 22 ir 23 pav.). Taigi, visų keturių genų DNR metilinimas nepriklauso nuo PSA koncentracijos kraujyje. Tai leidžia labiau padidinti diagnostinį PSA potencialą, derinant su epigenetiniai žymenimis, nei taikant išvestinius su PSA siejamus žymenis.



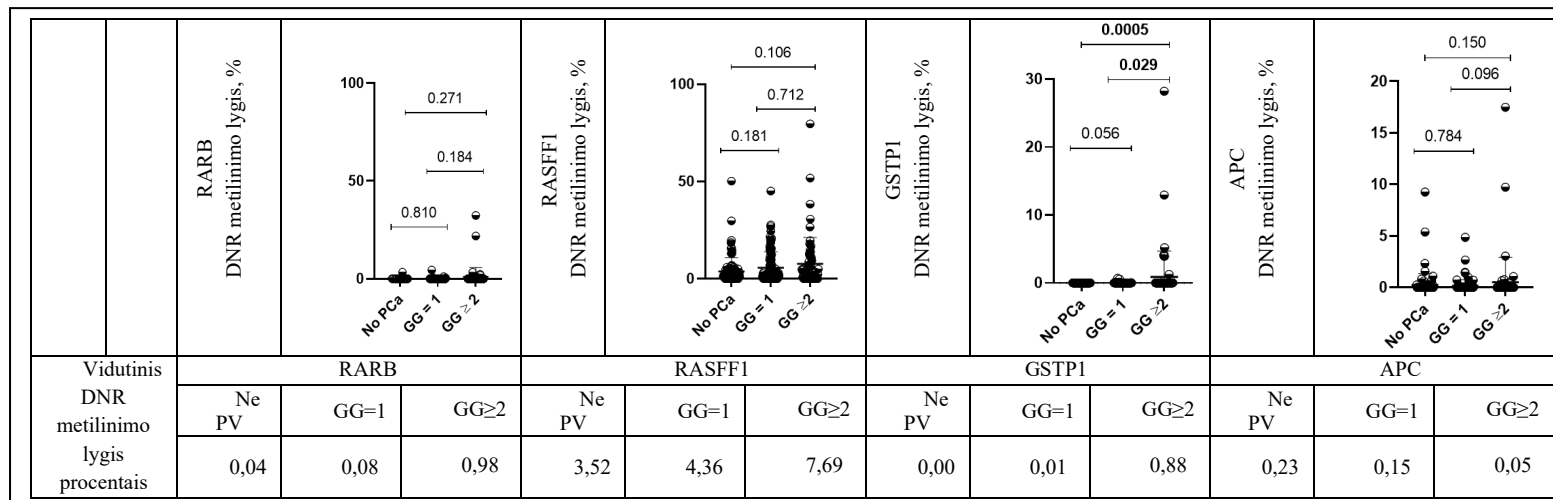
22 pav. DNR metilinimo priklausomybės nuo PSA koncentracijos analizė.  $r_S$  – Spearmano koreliacijos koeficientas



23 pav. DNR metilinimo priklausomybės nuo prostatos specifinio antigeno tankio analizė.  $r_S$  – Spearmano koreliacijos koeficientas.

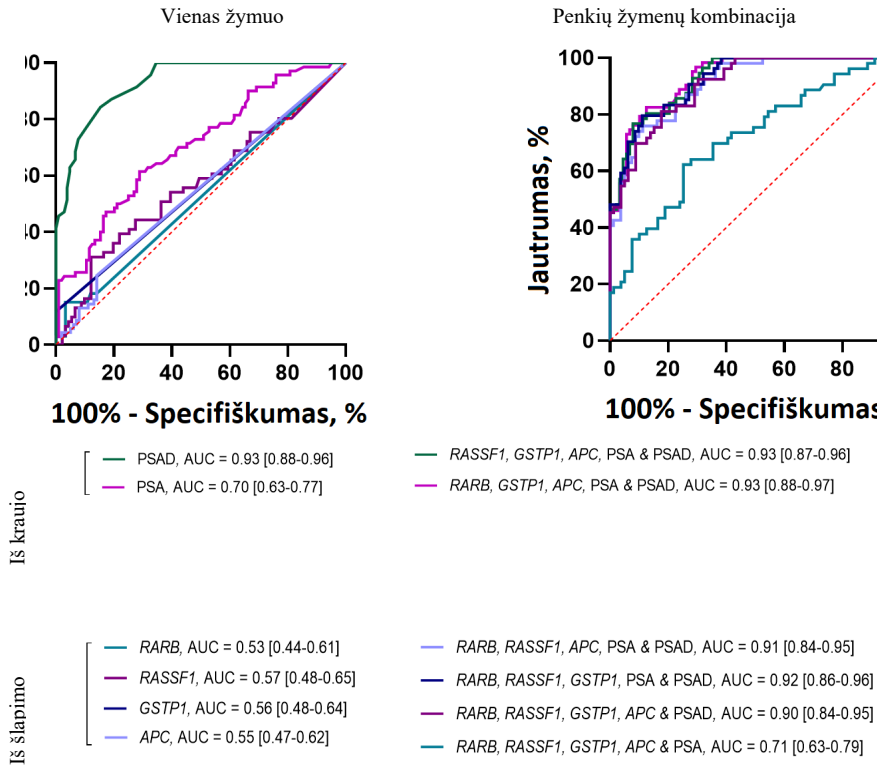
### 6.5. Epigenetiniai žymenys šlapimo nuosėdose

Siekiant įvertinti pasirinktų žymenų tinkamumą neinvaziniam kliniškai reikšmino PV aptikimui *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC* genų metilinimo analizė buvo atlikta qMSP metodu PV sergančių pacientų šlapimo mėginiuose. Pacientai, pagal prostatos biopsijos gautus rezultatus buvo suskirti į šias grupes: kliniškai reikšmingas PV ( $n = 71$ ), kliniškai nereikšmingas PV ( $n = 97$ ), ir pacientai be PV ( $n = 104$ ). Visiems šiems pacientams buvo surinkti šlapimo mėginiai genetinei analizei. Į šį palyginimą buvo įtraukti visi atvejai iš MRT/UG kontroliuojamos pritaikomosios biopsijos kohortos ir palyginti su kontroline grupe, kuriems PV nebuvo aptiktas. Iš keturių analizėje įtrauktų genų tik *GSTP1* promotoriaus metilinimo lygis sugebėjo atskirti PV atvejus nuo kontrolinių pacientų ( $p = 0,0005$ ) ir net kliniškai reikšmingo PV atvejus nuo kliniškai nereikšmingų atvejų ( $p = 0,029$ , 24 pav.).



24 pav. *RARB*, *RASFF1*, *GSTP1* ir *APC* genų DNR metilinimo lygis šlapimo nuosėdose. GG – laipsnio grupė, PV – prostatos vėžys. GG<sub>≥2</sub> – kliniškai reikšmingas PV. Linijos rodo medianą su 95 % pasikliautiniu intervalu.

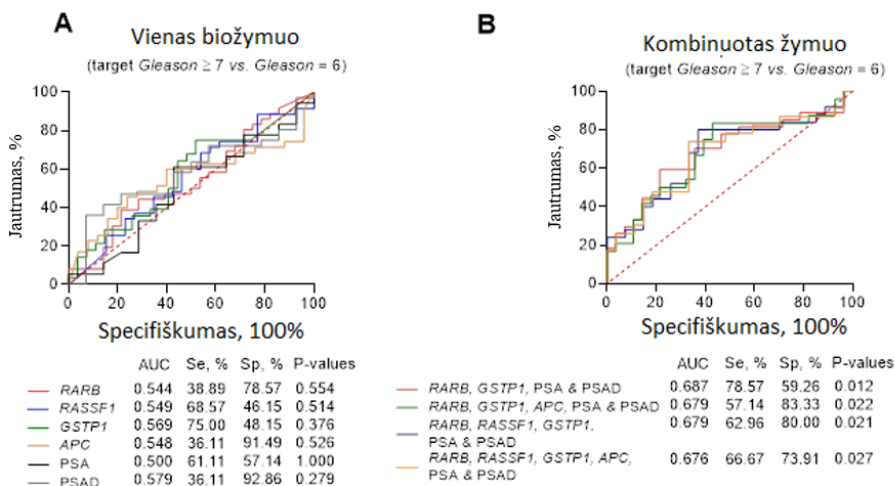
Neląstelinės DNR metilinimo lygis šlapime buvo akivaizdžiai mažesnis nei audinių mėginiuose. Tačiau, nepaisant žemo DNR metilinimo lygio šlapime, visi tirti žymenys rodė tą pačią tendenciją – mažiausias DNR metilinimo lygis buvo nustatytas kontrolinėje grupėje, o didžiausias – kliniškai reikšmingo PV grupėje ( $GG \geq 2$ ). Potencialių šlapimo žymenų charakteristikų analizė parodė, kad visų keturių žymenų derinys su prostatos specifiniu antigenu (PSA) kraujyje arba PSA tankiu (PSAD) padidina jautrumą ir specifiškumą atskiriant kliniškai reikšmingą PV nuo kontrolinės (nevėžinės) grupės (25 pav.). Keturių biologinių žymenų testo derinys su PSAD leido identifikuoti kliniškai reikšmingą PV su  $\geq 90\%$  jautrumu ir specifiškumu, o tai rodo didelį potencialą naudoti šias neinvazines priemones stebint atvejus po židinės prostatos terapijos.



25 pav. Pavienių žymenų ir penkių žymenų derinių ROC kreivių analizė, atskiriant kontrolinę grupę ir kliniškai reikšmingą prostatos vėžį. 95 % pasikliautinis intervalas nurodytas skliausteliuose, AUC – plotas po kreive

## 6.6. Kliniškai reikšmingo prostatos vėžio žymenys iš šlapimo nuosėdų

Kliniškai reikšmingu PV laikyti atvejai, kurių *Gleason* balas histopatologinėje analizėje buvo  $\geq 7$  ( $GG \geq 2$ ). Šios analizė metu pacientai buvo suskirstyti į dvi grupes pagal *Gleason* balą: *Gleason*  $\geq 7$  vs. *Gleason* = 6 ir atlikta (ROC) analizė (26 pav.). Kancerizacijos lauko mėginiai nebuvo įtraukti į šią analizę. Į kliniškai reikšmingo PV biožymenų paletę buvo įtraukti visi epigenetiniai šlapimo nuosėdose išskirti žymenys, diagnostinis PSA įvertis ir PSA tankis (PSAD).



26 pav. ROC kreivės analizė atskiriems biožymenims ir dviejų-šešių biožymenų deriniui, skiriant pagal *Gleason* balą. AUC – plotas po kreive; Se – jautrumas; Sp – specifiškumas; PSA – Prostatos specifinis antigenas; PSAD – prostatos specifinio antigeno tankis.

Vertinant kiekvieno tirta žymens diagnostinį potencialą atskirai, PSAD pasižymėjo didžiausio jautrumo ir specifiškumo vertėmis diagnozuojant kliniškai reikšmingą PV (AUC = 0,579;  $p=0,279$ ). Atlikta visų galimų potencialių žymenų derinių analizė (9 lentelė) ir nustatyta, kad dviejų DNR metilimo žymenų ir dviejų klinikinių parametrų (*RARB*, *GSTP1*, PSA ir PSAD) panelė pasižymėjo geriausiu diagnostiniu potencialu, kuris siekė 78,57 proc. jautrumo ir 59,26 % specifiškumo ( $p=0,012$ ).

9 lentelė. Pavienių ir žymenų derinio ROC kreivės analizė atskiriant kliniškai reikšmingą ir nereikšmingą prostatos vėžį pagal *Gleason* balą.

No.	Biomarker	AUC	P-value	Specificity, %	Sensitivity, %	Youden index J	Associated criterion value
<b>Single biomarker</b>							
1	<i>RARB</i>	0.544	0.554	78.57	38.89	0.2	≤25.25
2	<i>RASSF1</i>	0.549	0.514	46.15	68.57	0.1	>28.61
3	<i>GSTP1</i>	0.569	0.376	48.15	75.00	0.2	>5.09
4	<i>APC</i>	0.548	0.526	76.00	45.71	0.2	≤12.26
5	PSA	0.5	1.000	57.14	61.11	0.2	>5.9
6	PSAD	0.579	0.279	92.86	36.11	0.3	>0.24
<b>Panel of two biomarkers</b>							
7	<i>RARB &amp; RASSF1</i>	0.623	0.099	76.92	45.71	0.2	>0.60
8	<i>RARB &amp; GSTP1</i>	0.642	0.063	48.15	85.71	0.3	>0.45
9	<i>RARB &amp; APC</i>	<b>0.654</b>	<b>0.030</b>	<b>80.00</b>	<b>54.29</b>	<b>0.3</b>	<b>&gt;0.62</b>
10	<i>RARB &amp; PSA</i>	0.547	0.526	100.00	16.67	0.2	>0.60
11	<i>RARB &amp; PSAD</i>	0.6	0.520	40.00	100.00	0.4	≤0.59
12	<i>RASSF1 &amp; GSTP1</i>	0.593	0.249	40.00	81.48	0.2	>0.47
13	<i>RASSF1 &amp; APC</i>	0.512	0.874	4.17	76.47	0.2	≤0.61
14	<i>RASSF1 &amp; PSA</i>	0.593	0.249	40.00	81.48	0.2	>0.47
15	<i>RASSF1 &amp; PSAD</i>	0.602	0.174	50.00	74.29	0.2	>0.53
17	<i>GSTP1 &amp; APC</i>	0.576	0.367	25.00	96.43	0.2	>0.47
16	<i>GSTP1 &amp; PSA</i>	0.585	0.281	51.85	71.43	0.2	>0.47
18	<i>GSTP1 &amp; PSAD</i>	0.624	0.116	62.96	71.43	0.3	>0.47
19	<i>APC &amp; PSA</i>	0.537	0.626	92.00	28.57	0.2	≤0.57
20	<i>APC &amp; PSAD</i>	0.608	0.154	72.00	57.14	0.3	>0.58
21	<i>PSA &amp; PSAD</i>	0.565	0.377	78.57	41.67	0.2	>0.58
<b>Panel of three biomarkers</b>							
22	<i>RARB, RASSF1 &amp; GSTP1</i>	0.623	0.099	76.92	45.71	0.2	>0.60
23	<i>RARB, RASSF1 &amp; APC</i>	0.627	0.096	66.67	61.76	0.3	>0.60
24	<i>RARB, RASSF1 &amp; PSA</i>	0.621	0.105	76.92	45.71	0.2	>0.60
25	<i>RARB, RASSF1 &amp; PSAD</i>	<b>0.646</b>	<b>0.049</b>	<b>73.08</b>	<b>57.14</b>	<b>0.3</b>	<b>&gt;0.60</b>
26	<i>RARB, GSTP1 &amp; APC</i>	0.625	0.116	33.33	92.86	0.3	>0.45
27	<i>RARB, GSTP1 &amp; PSA</i>	0.64	0.065	48.15	82.14	0.3	>0.46
28	<i>RARB, GSTP1 &amp; PSAD</i>	<b>0.671</b>	<b>0.028</b>	<b>74.07</b>	<b>67.86</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.51</b>
29	<i>RARB, APC &amp; PSA</i>	<b>0.658</b>	<b>0.025</b>	<b>76.00</b>	<b>60.00</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.62</b>
30	<i>RARB, APC &amp; PSAD</i>	<b>0.648</b>	<b>0.041</b>	<b>92.00</b>	<b>45.71</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.65</b>
31	<i>RARB, PSA &amp; PSAD</i>	0.589	0.226	46.43	75.00	0.2	>0.52
32	<i>RASSF1, GSTP1 &amp; APC</i>	0.586	0.311	52.17	77.78	0.3	>0.52
33	<i>RASSF1, GSTP1 &amp; PSA</i>	0.575	0.354	80.00	37.04	0.2	>0.55
34	<i>RASSF1, GSTP1 &amp; PSAD</i>	0.63	0.113	64.00	66.67	0.3	>0.50
35	<i>RASSF1, APC &amp; PSA</i>	0.513	0.863	4.17	76.47	0.2	≤0.61
36	<i>RASSF1, APC &amp; PSAD</i>	0.602	0.189	75.00	52.94	0.3	>0.60
37	<i>RASSF1, PSA &amp; PSAD</i>	0.599	0.185	53.85	65.71	0.2	>0.56
38	<i>GSTP1, APC &amp; PSA</i>	0.582	0.332	50.00	75.00	0.3	>0.51
39	<i>GSTP1, APC &amp; PSAD</i>	0.629	0.129	41.67	96.43	0.4	>0.45
40	<i>GSTP1, PSA &amp; PSAD</i>	0.635	0.084	48.15	92.86	0.4	>0.44
41	<i>APC, PSA &amp; PSAD</i>	0.587	0.251	60.00	62.86	0.2	>0.57
<b>Panel of four biomarkers</b>							
42	<i>RARB, RASSF1, GSTP1 &amp; APC</i>	0.634	0.102	43.48	85.19	0.3	>0.48
43	<i>RARB, RASSF1, GSTP1 &amp; PSA</i>	0.649	0.062	68.00	70.37	0.4	>0.51
44	<i>RARB, RASSF1, GSTP1 &amp; PSAD</i>	<b>0.668</b>	<b>0.037</b>	<b>60.00</b>	<b>81.48</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.47</b>
45	<i>RARB, RASSF1, APC &amp; PSA</i>	0.634	0.081	75.00	58.82	0.3	>0.61
46	<i>RARB, RASSF1, APC &amp; PSAD</i>	0.629	0.096	75.00	64.71	0.4	>0.59
47	<i>RARB, RASSF1, PSA &amp; PSAD</i>	<b>0.665</b>	<b>0.023</b>	<b>76.92</b>	<b>51.43</b>	<b>0.3</b>	<b>&gt;0.61</b>
48	<i>RARB, GSTP1, APC &amp; PSA</i>	0.609	0.176	37.50	89.29	0.3	>0.46
49	<i>RARB, GSTP1, APC &amp; PSAD</i>	0.637	0.098	75.00	57.14	0.3	>0.58
50	<i>RARB, GSTP1, PSA &amp; PSAD</i>	<b>0.687</b>	<b>0.012</b>	<b>59.26</b>	<b>78.57</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.47</b>
51	<i>RARB, APC, PSA &amp; PSAD</i>	<b>0.663</b>	<b>0.022</b>	<b>72.00</b>	<b>60.00</b>	<b>0.3</b>	<b>&gt;0.58</b>
52	<i>RASSF1, GSTP1, APC &amp; PSA</i>	0.581	0.339	47.83	77.78	0.3	>0.51
53	<i>RASSF1, GSTP1, APC &amp; PSAD</i>	0.612	0.199	43.48	92.59	0.4	>0.47
54	<i>RASSF1, GSTP1, PSA &amp; PSAD</i>	0.64	0.077	72.00	59.26	0.3	>0.53
55	<i>RASSF1, APC, PSA &amp; PSAD</i>	0.597	0.207	79.17	50.00	0.3	>0.61
56	<i>GSTP1, APC, PSA &amp; PSAD</i>	0.616	0.162	50.00	85.71	0.4	>0.49
<b>Panel of five biomarkers</b>							
57	<i>RARB, RASSF1, GSTP1, APC &amp; PSA</i>	0.634	0.100	60.87	66.67	0.3	>0.54
58	<i>RARB, RASSF1, GSTP1, APC &amp; PSAD</i>	0.628	0.129	43.48	92.59	0.4	>0.46
61	<i>RARB, RASSF1, GSTP1, PSA &amp; PSAD</i>	<b>0.679</b>	<b>0.021</b>	<b>80.00</b>	<b>62.96</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.57</b>
60	<i>RARB, RASSF1, APC, PSA &amp; PSAD</i>	<b>0.648</b>	<b>0.048</b>	<b>50.00</b>	<b>79.41</b>	<b>0.3</b>	<b>&gt;0.53</b>
59	<i>RARB, GSTP1, APC, PSA &amp; PSAD</i>	<b>0.679</b>	<b>0.022</b>	<b>83.33</b>	<b>57.14</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.60</b>
62	<i>RASSF1, GSTP1, APC, PSA &amp; PSAD</i>	0.617	0.162	65.22	66.67	0.3	>0.53
<b>Panel of six biomarkers</b>							
63	<i>RARB, RASSF1, GSTP1, APC, PSA &amp; PSAD</i>	<b>0.676</b>	<b>0.027</b>	<b>73.91</b>	<b>66.67</b>	<b>0.4</b>	<b>&gt;0.57</b>



## 7. REZULTATŲ APTARIMAS

Sisteminė ultragarsu kontroliuojama prostatos biopsija yra pakankamai netiksli ir dažnu atveju lemia klaidingai neigiamą biopsijos rezultatą, dėl ko kliniškai reikšmingos PV diagnozė praleidžiama, o kliniškai nereikšmingas PV nustatomas per dažnai ir liga klasifikuojama neteisingai. Remiantis literatūros duomenimis, kliniškai reikšmingos PV aptikimo dažnis pirminiams pacientams, kuriems atliekama atsitiktinė sisteminė biopsija, yra tik 23 %.<sup>120</sup> Yra žinoma, kad kartotinės biopsijos duoda dar blogesnius rezultatus: antrinės sisteminės biopsijos kliniškai reikšmingo PV aptikimo dažnis 14%, trečiosios kartotinės biopsijos – 6%.<sup>121</sup> Mūsų tyrime kliniškai reikšminga liga buvo nustatyta 34,28% atvejų pritaikomosios biopsijos būdu, tuo tarpu kliniškai reikšmingos ligos aptikimo dažnis po sisteminės biopsijos buvo tik 8,48%.

Mūsų rezultatai iš esmės atitinka tendenciją, pateikiamą kitų tyrėjų darbuose. PRECISION tyrimo duomenimis, ISUP  $\geq 2$  laipsnio vėžio aptikimo dažnis buvo žymiai didesnis vyrams, kuriems buvo atlikta MRT tikslinė biopsija, nei tiems, kuriems buvo paskirta sisteminė biopsija (38 % prieš 26 %,  $p = 0,005$ , aptikimo koeficientas 1,46).<sup>122</sup> mpMRT eroje saturacinė prostatos biopsija (24 biopsijos mėginiai) taip pat turi retų indikacijų ir naudojama tik išskirtiniais atvejais, t.y., antriniams pacientams, kurių mpMRT neigiamas (PI-RADS 1-2 balai) ir išlieka padidėjęs PSA. Literatūros duomenimis, kliniškai reikšmingo prostatos vėžio nustatymo dažnis po saturacinės biopsijos siekia tik 16 %.<sup>123</sup>

Literatūros duomenys rodo, kad po radikalios prostatektomijos ištyrus patologinę medžiagą apie 8–24% kliniškai reikšmingų PV atvejų gali likti nepastebėti mpMRT tyrimu.<sup>124</sup> Anksčiau dominavo nuomonė, kad sisteminių ir pritaikomųjų biopsijos schemų derinys užtikrina didžiausią PV aptikimo dažnį.<sup>14</sup> Tačiau mūsų duomenimis, atlikus adaptuotą sisteminę prostatos biopsiją, bendras PV nustatymo dažnis pagerėjo tik nuo 74,56% iki 80,21%. Remiantis mūsų rezultatais, sisteminė prostatos biopsija pagerino bendrą PV aptikimo dažnį, tačiau nesuteikė papildomos naudos nustatant kliniškai reikšmingą ligą.

Europos urologų asociacija rekomenduoja pirminiams pacientams atlikti pritaikomąją ir sisteminę biopsiją, o pacientams, kuriems anksčiau jau buvo atlikta sisteminė prostatos biopsija, pakartotinai rekomenduojama atlikti tik pritaikomąją biopsiją iš įtariamo židinio, jei jų PIRADS balas yra  $\geq 3$ . Tačiau mūsų duomenys rodo, kad pacientams, kuriems anksčiau nebuvo atlikta biopsija ir radiologiškai nustatytas PIRADS balo  $\geq 3$  navikas, galima saugiai atlikti tik pritaikomąją biopsiją be papildomos sisteminės biopsijos ir išlaikyti aukštą kliniškai reikšmingo PV aptikimo dažnį. Tai pagrindžiame tuo, kad

pacientams, kuriems pritaikomosios prostatos biopsijos būdu nebuvo nustatyta kliniškai reikšmingo PV, kliniškai reikšmingo vėžio nebuvo nustatyta ir taikant adaptuotą sisteminę prostatos biopsiją.

Kituose atsitiktinių imčių kontroliuojamuose tyrimuose, kuriuose pagrindinis dėmesys buvo skiriamas pirminiems pacientams, kurių MRT buvo teigiamas, nustatyta, kad pritaikomoji biopsija aptiko žymiai daugiau ISUP > 2 laipsnio vėžio atvejų nei sisteminė biopsija (rizikos skirtumas -0,11 [95 % PI: -0,2–0,0];  $p=0,05$ ).<sup>124</sup> Kitas labai svarbus faktas yra tai, kad tikslinė biopsija be sisteminės biopsijos sumažina ISUP 1 laipsnio PV aptikimą, palyginti su sisteminė biopsija. PRECISION ir 4M tyrimuose kliniškai nereikšmingos PV aptikimo dažnis pritaikomosios biopsijos grupėje buvo žymiai mažesnis, palyginti su tik sisteminės biopsijos grupe (9% ir 22%,  $p < 0,001$ , PRECISION tyrimo aptikimo koeficientas 0,41; 14 %, palyginti su 25 %,  $p < 0,001$ , aptikimo koeficientas 0,56 4M).<sup>122,125</sup>

Remiantis PROMIS tyrimo rezultatais, neigiamas MRT gali padėti išvengti 28% pacientų nereikalingų transrektalinių ultragarsu kontroliuojamų biopsijų, iš jų 21% būtų nustatomas teisingai neigiamas rezultatas, tačiau 7% būtų nustatytas klaidingai neigiamais rezultatais.<sup>126</sup> Remiantis paskelbtais rezultatais, neįmanoma įvertinti, ar šie kliniškai reikšmingi PV atvejai nustatyti tik pritaikomosios biopsijos būdu, būtų aptiktos papildomos sisteminės biopsijos metu. Be to, negalime ignoruoti fakto, kad pritaikomosios biopsijos metu atliktų biopsijos mėginių skaičius yra žymiai mažesnis, palyginti su sisteminė biopsija (vidutinis biopstatų skaičius: 2–7, palyginti su branduolių skaičiumi: 8–15), o aptikimo dažnio santykis (t. y. aptikimo dažnių, gautų taikant vien tikslinę biopsiją ir vien sisteminę biopsiją, santykis) yra pranašesnis už tikslinę biopsiją (1,12 (95 % PI: 1,02–1,23), kai ISUP laipsnis  $\geq 2$  PV ir 1,20 (95 % PI: 1,06–1,36), kai ISUP laipsnis  $\geq 3$  PV).<sup>125</sup> Šis faktas atsispindi ir mūsų tyrime.

Lieka atsakyti į ne mažiau svarbų klausimą, kiek biopstatų reikia paimti siekiant nustatyti kliniškai reikšmingą PV, transperinealinės MRT/UG kontroliuojamos prostatos biopsijos metu. Remiantis literatūra, vyrams, kuriems atliekama mpMRT/UG kontroliuojama biopsija, pirmieji du biopsijos mėginiai diagnozuoja daugumą kliniškai reikšmingų vėžio formų. Tačiau išlieka dalis vyrų, kuriems būtų naudingos papildomos biopsijos, ypač tų, kurių židinio dydis didesnis nei 8 mm skersmens.<sup>127</sup> Mūsų tyrimo metu antrasis ir trečiasis tiksliniai mėginiai aptiko dar 16,49% ir 28,87% kliniškai reikšmingų PV atvejų. Šie papildomi mėginiai aptiko 45,36 % visų kliniškai reikšmingų PV atvejų, o tai rodo, kad pacientams, kurių ROI didesnis nei 0,5 cm<sup>3</sup> arba 8 mm skersmens, gali būti pagrįstos bent trys pritaikomosios biopsijos šerdys.

Biopsija grįstos diagnostikos tikslumo įvertinimas šiuo metu paremtas histopatologiniu biospinės medžiagos vertinimu, tačiau kancerizacijos laukas yra žymiai platesnis nei matoma histopatologinėje analizėje.

Remiantis atnaujinta PIRADS 2.1 balų sistema pagerėjo kliniškai reikšmingo PV aptikimo dažnis.<sup>128</sup> Tikima, kad agresyviausi židiniai navikiniai pakitimai prostatoje, nustatyti mpMRT, atspindi galutiniame patologiniame mėginyje ir gali būti gydomi taikant židininę terapiją, tačiau net ir šiam diagnostiniam tyrimui trūksta specifškumo, ypatingai kalbant apie PV formą, plitimo pobūdį ir diferenciaciją. MpMRT gali parodyti tik agresyviausią PV formą, o einamuju momentu kliniškai nereikšmingą PV gali ir praleisti. Remiantis literatūra, pritaikomoji MRT/UG kontroliuojama pritaikomoji prostatos biopsija, tiksliai diagnozuoja iki 80 % mpMRT matomų pakitimų, tačiau net iki 20 % mpMRT praleistų navikinių židinių yra galimai susiję su potencialiai mirtinu- progresuoti linkusiu vėžiu.<sup>123</sup> Šiai dienai prostatos mpMRT yra jautriausias tyrimo metodas galintis aptikti kliniškai reikšmingus PV židinius prostatoje. Tačiau jam trūksta specifškumo atskirti kliniškai reikšmingą PV nuo kliniškai nereikšmingos ligos. Taip yra dėl mpMRT vaizdų interpretavimo ir techninio vertinimo problemų. Tiksliai neatpažinus ar neįvertinus, pacientų, sergančių žemo laipsnio PV, gydymas gali būti neoptimalus ir turėti daug šalutinių reiškinių.<sup>129</sup> Pagrindiniai įprasti klinikiniai ir patologiniai rodikliai (PSA lygis, GG laipsnio grupė, naviko klinikinė ir radiologinė stadija) yra naudingi diagnozuojant pirminį PV, tačiau jiems trūksta jautrumo ir specifškumo klasifikuojant ligos riziką.<sup>32,130–132</sup> Taigi, remiantis vien tik mpMRT ir klinikiniais rodikliais yra rizikinga ir sunku pasirinkti individualų PV sergančių pacientų gydymą.

Pastaruojau metu daugėja įrodymų, kad molekuliniai vėžio žymenys gali papildyti esamas standartines klinikinės diagnostikos priemones, tokias kaip PSA, PSAD ir vaizdinius tyrimo metodus, ypač kai genetinei diagnostikai yra naudojami epigenetiniai tyrimai.<sup>133</sup> DNR metilinimas yra ankstyviausias, stabiliausias ir dažniausiai pasitaikantis PV genomo pokytis, išsamiai ištirtas kaip molekulinis vėžio žymuo.<sup>134–136</sup>

Su PV susijusių genų promotoriaus srities DNR hipermetilinimas yra dažnas reiškinys, stebimas ankstyvuojau prostatos vėžio atsiradimo metu, ir yra susijęs su vietiniu ligos progresavimu, galimu metastazavimu ir vyksta daug dažniau nei genetinės mutacijos.<sup>137–139</sup> Prostatos vėžiui yra būdingas daugiažidiniškumas ir literatūros duomenimis, net 67–96% radiklios prostatektomijos mėginių rodo, kad prostatoje vyrauja daugiau nei vienas navikas. Tai rodo, kad kancerizacijos procesas vyksta didesnėje prostatos dalyje ir kancerogenezę lemiantys veiksniai sukelia molekulinis pokyčius, kurie gali lemti kelių ir daugiau navikinių židinių atsiradimą priešinėje

liaukoje. Tokie pokyčiai aptinkami histologiškai normaliose arba uždegiminėse ląstelėse ir GPH audinyje, kuris paprastai nustatomas dar prieš kancerogenezę. Tyrimais yra nustatyta, kad su naviku besiribojančio sveiko audinio ląstelėse yra aptinkami genų ekspresijos pokyčiai, telomerų DNR kiekio ir genų kopijų skaičiaus pakitimai, kurie lemia piktybinį fenotipą. Geriausiai ištirtuose genuose *APC*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *RARB* PV atveju yra stebimas aukštas hipermetilinimo lygis, ir šių genų DNR metilinimas kartu su PSA lygiu arba PSAD gali būti naudojami kaip vėžio žymuo latentinio vėžio rizikai stratifikuoti, ligos progresavimui stebėti bei kartu su radiologiniu prostatos vaizdavimu gali padėti tinkamai ir saugiai parinkti PV gydymą.<sup>129</sup>

Šis tyrimas buvo pradėtas siekiant geriau suprasti vietinį ligos išplitimo laipsnį prostatos liaukoje šalia PV židininio pažeidimo. Taip pat siekėme įvertinti PV specifinių genų DNR metilinimo mastą perifokaliniame audinyje, kai mpMRT vizualiai neišdiferencijuoja PV nuo sveiko prostatos audinio. Taigi mūsų tyrimas būtent ir įrodo, kad kiekybinis, visų tirtų genų DNR metilinimo lygis navikiniame pažeidime buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginti su perifokaliniiais mėginiais, esančiais 10 mm atstumu nuo indekso pažeidimo ( $p < 0,0001$ ; 13 pav.). Be to, ne vėžiniai audiniai, paimti 20 mm atstumu nuo mpMRT matomo pažeidimo, parodė dar mažesnę DNR metilinimo lygį, palyginti su perifokaliniiais mėginiais arba mėginiais iš židinio. Palyginus mėginių paimtų iš židinio pažeidimą su nevėžiniais audiniais, didžiausias jautrumas ir specifiškumas buvo pasiektas analizuojant *RARB*, *GSTP1* ir *APC* genų hipermetilimą ( $AUC = 0,98$ ;  $p < 0,0001$ ) ir *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* ir *APC* genų hipermetilinimą ( $AUC = 0,98$ ;  $p < 0,0001$ ) biožymenų derinių (15 pav., 7 lentelė). Vertinant kiekvieno iš tirtų genų diagnostinį potencialą, didžiausiu jautrumu ir specifiškumu pasižymėjo *RASSF1* genas ( $AUC = 0,94$ ;  $p < 0,0001$ ). Lyginant su literatūroje pateiktais duomenimis, mūsų tyrimas iš esmės ne tik patvirtina, bet ir rodo analogiškus rezultatus. Tyrime, kurį atliko Hanson ir kt. (2006), *GSTP1* ir *RARB2* metilinimas buvo aptiktas kai kuriuose histologiškai normaliai atrodančiuose epitelio mėginiuose. Be to, normalūs stromos mėginiai šiame tyrime taip pat parodė metilinimą. Daugumoje mėginių buvo nustatytas dalinis metilinimas, nors dviejuose mėginiuose metilinimo lygis viršijo 51%. Šie radiniai parodė galimą kancerizacijos lauko efekto pasireiškimą, kai genų metilinimas tęsiasi už naviko regiono.<sup>140</sup> Tyrime, kurį atliko Mehrotra ir kt. (2008), metilinimo žymenų jautrumas ir specifiškumas buvo įvertintas išanalizavus 51 porą histologiškai piktybinių ir nepiktybinių audinių iš prostatektomijų. Tyrimo metu buvo pastebėtas *GSTP1* metilinimas 62% naviko audinių, palyginti su 2% nepiktybinių audinių. *APC* metilinimas buvo nustatytas 69% vėžio audinių ir nė viename iš nepiktybinių audinių. *RARB2* metilinimas buvo

aptiktas 58% vėžio audinių, tačiau jo nebuvo nepiktybiniuose audiniuose. Panašiai *RASSF1A* metilinimas nustatytas 58 % navikinių audinių ir 11 % nepiktybinių audinių.<sup>141</sup> Panašūs DNR metilinimo lygiai PV židiniuose buvo nustatyti Serenaitės ir kt. (2015) tyrime. Buvo parodyta, kad *GSTP1*, *RASSF1* ir *RARB* taip pat dažnai (>75 %) buvo metilinami ir jie taip pat parodė aukštą metilinimo lygį (21–36 %) tiriant skirtingus PV židinius.<sup>142</sup> Nors tyrimų rezultatai rodo gan dažną DNR metilinimo pakitimų paplitimą PV kancerizacijos lauke, tačiau tyrimuose naudoti skirtingi tyrimų metodai ir eksperimentinės sąlygos gali turėti įtakos rezultatams ir nėra tiesiogiai palyginami su mūsų gautais rezultatais.

Plečiantis mpMRT diagnostikai daugėja nuomonių, kad dalis PV gali būti gydoma šalinant navikinius židinius vadinamosios židinių terapijos/chirurgijos metodu, taip išvengiant komplikacijų susijusių su radikalia prostatektomija. Neurovaskulinius pluoštus tausojančiose robotinės prostatektomijos atvejuose dažnai yra pranešama apie sunkų šlapimo nelaikymą ir erekcijos sutrikimą po operacijos. Tačiau lyginant su minimaliai invazyviais gydymo metodais, šių komplikacijų atvejai nėra fiksuojami nė vienoje prostatos fokalinės terapijos grupėje. Daugeliui vidutinės rizikos pacientų, kuriems ligos progresavimo rizika taikant aktyvų stebėjimą (AS) yra nepriimtina didelė, bet gyvenimo kokybė gydant visą liauką būtų per prasta, tinkamiausias sprendimas yra židininė terapija. Tačiau šiai dienai daugelis klausimų lieka neatsakytų, kurių svarbiausias - kokia zona, esanti aplink įtariamą naviką prostatoje, turi būti pašalinta, kad išvengtume ateityje ligos atsinaujinimo ir progresavimo. Taikant židininę priešinės liaukos krioterapiją, vidutinės trukmės laikotarpiu, pastebimas didelis pacientų išgyvenamumas, tačiau yra žinoma, kad po 5 metų išgyvenamumas šiai dienai siekia tik 70 %.<sup>143</sup> Dideliai daliai pacientų, kuriems yra taikoma krioterapija ir HIFU, tikėtina, kad reikės pakartotinio židininio gydymo, kad būtų galima pilnai kontroliuoti prostatos vėžį. Pagrindinis argumentas, kuris pasisako prieš židininę terapiją yra nepakankama pacientų, sergančių kliniškai reikšminga liga, gydymo patirtis ir pacientų imtis. Netinkamai parinkus pacientą židininei terapijai, pasekmės gali būti rimtos ir susijusios su PV progresavimu ir paciento mirtimi. Pacientų atrankos kriterijai židininei terapijai ir toliau tobulėja remiantis naujomis prostatos mpMRT vertinimo gairėmis, atsiradusiomis ir vis tobulėjančiomis pritaikomosiomis prostatos biopsijomis.<sup>144</sup> Tačiau šiai dienai dėl diagnostinio nenuoseklumo paciento atrankai fokalinei prostatos vėžio terapijai yra reikalingi papildomi įrodymais pagrįsti kriterijai.

Dabartinės fokalinės PV terapijos strategijos skiriasi ne tik tinkamumo kriterijais, bet ir sunaikinamo ar išsaugomo audinio kiekiu t.y. nervus

tausojanči prostatos abliacija, hemiabliacija, ledo ritulio lazdos formos ar tik tikslinė židinė terapija. *Diseases (ICUD)/Societ Internationale de Urologie* (SIU) fokalinę prostatos terapiją laiko sėkmingu gydymo metodu ne tik, kaip trumpalaikį naviko sunaikinimą, bet taip pat, kaip kliniškai reikšmingo vėžio sunaikinimą vidutiniu ir ilgalaikiu laikotarpiu. Tačiau tiksliai nežinant, kokie pakitimai yra įvykę šalia navikinio židinio, ir tiksliai neparinkus fokalinės terapijos apimties, galima palikti sąlygas kliniškai reikšmingam vėžiui išsivystyti ateityje. Trumpuoju laikotarpiu šio vėžio židinio nesunaikinimas, greičiausiai reikš fokalinės terapijos nesėkmę, ir net vidutiniu ir ilgalaikiu laikotarpiu tai gali lemti ligos atsinaujinimą ir progresavimą 12.<sup>143</sup>

Šiame biomediciniame tyrime genų atranka buvo pagrįsta mūsų ankstesne patirtimi, tiriant biožymenis susijusius su PV kancerogeneze.<sup>117,119</sup> Šiame tyrime bandėme įvertinti naviką slopinančių genų DNR metilinimo mastą perifokaliniame audinyje esant mpMRT nematomam PV ir palyginti jį su normaliu prostatos audiniu ir mpMRT matomu PV. Buvo iškelta hipotezė, kad DNR metilinimo biožymenys vėliau gali būti naudojami kaip jautri priemonė vietiniam PV plitimui nustatyti. Remdamiesi ankstesniais tyrimais, pasirinkome ištirti šiuos genus, kurie geriausiai atspindi PV specifinius pokyčius ir vietinį PV plitimą prostatos audinyje.<sup>117,142,145</sup> *GSTP1*, *RASSF1*, *APC* ir *RARB* genai yra dažniausiai metilinami PV genai, kurių metilinimo dažnis yra svyruoja nuo 70 iki beveik 100 % įvairiuose tyrimuose.<sup>146–148</sup> Mūsų tyrimo rezultatai atskleidė, kad visų tirtų genų DNR metilinimo lygis navikiniame pažeidime buvo statistiškai reikšmingai didesnis, palyginti su perifokaliniiais mėginiais ir histopatologiškai normaliais audiniais. Be to, keturių genų biožymenų derinys parodė didžiausią diagnostinę vertę PV, testo jautrumas buvo 94% ir specifiškumas 100%. Pagrindinė šio tyrimo išvada yra ta, kad nors radiologiniu požūriu mpMRT, perifokalinis prostatos audinys ir plotas 20 mm atstumu nuo navikinio pažeidimo nesiskyrė, genetiniame lygmenyje buvo nustatyti reikšmingi skirtumai. Tai leidžia daryti prielaidą, kad  $\geq 10$  mm plotas atrodo pakankamai saugus židininei PV terapijai, remiantis molekulinio lauko vėžio masto kartografavimu.

Pasirinktų genų DNR metilinimo pokyčiai buvo analizuojami kiekybinėmis priemonėmis naviko židiniuose ir perifokaliniame prostatos audinyje, lyginant su normaliu prostatos audiniu, kai diagnozė buvo nustatyta mpMRT. Mūsų tyrimas rodo, kad visų tirtų genų DNR metilinimo lygis navikiniame pažeidime buvo statistiškai reikšmingai didesnis nei perifokaliniuose mėginiuose, o pasiekus  $>10$  mm atstumą hipermetilinimas reikšmingai sumažėja. Remdamiesi tuo, galime daryti išvadą, kad saugus atstumas nuo pagrindinio navikinio pažeidimo yra ne mažesnis kaip 10 mm,

o galimas židininis vidutinės rizikos PV sergančių pacientų gydymas gali būti atliekamas atliekant regioninę fokalinę hemi-abliaciją.

Onkologijoje audinių biopsija pagrįstą diagnostiką vis dažniau papildo skysčių biopsija. Šiuo metodu organizmo skysčiuose (kraujyje, šlapime) tirima laisvai cirkuliuojanti DNR (cfDNR). Sergant vėžiu ar turint ikinavikinių pakitimų cfDNR gausiai pasipildo naviko ląstelių DNR, nes naviko zonoje vyksta instensyvi ląstelių apykaita, o žuvančios ląstelės paskleidžia savo DNR organizmo skysčiuose. Tikėtina, kad skysčių biopsija galėtų padėti identifikuoti kliniškai reikšmingą vėžį, nepavykus tiksliai paimti audinio biopsijos iš naviko židinio, bei leistų stebėti navikui specifinės DNR kiekio kitimus po židininės terapijos.

Šiuo tyrimu įvertinome 4 epigenetinių žymenų tinkamumą skysčių biopsijos tyrimams. Mūsų tyrime nepaisant žemo DNR metilinimo lygio šlapime, visi ištirti biožymenys parodė tokią pat tendenciją kaip ir audiniuose, o didžiausias DNR metilinimo lygis buvo aptiktas kliniškai reikšmingo PV grupėje ( $GG \geq 2$ ). Šlapimo žymenų rinkinio diagnostinė vertė buvo žymiai pagerinta derinant žymenis su kraujo tyrimo parametrais, tokiais kaip PSA ir PSAD. Iš keturių analizėje dalyvaujančių genų tik *GSTPI* promotoriaus metilinimo lygis sugebėjo atskirti PV atvejus nuo kontrolinių pacientų ( $p = 0,0005$ ) ir net kliniškai reikšmingo PV atvejus nuo kliniškai nereikšmingų atvejų ( $p = 0,029$ , 17 pav.). Neląstelinės DNR metilinimo lygis šlapime buvo akivaizdžiai mažesnis nei audinių mėginiuose. Tačiau, nepaisant žemo DNR metilinimo lygio šlapime, visi tirti biožymenys rodė tą pačią tendenciją – žemiausias metilinimo lygis buvo nustatytas kontrolinėje grupėje, o didžiausias – kliniškai reikšmingo PV grupėje. Potencialių šlapimo žymenų charakteristikų analizė parodė, kad visų keturių žymenų derinys su PSA arba PSAD žymiai padidina jautrumą ir specifiškumą atskiriant kliniškai reikšmingą PV nuo kontrolinės (ne vėžio) grupės. Keturių biožymenų testo derinys su PSAD leido identifikuoti kliniškai reikšmingą PV su  $\geq 90\%$  jautrumu ir specifiškumu, o tai rodo didelį potencialą naudoti šias neinvazines priemones stebint atvejus po židinės – fokalinės prostatos terapijos.

Reminatis EAU rekomendacijomis, neinvazinis šlapimo testas Select MDx (MDxHealth, Irvine, Kalifornija, JAV) yra rekomenduojamas išankstinei galimai agresyvaus prostatos vėžio atvejų atrankai prieš atliekant prostatos mpMRT.<sup>53</sup> Tačiau mūsų tyrimas rodo galimą tokio neinvazinio tyrimo naudą stebint pacientus po židininės – fokalinės terapijos. Tačiau norint įrodyti testo patikimumą, reikia atlikti papildomą perspektyvinį tyrimą, kuriame pacientai su vidutinės ar žemos rizikos PV būtų gydomi židinine PV terapija.

## 8. IŠVADOS

1. Tyrimo eigoje nustatyti 227 prostatos vėžio (PV) atvejai. Pritaikomosios MRT/UG kontroliuojamos biopsijos metodu nustatyti 97 (34,28%; 97/283) kliniškai reikšmingo PV atvejai. Naudojant radiologinio įvertio PI-RADS v2.1 balą  $\geq 4$  kaip teigiamą testo rezultatą, siekiant aptikti kliniškai reikšmingą PV, pritaikomosios biopsijos jautrumas ir specifiškumas siekė 35,56% ir 92,31% (plotas po kreive (AUC) = 0,639).
2. Adaptuotos sisteminės (AdSB) biopsijos metodu nustatyti tik 24 kliniškai reikšmingo PV atvejai (8,48 %; 24/283), žymiai mažiau nei pritaikomosios biopsijos metodu ( $p < 0,001$ ). Naudojant radiologinio įvertio PI-RADS v2.1 balą  $\geq 4$  kaip teigiamą testo rezultatą, metodo jautrumas ir specifiškumas buvo 8,52 % ir 92,31 %, (AUC = 0,504; 95 % PI: 0,6–0,6 0,7).
3. Visų tirtų *RASSF1*, *GSTP1*, *RARB* ir *APC* genų promotoriaus DNR metilinimo lygis pagrindiniame navikiniame židinyje buvo statistiškai reikšmingai didesnis nei kancerizacijos lauko mėginiuose, esančiuose 10 mm atstumu nuo navikinio židinio ( $p < 0,0001$ ), ir nenavikiniuose mėginiuose, esančiuose 20 mm atstumu nuo židinio ( $p < 0,0001$ ).
4. PV atvejų šlapimo nuosėdų mėginiuose *GSTP1* geno metilinimo lygis buvo didesnis nei kontrolinių atvejų mėginiuose ( $p = 0,0005$ ), taip pat kliniškai reikšmingo PV atvejuose lyginant su kitais PV atvejais ( $p = 0,029$ ). Nustatant kliniškai reikšmingą PV geriausiu daignostiniu potencialu pasižymėjo dviejų neinvazinių DNR metilinimo žymenų ir dviejų klinikinių parametų (*RARB*, *GSTP1*, PSA ir PSAD) derinys. Šio žymenų rinkinio jautrumas siekė 78,57%, o specifiškumas 59,26 % ( $P = 0,012$ ).

## 9. REKOMENDACIJOS

- Siekdami sumažinti kliniškai nereikšmingo PV aptikimo dažnį galime rekomenduoti visiškai pakeisti sisteminę prostatos biopsiją tik į pritaikomą MRT/UG kontroliuojamą prostatos biopsiją. Šis tyrimas rodo, kad tikslinės prostatos biopsijos pakanka saugiai ir jautriai nustatyti kliniškai reikšmingą PV pirminės biopsijos metu.
- Siekiant pagerinti kliniškai reikšmingo PV aptikimo dažnį atliekant MRT/UG kontroliuojamą prostatos biopsijos procedūrą,



rekomenduojame paimti bent keturis mėginius iš kiekvieno navikinio židinio, kai mpMRT identifikuoja ne mažesnę kaip 8 mm navikinį židinį.

- Siekiant geriau nustatyti kliniškai reikšmingą prostatos vėžį, kaip pirminę diagnostikos priemonę rekomenduojama naudoti mpMRT, taip pat atlikti tikslinę prostatos biopsiją, skystą prostatos biopsiją ir visus duomenis derinti su klinikiniais rodikliais, ypač PSA ir PSAD.
- Norint ištirti lokalų PV išplitimo lygį, nustatant kancerizacijos lauko efektą aplink vėžio židinį, rekomenduojame įvertinti šių *RASSF1*, *GSTP1*, *RARB* ir *APC* genų metilinimo lygį prostatos biopsijose, paimtose iš MRT aptiktų vėžio židinių ir 10 bei 20 mm atstumu nuo navikinio židinio krašto.
- Galime daryti išvadą, kad saugus atstumas nuo navikinio židinio krašto yra ne mažesnis kaip 10 mm, dėl to rekomenduojame, siekiant radikaliai išgydyti vidutinės rizikos lokalų prostatos vėžį naudoti regioninę tikslinę priešinės liaukos hemi-abliaciją.

## 10. PUBLIKACIJŲ IR PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

### 10.1 . Straipsniai disertacijos tema

#### *1 publikacija*

**Augustinas Matulevičius**, Arnas Bakavičius, Albertas Ulys, Mantas Trakymas, Jurgita Ušinskienė, Ieva Naruševičiūtė, Rasa Sabaliauskaitė, Kristina Žukauskaitė, Sonata Jarmalaitė ir Feliksas Jankevičius

Multiparametric MRI fusion-guided prostate biopsy for detection of clinically significant prostate cancer eliminates the systemic prostate biopsy

*Applied Sciences* 2021 doi: 10.3390/app121910151 Impact Factor (WoS) – 2.838 (Q2 in "Physics Applied" and "Engineering, Multidisciplinary").

#### *2 publikacija*

**Augustinas Matulevičius**, Kristina Žukauskaitė, Rugilė Gineikaitė, Darius Dasevičius, Mantas Trakymas, Ieva Naruševičiūtė, Jurgita Ušinskienė, Albertas Ulys, Feliksas Jankevičius ir Sonata Jarmalaitė

Combination of DNA methylation biomarkers with multiparametric magnetic resonance and ultrasound imaging fusion biopsy to detect the local spread of prostate cancer.

*The Prostate*. 2023;1-12. doi.org/10.1002/pros.24615 Impact Factor (WoS) – 4.012 (Q1 in "Urology" Q2 in "Oncology").

## 10.2. Pranešimai disertacijos tema

**Matulevičius A.** Ulys A. Vėželis A. Trakymas M. Jankevičius F. First experience of using multi-parametric MRI/US fusion system for prostate biopsy to diagnose clinically significant prostate cancer at the National Cancer Institute of Lithuania European Urology Supplements Volume 18, Issue 3, May 2019, Page e2445 [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(19\)32157-8](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(19)32157-8) 6th Baltic Meeting in conjunction with the EAU 24 - 25 May 2019, Tallinn (Estonia)

**Matulevičius A.** Žukauskaitė K. Gerulaitytė A. Trakymas M. Ulys A. Sabaliauskaitė R. Jarmalaitė S. Analysis of DNA methylation biomarkers in mpMRI/US guided targeted prostate biopsies European Urology Open Science Volume 40, Supplement 1, June 2022, Page S16 [https://doi.org/10.1016/S2666-1683\(22\)00641-3](https://doi.org/10.1016/S2666-1683(22)00641-3) 7th Baltic meeting in conjunction with the EAU, 27-28 May 2022, Vilnius, Lithuania (Laimėta antra vieta).

**Matulevičius A.** Bakavičius A. Ulys A. Trakymas M. Ušinskienė J. Sabaliauskaitė R. Jarmalaitė S. Jankevičius F. Targeted MRI/US-guided prostate biopsy for detection of clinically significant prostate cancer in transperineal approach European Urology Open Science Volume 40, Supplement 1, June 2022, Page S18 [https://doi.org/10.1016/S2666-1683\(22\)00643-7](https://doi.org/10.1016/S2666-1683(22)00643-7) 7th Baltic meeting in conjunction with the EAU, 27-28 May 2022, Vilnius, Lithuania

## 11. SUMMARY

Prostate cancer (PCa) is the most prevalent oncological disease in males in Western Europe, including Lithuania. Before the multiparametric magnetic resonance imaging (mpMRI) era, the principal method to diagnose PCa and determine the risk was a systematic 12-core transrectal ultrasound (TRUS)-guided biopsy. Unfortunately, TRUS-guided biopsy is performed randomly, without targeting the tumor, and leads to over-diagnosing of clinically insignificant cancer in up to 50% of cases and not diagnosing clinically significant cancer in up to 18% of men, particularly if the tumor is in the apical or anterior regions of the prostate. In addition, TRUS-guided biopsy causes side effects including bleeding, pain, and severe systematic infection. To tackle this problem, new methods are being established which lead to increased biopsy accuracy based on the prostate mpMRI. One of the most promising and easily accessible prostate biopsy techniques is the mpMRI and ultrasound fusion (mpMRI/US)-guided prostate biopsy, which uses a specially designed system and software to fuse mpMRI images with real-time TRUS. This technique allows us to target suspicious lesions much more accurately than systemic TRUS-guided prostate biopsy, a little bit more accurately than transrectal cognitive guidance prostate biopsy, and gives advantages of this tactic mainly due to fewer biopsy cores taken that give lower rates of complications and better tolerance for the patient. Based on the Cochrane meta-analysis, MRT-FIRST and 4M clinical trials, the absolute added value of systematic biopsy for the detection of clinically significant PCa is known to be lower than that of targeted biopsy. Nowadays, it is important to get an answer whether targeted prostate biopsy enhances the detection of clinically significant PCa and safely obviates the need for systemic biopsy in primary patients, as some controversies remain. This study aimed to prove the high accuracy of mpMRI/US-guided targeted prostate biopsy for the detection of clinically significant PCa and demonstrate that adapted systematic biopsy (AdSB) does not provide additional benefit for the detection of clinically significant PCa.

Even in the most contemporary nerve-sparing robotic prostatectomy series, severe incontinence and erectile dysfunction are reported at detectable rates that are not seen in any of the focal therapy cohorts. For many intermediate-risk patients for whom the risk of progression with active surveillance (AS) is unacceptably high, but for whom quality of life with whole-gland treatment would be too low, focal therapy offers a possible solution. However, many questions remain unanswered for every mode of

focal therapy for PCa. High radical treatment-free survival is seen with focal cryotherapy over a medium-term period, but it has been reported as low as 70% at 5 years. Many patients receiving both cryotherapy and high-intensity focused ultrasound will need repeat focal treatment for definitive cancer control. The major argument against focal therapy lies in the undertreatment of patients with clinically significant disease. The consequences of improperly designating a patient for focal therapy may be profound. Patient selection criteria for focal therapy continue to evolve—mpMRI guidance, targeted fusion biopsy. Due to diagnostic inconsistency, additional evidencebased parameters are needed for patient selection. Nowadays evidence is increasing that molecular biomarkers can complement existing standard clinic diagnostic and prognostic tools, especially when a liquid biopsy is exploited. DNA methylation is the earliest, most stable, and most frequent alteration in the PCa genome and has been investigated in detail as a source of molecular biomarkers. Frequent DNA hypermethylation of promoter region of PCa-associated tumor suppressor genes is a prominent feature observed during early prostate tumorigenesis, as well as during its local progression and potential metastatic development, and perhaps occurs much more frequently and consistently than genetic mutations.

This study was initiated to better understand the field cancerization effect next to PCa index lesions and to evaluate the DNA methylation extent of target tumor suppressor genes in perifocal tissue on mpMRI-nonvisible PCa and compare it to the normal prostate tissue and mpMRI visible PCa.

Current strategies for organ-preserving PCa ablative therapy have varied in their eligibility criteria but also in the amount of tissue targeted for destruction and/or preservation: nerve-sparing prostate ablation, hemi-ablation, hockey stick, and target focal therapy. Diseases (ICUD)/Societ Internationale de Urologie (SIU) defined image-guided focal therapy success as the eradication of the tumor focus on the short term, also the absence of clinically significant cancer in the intermediate to long-term. Within the untreated or outfield area for the development of clinically significant cancer. In the short term, this out-field cancer focus likely represents selection failure but in the intermediate-to-long-term, this may mean de novo cancer. Gene selection was based on the genetic pathway significance in prostate carcinogenesis and our previous experience on PCa biomarker research. DNA methylation changes of selected genes were analyzed by quantitative means in tumor foci and perifocal prostate tissue in comparison to normal prostate tissue in PCa cases with mpMRI-diagnosed PCa. Therefore, we undertake to determine the safe area of focal therapy (10–20 mm), to evaluate which area needs to be affected to obtain long-term good results, believing that

hypermethylation in the cancerization field is important in the progression of PCa.

#### Aim of the thesis

- This study aimed to prove the high accuracy of mpMRI/US-guided targeted prostate biopsy for the detection of clinically significant PCa and demonstrate that adapted systematic biopsy (AdSB) does not provide additional benefit for the detection of clinically significant PCa.
- This study was initiated to better understand the field cancerization effect next to PCa index lesions and to evaluate the DNA methylation extent of target tumor suppressor genes in perifocal tissue on mpMRI-nonvisible PCa and compare it to the normal prostate tissue and mpMRI visible PCa.
- Therefore, we undertake to determine the safe area of focal therapy (10–20 mm), to evaluate which area needs to be affected to obtain long-term good results, believing that hypermethylation in the cancerization field is important in the progression of PCa.

#### Objectives of the thesis

1. To determine the sensitivity and specificity of mpMRI/US-guided targeted prostate biopsy for the detection of clinically significant PCa by transperineal prostate biopsy method.
2. Comparison of prostate cancer detection rate in MRI/US fusion guided targeted prostate biopsy with systematic prostate biopsy.
3. Investigate the possibility of specifying the local spread of the disease by determining the epigenetic field effect around the cancer focus:
  - a. To evaluate the methylation of *RASSF1*, *GSTP1*, *RARB* and *APC* genes in prostate biopsies taken from MRI-detected cancer foci and 10 and 20 mm from the focus edge.
  - b. To study the correlation of mpMRI images with hypermethylation of the aforementioned genes.
4. To compare epigenetic changes in patients with clinically significant prostate cancer detected by mpMRI and to determine correlations with clinical diagnostic indicators PSA, PSAD, and others.

## Novelty and practical significance of the thesis

This study investigated the specificity and sensitivity of mpMRI/US-guided targeted prostate biopsy for the detection of clinically significant prostate cancer. Based on the results of this study, clinical practice could reduce the detection rate of clinically insignificant prostate cancer by completely abandoning systematic prostate biopsy and replacing it with adaptive MRI/US-guided prostate biopsy. This would allow a reduction in overdiagnosis and associated adverse outcomes and maintain the same frequency of detection of clinically significant prostate cancer. The study also allowed us to evaluate the possibility of improving the prognostic value of MRI by predicting the risk of cancer progression, selecting treatment tactics, or performing active surveillance.

Our study showed that the level of DNA methylation of all investigated genes was statistically significantly higher in mpMRI-recorded foci than in perifocal samples, and that hypermethylation decreased significantly when it reached a distance  $> 10$  mm from the tumor focus. Therefore, we can conclude that a safe distance from the tumor focus is at least 10 mm, and in clinical practice, focal hemiablation of the prostate would be considered as a radical treatment option for intermediate-risk prostate cancer. Noninvasive urine tests are very valuable for follow-up of patients after prostate cancer treatment, but larger prospective studies are needed.

### Statements to be defended

1. The methods currently used in clinical practice to diagnose prostate cancer do not have sufficient sensitivity and specificity to detect clinically significant prostate cancer.
2. Currently, there is a lack of scientific evidence on whether it is sufficient to perform only an targeted prostate biopsy in primary patients based on the results of the mpMRI study or whether a systematic prostate biopsy should be performed for this reason.
3. The methylation frequencies of the promoters of the genes *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*, and *APC* differ reliably in normal prostate tissue, prostate cancer, and the zone around prostate cancer tissue (carcinization field), making them useful for PV diagnosis and treatment area selection.
4. Urine-detected gene *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*, and *APC* gene promoter methylation can be used in combination with mpMRI to assess PV aggressiveness and risk group.

## MATERIAL AND METHODS

The study was approved by the Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee 2019-11-05 (No. 2019/11-166-654. The permit was issued until 2022-11-01). 2022-10-27 Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee extended the permit until 2023-11-01. No. 2020-LP-68. Patients who were treated at the Centre of Oncurology of National Cancer Institute, met inclusion criteria and did not have any exclusion criteria were included into the study. Molecular analysis was performed at the Laboratory of Genetic Diagnostic of NCI. A pathological examination was performed at the National Center of Pathology, Affiliate of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos.

### Inclusion criteria

- mpMRI with lesions by (PI-RADS v2.1) score equal to or greater than 3;
- Age > 18 years;
- Elevated or rising PSA (PSA > 2.5 ng/mL (ages 30–50) or PSA > 4.0 in ages 50–79);
- Suspicious DRE;
- After signing the informed consent form document,
- It is planned to perform the initial biopsy or a repeat biopsy when the information about the previous biopsy results is insufficient to predict the treatment strategy.

### Exclusion criteria

- Age < 18 years or >80 years;
- Current treatment of prostate cancer (radiotherapy, antiandrogen therapy, brachytherapy, HIFU);
- Previous treatment for prostate cancer
- Any contraindication to the standard TRUG prostate biopsy procedure;
- Refusing to sign an informed consent document;
- Men without prostate mpMRI;
- mpMRI with lesions by (PI-RADS v2.1) score equal to 2 or less than 2;



## Patients and Samples

All patients who underwent primary mpMRI/US-targeted prostate biopsy for suspected localized PCa at the National Cancer Institute (Lithuania) between November 2019 and February 2022 were included in the study. The Regional Bioethics Committee approved the study (No. 2019/11-166-654 and 2020-LP-68), and informed consent was obtained from all participants. All 1.5T and 3T mpMRI scans have been performed in the same institution according to the standardized protocol, while external images have been re-evaluated pre-operatively.

The PI-RADSv2.1 scoring system was used to report mpMRI results. Contouring of the prostate margins and target lesions was performed by two experienced radiologists using the transverse T2 TSE images. The mpMRI/US biopsies have been performed with the “BioJet” fusion system (D&K Technologies, Barum, Germany) using the transperineal approach by a single interventional radiologist. Furthermore, we used this technique that avoids rectal wall puncturing, which leads to a near-zero risk of infection. For all patients, a prostate biopsy was performed under general anesthesia. Only 1 g of Cefazolin was used during the procedure for the prevention of UTI, based on the findings of a literature meta-analysis.

For all patients, lesion-targeted and systematic biopsies have been performed. Lesion targeted biopsy 2-4 cores have been taken from each PI-RADS 3-5 lesion, followed by a systemic 12-core biopsy ignoring index lesions. Thus, the median number of cores taken from the lesions by the targeted prostate biopsy was 4 (DS = 1.68), while 12 cores in median (SD = 4.8) were taken during systematic sampling. In general, the median number of biopsy cores performed at one procedure was 16 (SD = 4.5). Slight biopsy variations were allowed in large-size prostates and/or large-size target lesions. All biopsy samples have been evaluated by urological pathologists from the National Center of Pathology (Lithuania) and reported according to the EAU recommendations. Clinically significant PCa was defined as ISUP grade group  $\geq 2$  detected at any biopsy core.

T2 mpMRI scans have been performed in the same institution and the PI-RADSv2.1 scoring system was used to report mpMRI results.<sup>3</sup> Contouring of the prostate margins and target lesions was performed by two experienced radiologists using the transverse T2 TSE images. The targeted prostate biopsies have been performed with the “BioJet” fusion system (D&K Technologies) using the transperineal approach by a single interventional radiologist. For all patients, lesion-targeted and systematic biopsies have been

performed and every core taken was documented in three dimensions and registered to the mpMRI protocol (Figure 1).

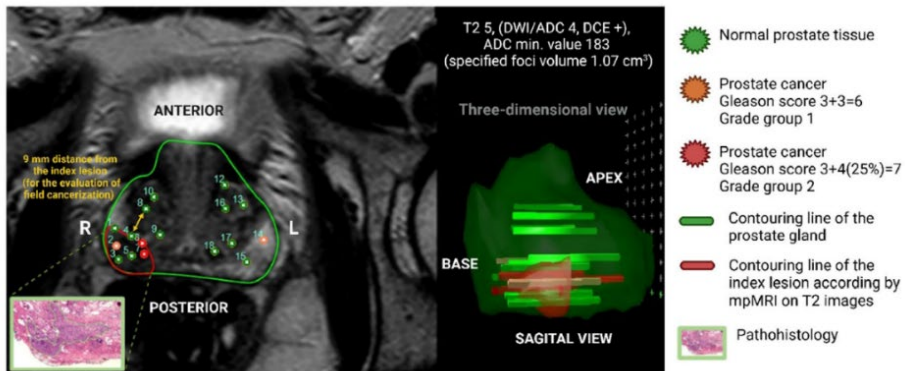


Fig. 1 A three-dimensional picture of prostate gland multiparametric magnetic resonance imaging (mpMRI) after prostate biopsy with mapping of histopathology. Original image modified by BioRender.com. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Lesion-targeted biopsy of two to four cores have been taken from each PI-RADS three to five lesion, followed by a systemic 12-core biopsy ignoring index lesions, and additional four biopsy cores were taken from distinct range 10 and 20mm from the index lesion for DNA methylation analyses. Four tissue specimens were collected for each patient using a 22mm automatic punching device: two samples from index lesions, one from perifocal 10mm away tissue, and another one (control sample)—20mm away from index lesion; 20mm away from the focus were obtained from another lobe of the prostate (Figure 2).

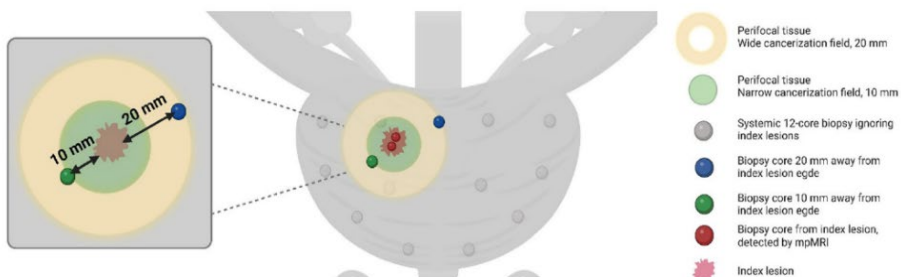


Fig. 2 Prostate biopsy technique and field cancerization scheme. Created with BioRender.com. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

All biopsy samples and RP specimens have been evaluated by dedicated uropathologists (D. D.) from the National Center of Pathology (Vilnius, Lithuania) and reported according to the The European Association of Urology recommendations.<sup>17</sup> Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) prostate tissues, after accurate histological evaluation, were sent to the National Cancer Institute, Laboratory of Genetic Diagnostics in Vilnius, Lithuania for DNA purification procedure and further genetic analysis. The RP specimen was fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 h. After fixation tissue was serially sectioned at 3–5mm intervals into perpendicular sections (about 4mm thick). Sections were dehydrated and embedded in paraffin wax. Hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections (5 μm thick) were produced for microscopic evaluation using whole slide images. Whole-mount histopathology (Figure 3) of RP specimens was evaluated and compared with mpMRI images in the same slices.<sup>18</sup> This technique was used to specify the location of prostate biopsies and to precisely evaluate the distances of the perifocal field biopsies from the index lesion to perform a qualitative analysis of hypermethylated genes.

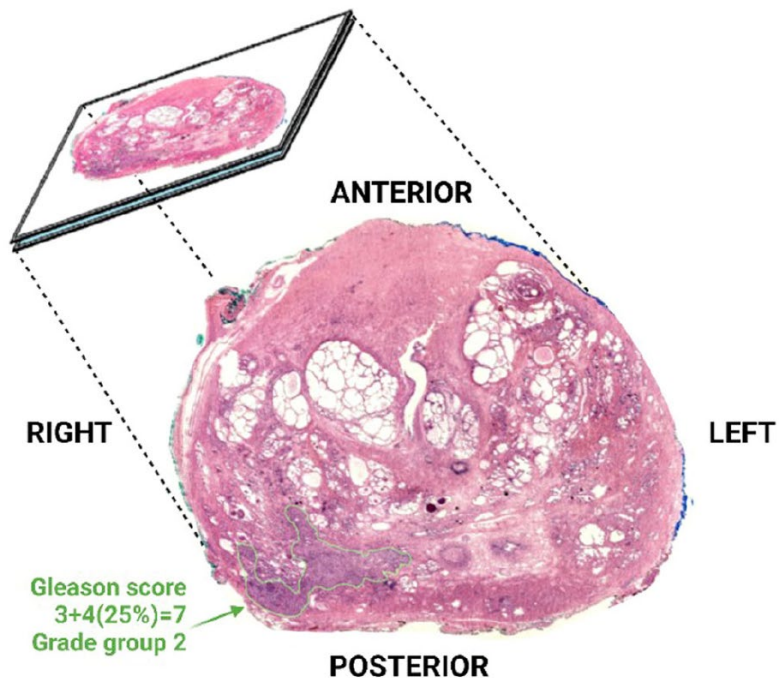


Fig. 3 Whole-mount prostate histopathology image.

Prostate moderately differentiated (*Gleason* 3 + 4(25%) = 7, Grade Group 2) acinic adenocarcinoma (with intraductal spread). Original image modified by BioRender.com. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### DNA extraction and bisulfite conversion

FFPE prostate tissues were pretreated with 1 mL of xylene (Carl Roth) for 10 min at 55°C twice. Xylene was removed from the samples by incubating them with 1 mL of ≥96% ethanol at 55°C for 10 min. Samples were further treated with 25 µL of proteinase K (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific) for 18 h at 55°C and 500 µL of lysis buffer, consisting of 50 mM Tris–HCl pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.5% Tween-20 (all from Carl Roth). All voided urine samples (n = 272) were prepared and further processed according to the standard protocol.<sup>13</sup> For DNA extraction from urine sediment samples lysis buffer consisting of 10 mM Tris–HCl pH 8.0, 1% Sodium dodecyl sulfate, and 75 mM NaCl (all from Carl Roth) was used. DNA was extracted using standard phenolchloroform purification and ethanol precipitation method. For qualitative DNA methylation analysis, up to 400 ng of purified DNA were modified with bisulfite, using EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's protocol, except that the initial incubation of samples was performed at 42°C for 15 min, instead of 37°C.

### Quantitative DNA methylation-specific PCR (qMSP)

The qMSP primers and probes specific for methylated DNA for genes *RARB*, and *GSTP1* were designed using Methyl Primer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) and ordered from Metabion. Primer sequences for *APC*, *RASSF1*, and *ACTB* were obtained from previous publications<sup>19,20</sup> (Supporting Information: 1). *ACTB* was used in each run for the normalization of the DNA input. The qMSP was performed in triplicates for each set of primers in separate wells. The reaction mix (20 µL in total) consisted of 1× TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems™), 300 nM of each primer, 50 nM of the probe, and ~ 10 ng of bisulfite-converted DNA. All assays were carried out under the following conditions: 95°C for 10 min followed by 45–50 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, using QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Only those runs where no-template control (NTC) gave no amplification products, and artificially methylated control (MC) gave a positive signal were considered valid. The backgroundbased threshold algorithm was applied for the estimation of the cycle of quantification (Cq)

value. The methylation level of a particular gene was estimated based on the  $\Delta\Delta Cq$  algorithm and expressed as a percentage of the MC.

### Statistical analysis

In our study, descriptive statistics were used to outline main patient characteristics (age, PSA, PSA density (PSAD), prostate volume, and mpMRI findings). According to the PI-RADS score, all patients were divided into two groups: clinically significant cancer with ISUP  $\geq 2$  with a PI-RADS score  $\geq 3$  and clinically insignificant PCa. Unpaired t-tests were used to assess the differences between these groups, and values were given as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), and positive predictive value (PPV) of mpMRI/US-guided biopsy in diagnosing clinically significant PCa (ISUP  $\geq 2$ ) with a PI-RADS score  $\geq 3$  were evaluated with providing supremacy to the dominant lesion in each patient. P-value was calculated as the probability that the observed sample area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve is found when, in fact, the true area under the ROC curve is 0.5 (null hypothesis: area = 0.5). The significance level of  $p < 0.05$  was used for the evaluation of statistical hypotheses. The combined histological results of MRI/US-guided and 12-core systematic biopsy cores were used as a reference. All statistical tests were performed using SPSS 28.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Statistical analysis and data visualization of the genetic part of the study were performed with MedCalc® v12.7 software (MedCalc Software) and GraphPad Prism v8.0.1 software (GraphPad Software, Inc.). The Mann–Whitney U test was used for two-group comparisons of continuous data. The ability of the biomarkers to distinguish groups was evaluated by performing receiver operating characteristic (ROC) curve analysis and estimating the area under the curve (AUC) values. A p-value of  $<0.050$  was considered significant.

### Author's contributions

- Augustinas Matulevičius (doctoral student) enrolled the patients into the study, collected all the clinical data and was responsible for follow-up. The doctoral student participated in MDK discussions and selected patients for the study. Also analysed the results. Augustinas Matulevičius was the main author of the two first publication and presented the results of the study at scientific congresses.

- All targeted prostate biopsy was performed by MD, PhD. Mantas Trakymas.
- All mpMRI images was evaluated and contoured before prostate biopsy by Ieva Naruševičiūtė.
- MD, PhD Arnas Bakavičius analysed the results and participated in the preparation of the first manuscript.
- Molecular analysis of other biological samples was performed by Kristina Žukauskaitė. Kristina Žukauskaitė also analysed the results and participated in the preparation of the second manuscript.
- Aistė Gerulaitytė (National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania) technically assisted with DNA extraction and performed with qMSP analysis.
- All biopsy samples and RP specimens have been evaluated by dedicated uropathologists Darius Dasevičius from the National Center of Pathology.
- MD, PhD. Albert Ulys was responsible for collecting patients and inviting them to participate in the clinical trial.
- Prof. Sonata Jarmalaitė was the academic consultant who supervised the analysis of biological samples as well as revised the manuscripts critically for important intellectual content.
- Prof. Feliksas Jankevičius was the academic supervisor who designed the research, supervised clinical part of the study and revised the manuscripts critically for important intellectual content.

## RESULTS

### Comparison of Diagnostic Values of Targeted and Systematic Prostate Biopsies

In total, 283 patients have been included in the study (17 cases were excluded due to the clinical and anatomical reasons; data of these cases are not shown). Clinical and radiological characteristics of the study cohort are provided in Table 1.

Table 1. Clinical and radiological characteristics of the study cohort. PSA—prostate-specific antigen, mpMRI—multi-parametric magnetic resonance imaging, ADC—apparent diffusion coefficient, ISUP— The International Society of Urological Pathology, GG—prostate cancer grade group.

Variable	Patients (n=283)	
Age, years	Mean	63.59
	SD	7.41
PSA, ng/mL	Mean	7.67
	SD	5.89
PSA density, ng/mL/cc	Mean	0.19
	SD	0.49
Prostate volume, mL	Mean	50.84
	SD	23.18
mpMRI targets quantity, <i>n</i>	Mean	1.51
	SD	0.65
mpMRI target volume, mL	Mean	1.21
	SD	1.96
mpMRI ADC av. value $\mu\text{m}^2/\text{s}$	Mean	634.56
	SD	204.85
PI-RADS V2.1 score, <i>n</i> (%)	3	11 (3.9 %)
	4	190 (67.1 %)
	5	82 (29.0 %)
ISUP grade group, <i>n</i> (%)	No PCa	56 (19.8 %)
	GG1	130 (45.9 %)
	GG2	62 (21.9 %)
	GG3	28 (9.9%)
	GG4	7 (2.5 %)

The overall detection rate of PCa in the cohort was 80.21% (227/283), while targeted MRI/US-guided biopsy and adapted systematic biopsy detected Pca in 74.56% (211/283) and 48.76% (138/283) of patients ( $p < 0.001$ ), respectively.

The clinically significant disease was detected in 34.28% (97/283) of patients undergoing prostate biopsy. The detection rate of clinically significant disease by targeted MRI/US-guided biopsy was 34.28% (97/283), which accounted for 45.97% (97/211) of all PCa diagnoses. Meanwhile, the detection rate of clinically significant disease after AdSB was significantly lower (8.48%; 24/283;  $p < 0.001$ ), which accounted just for a small number 17.39%; 24/138) of all PCa cases in comparison to targeted methodology only (17.39% vs. 45.97%;  $p < 0.001$  Figure 4).

Among patients with clinically significant PCa detected by targeted prostate biopsy ( $n = 97$ ), AdSB reconfirmed clinically significant PCa diagnosis just for 24.74% ( $n = 24$ ) of patients. In patients for whom no clinically significant PCa was detected by targeted biopsy, also, no clinically significant cancer was detected by AdSB. AdSB identified 16 additional cases of clinically insignificant PCa for patients with no signs of cancer on targeted prostate biopsy.

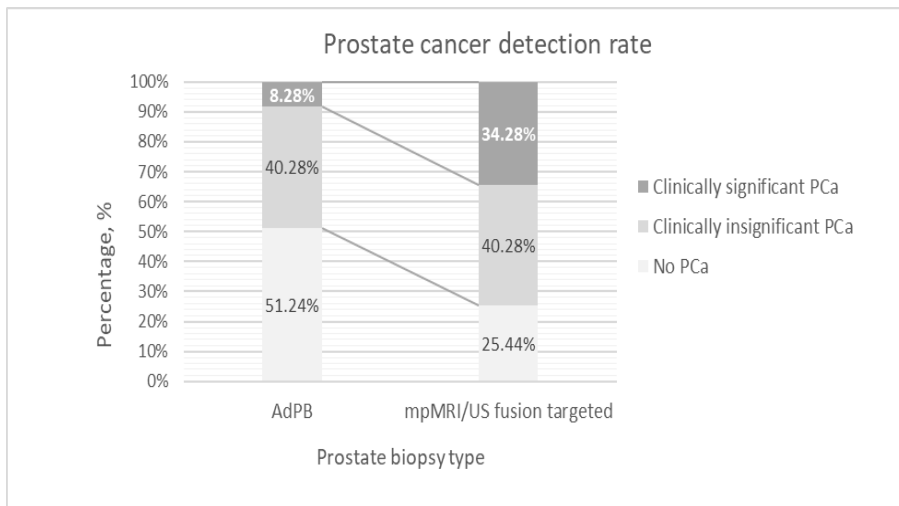


Fig. 4. The comparison of diagnostic value of targeted and systematic prostate biopsy ( $n = 283$ ). AdPB—12-core systematic biopsy ignoring index lesions, mpMRI/US fusion targeted prostate biopsy.

Based on the PI-RADS v2.1 system, the detection rate of clinically significant disease after the targeted prostate biopsy was dependent on PI-



RADS's group and was predominant among cases with PI-RADS 5 (PI-RADS 3 vs. PI-RADS 4 vs. PI-RADS 5, while  $p < 0.001$ ; Figure 5). Meanwhile, the results of AdSB showed no associations with PI-RADS scores of mpMRI (PI-RADS-3 0.00% vs. PI-RADS-4 7.92% vs. PI-RADS-5 11.00%,  $p = 0.415$ ).

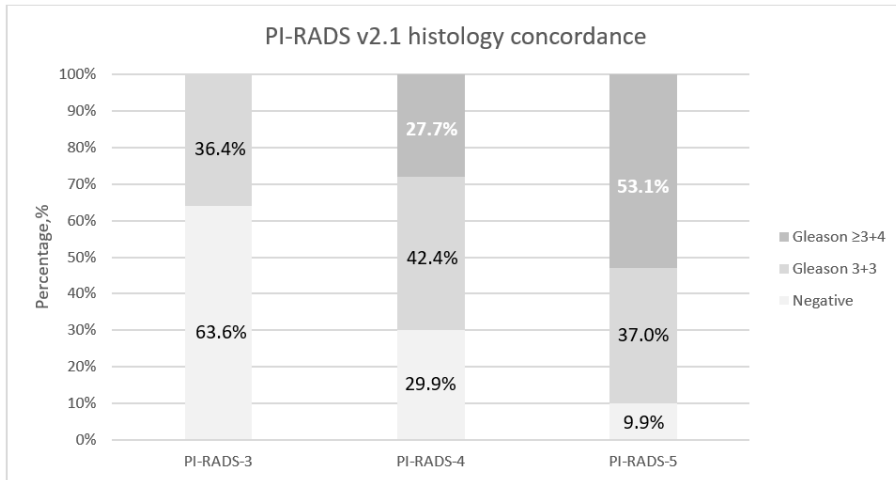


Fig. 5. Concordance between PI-RADS v2.1 category and histology after targeted biopsy. Note— statistically significant association between the proportion of clinically significant lesions (*Gleason* 3 + 4 or higher) for each category of PI-RADS v2.1 ( $p < 0.001$ ,  $n = 283$ ).

ISUP grade group score was also predominantly higher in the PI-RADS 5 group as compared to PI-RADS 4 and PIRADS 3 groups, and the results are shown in Table 2.

Table 2. Different prostate cancer grade group detection rates according to PI-RADS scores. GG— prostate cancer grade group.

	PI-RADS-3		PI-RADS-4		PI-RADS-5		Total, n=283	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
No PCa	7	63.63	57	30.00	8	9.76	72	25.44
GG1	4	36.37	80	42.10	30	36.59	114	40.28
GG2	0	0.0	35	18.42	27	32.92	62	21.90
GG3	0	0.0	16	8.42	12	14.63	28	9.89
GG4	0	0.0	2	1.05	5	6.10	7	2.47
Total	11	100	190	100	82	100	283	100
$p < 0.001$								
PI-RADS v2.1 - prostate imaging reporting and data system version 2.1								

When using a PI-RADS v2.1 score  $\geq 4$  as a positive test result to detect ISUP  $\geq 2$  PCa, the sensitivity and specificity of MRI/US-targeted biopsy reached 35.56% and 92.31% with a Youden-selected cut-off value of PI-

RADS v2.1  $\geq 4$  (area under the curve (AUC) = 0.639 (95% confidence interval (CI): 0.6–0.7) Figure 6). NPV of MRI/US-targeted biopsy was 7.02% (95% CI: 3.792–11.677), while PPV was 98.88% (95% CI: 94.22–99.96,  $p = 0.0007$ ).

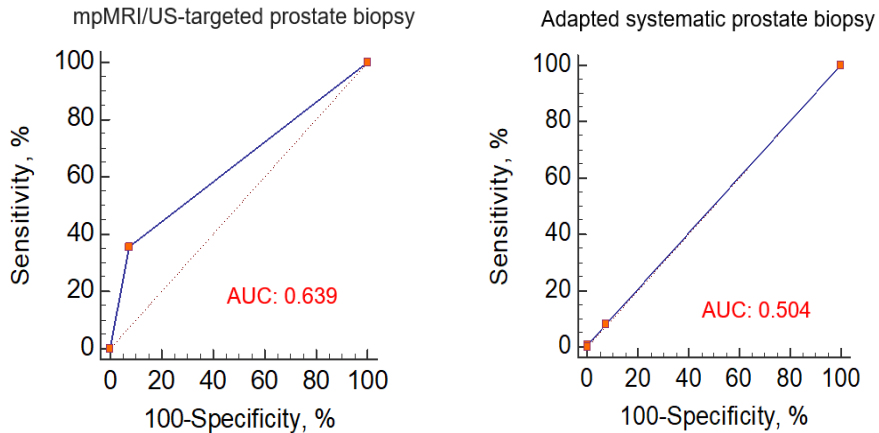


Fig. 6. Sensitivity and specificity of targeted and systematic biopsy in diagnosing ISUP  $\geq 2$  prostate cancer by (a) mpMRI/US-targeted prostate biopsy; (b) Adapted systematic prostate biopsy. AUC— Area Under the Curve.

Using the same approach, the sensitivity and specificity of AdSB group were 8.52% and 92.31%, respectively, with a Youden-selected cut-off value of PI-RADS v2.1  $\geq 4$  (AUC = 0.504; 95% CI: 0.6–0.7 Figure 3). The NPV of the method was 5.04% (95% CI: 2.717–8.459), and PPV was 95.47% (95% CI: 78.33–99.85;  $p = 0.910$ ).

#### Associations with Clinical and Radiological Variables

Statistical analysis revealed that the patients with clinically significant PCa were significantly older (65.08 (SD = 7.24) vs. 62.82 (SD = 7.4) years,  $p = 0.007$ ) and harbored significantly lower prostate volume (44.25 (SD = 17.83) vs. 54.27 (SD = 24.89), mL,  $p < 0.001$ ) as compared to cases with the clinically insignificant disease. No significant difference was identified in PSA, PSA density level, and target lesion size between targeted and

systematic biopsy groups (all  $p > 0.05$ ). Most cases with clinically significant disease 54.64% (53/97) were detected by the first targeted core, while the second and third targeted samples detected an extra 16.49% (16/97) and 28.87% (28/97) of cases, respectively. For 78.95% of patients with additional biopsies, the regions of interest (ROI) were greater than 0.5 cm<sup>3</sup> or 8 mm in diameter. According to mpMRI, the most common ROIs were in the peripheral zone of the prostate (66.10%), followed by the transition zone (27.51%) and fibromuscular stroma (6.39%). There were no statistically significant differences between clinically relevant and non-significant PCa detection rates using target and AdSB, depending on lesion location on mpMRI.

### Epigenetic Biomarkers in FFPE Tissue Samples

To evaluate the field cancerization extent, DNA methylation level in the *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*, and *APC* genes was analyzed in biopsy sample from PCa index lesion ( $n = 83$ ), perifocal tissue ( $n = 80$ ) and control non-cancerous tissue ( $n = 39$ ) from 44 patients. All patients included in this study underwent MRI/UG image-guided prostate biopsy.

Quantitative analysis revealed that the DNA methylation level of all studied genes was statistically significantly higher in the index lesion compared to the perifocal samples 10 mm distant from the index lesion (all  $p < 0.0001$ ; Figure 7). Moreover, non-cancerous tissues taken 20 mm away from the index lesion showed even lower levels of DNA methylation as compared to perifocal samples or the samples from the index lesion.

On average, the level of *RARB* methylation in index lesions was 6 times higher compared to perifocal tissue and 13 times higher than non-cancerous tissue. The average level of *RASSF1* methylation in index lesions was 13 times higher compared to perifocal tissue and 23 times higher than in non-cancerous tissue. The average methylation level of *GSTP1* and *APC* in the index lesion compared to perifocal tissue was 60 and 21 times higher, respectively. The average methylation level of *GSTP1* was 234 times higher than in non-cancerous tissue, while *APC* methylation in non-cancerous tissue was not detected at all. This shows the accuracy of MRI/UG image-guided prostate biopsy in identifying index lesions and the safety of focal PCa therapy considering the spread of PCa cells beyond the PCa foci.

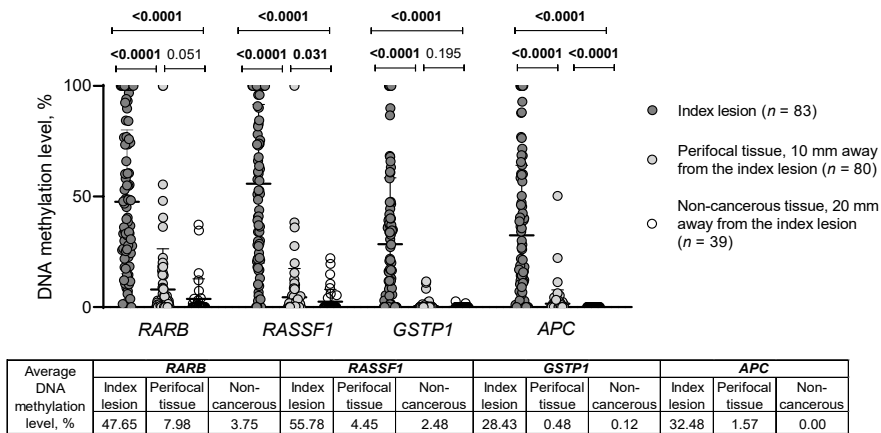


Fig. 7 DNA methylation levels of the regulatory regions of *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*, and *APC* genes in FFPE prostate tissue samples according to their histology. Lines indicate a median with 95% confidence intervals. The table shows the average level of DNA methylation in index lesions, 10 mm away from them in perifocal tissue samples, and in non-cancerous tissue samples, 20 mm away from the index lesion.

To gather further insights about the spread of epigenetic changes in prostate tissue, heatmap analysis was performed which allowed us to map DNA methylation marks of each sample (Figure 8). In some of the cases (B20-19937, B20-26292, B20-33989, B20-5479, B20-36740, B20-33707, B20-20740) quite extensive DNA methylation was observed in perifocal samples, and even in non-cancerous samples (B20-33707, B21-3263, B20-20740). In most of the cases with two samples from index lesion involved in analysis ( $n = 34$ ) the extent of epigenetic alterations was rather uniform, but in a few cases (B20-20740; B20-33707; B20-36740; B20-2088; B20-33989, B20-7272) some disagreement was noted.

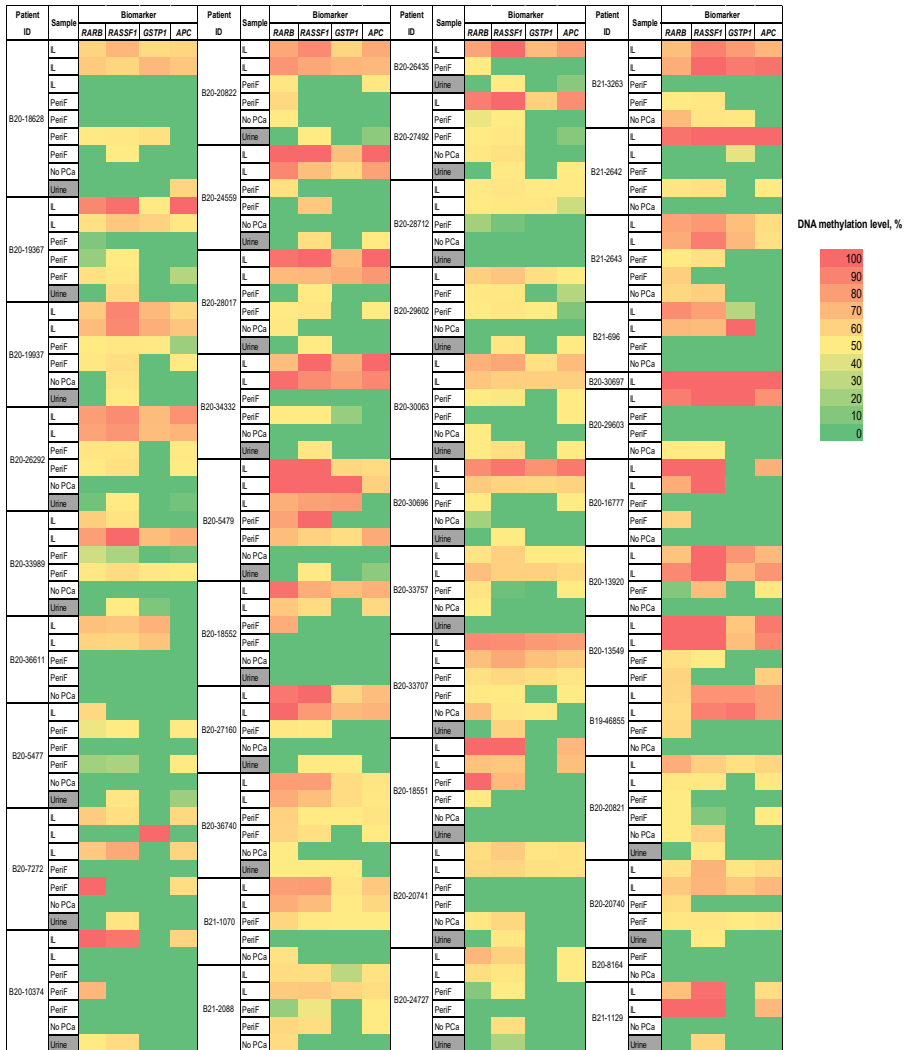


Fig. 8 Heatmap analysis of biomarkers, distinguishing between prostate cancer index lesions (IL), perifocal tissue samples (PeriF), and non-cancerous prostate tissue (No PCa). It represents the average DNA methylation levels of each gene in the sample

Discrepant cases were additionally checked by the pathologist and radiologist. B20-20740 and B20-2088 cases showed high *RARB*, *GSTP1*, *APC*, and *RASSF1* DNA methylation levels in the PeriF samples (Supplementary Material 2). The distance from index lesion was corrected and the actual distance was 6 mm and 5 mm accordingly, instead of 10 mm. B20-

33707 case also showed high *RARB*, *GSTP1*, *APC*, and *RASSF1* DNA methylation levels in PeriF samples and according to pathologist opinion this sample contained some GG1 prostate adenocarcinoma cells, that possibly impacted epigenetic findings. This field cancerization is invisible on mpMRI images, but detectable by genetic screening. According to the final pathology protocol (*Gleason* 3+4(5%)=7, Grade Group 2) acinic adenocarcinoma of the prostate, pT3a (extra prostatic spread 6 mm long on the right)), high methylation levels could be related to the large volumes of locally advanced disease. Similar situation was with the B20-33989 case. While the B20-36740 case also showed high *RARB*, *GSTP1*, *APC*, and *RASSF1* DNA methylation levels in PeriF samples, and this sample has High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia diagnosis by histology protocol and the distance from the index lesion was 6 mm. Of interest, the B20-7272 case had the low methylation level in all studied genes, instead of *GSTP1*, at the sample from index lesion, even though it was the (*Gleason* 3+3=6 / Grade group 1) acinic adenocarcinoma of the prostate, 30% (4.0 mm).

After this additional assessment it is apparent that the shorter distance from the index lesion, the greater hypermethylation intensity in histologically normal prostate tissue. It means that hypermethylation is proportional to the distance from the index lesion, which is also observed in control samples. Also, high methylation levels could be related to larger volumes of locally advanced disease or the presence of GG1 PCa, which is invisible on mpMRI images.

### Characteristics of Diagnostic Tool

For the selection of the most appropriate biomarkers for molecular diagnostics of PCa and evaluation of field cancerization extent, the ROC curve analysis was performed. When the index lesion was compared with non-cancerous tissues, the highest sensitivity and specificity were reached by analyzing *RARB*, *GSTP1* & *APC* (AUC = 0.98;  $p < 0.0001$ ), and *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1* & *APC* (AUC = 0.98;  $p < 0.0001$ ) biomarker combinations (Figure 9, Table 3). When assessing the diagnostic potential of each of the studied genes, the gene *RASSF1* had the highest sensitivity and specificity (AUC = 0.94;  $p < 0.0001$ ).

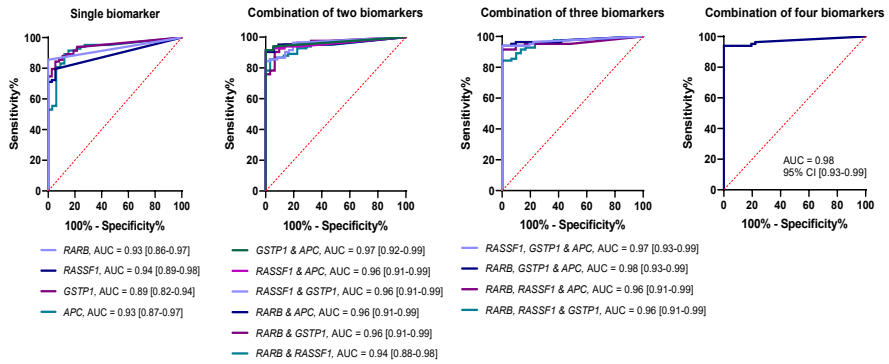


Fig. 9 Analysis of ROC curves for single biomarkers and combinations of two to four biomarkers, distinguishing between prostate cancer index lesions and non-cancerous tissue samples. The 95% confidence interval is indicated in the brackets, AUC – Area Under the Curve

Table 3. Analysis of ROC curves for single biomarkers and combinations of two to four biomarkers in distinguishing between prostate cancer index lesions and non-cancerous tissue samples. AUC – Area Under the Curve, CI – Confidence Interval, ACV – Associated Criterion Value, PPV – Positive Predictive Value, NPV – Negative Predictive Value

Biomarker	AUC	95% CI	<i>p</i> -value	Specificity, %	Sensitivity, %	Youden index <i>J</i>	ACV	PPV, %	NPV, %
Single biomarker									
<i>RARB</i>	0.93	0.86-0.97	<0.0001	87.88	89.16	0.77	>7.40	93.99	79.23
<i>RASSF1</i>	0.94	0.89-0.98	<0.0001	94.59	84.34	0.79	>14.90	97.07	73.98
<i>GSTP1</i>	0.89	0.82-0.94	<0.0001	94.59	79.52	0.74	>0	96.90	68.49
<i>APC</i>	0.93	0.87-0.97	<0.0001	100	85.54	0.86	>0	100	76.50
The panel of two biomarkers									
<i>RARB &amp; RASSF1</i>	0.94	0.88-0.98	<0.0001	96.77	85.54	0.82	>0.76	98.25	75.90
<i>RARB &amp; GSTP1</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	93.55	90.36	0.84	>0.48	96.75	82.04
<i>RARB &amp; APC</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	90.36	0.90	>0.75	100	83.00
<i>RASSF1 &amp; GSTP1</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	84.34	0.84	>0.72	100	75.03
<i>RASSF1 &amp; APC</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	91.57	0.92	>0.53	91.57	84.81
<i>GSTP1 &amp; APC</i>	0.97	0.92-0.99	<0.0001	100	91.57	0.92	>0.23	91.57	84.81



Biomarker	AUC	95% CI	<i>p</i> -value	Specificity, %	Sensitivity, %	Youden index <i>J</i>	ACV	PPV, %	NPV, %
The panel of three biomarkers									
<i>RARB, RASSF1 &amp; GSTP1</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	84.34	0.84	>0.83	100	75.03
<i>RARB, RASSF1 &amp; APC</i>	0.96	0.91-0.99	<0.0001	100	91.57	0.92	>0.55	100	84.81
<i>RARB, GSTP1 &amp; APC</i>	0.98	0.93-0.99	<0.0001	100	93.98	0.94	>0.60	100	88.66
<i>RASSF1, GSTP1 &amp; APC</i>	0.97	0.93-0.99	<0.0001	100	93.98	0.94	>0.31	100	88.66
The panel of four biomarkers									
<i>RARB, RASSF1, GSTP1 &amp; APC</i>	0.98	0.93-0.99	<0.0001	100	93.98	0.94	>0.46	100	88.66

Similarly, when PCa index lesions were compared with perifocal tissues, *RARB* & *GSTP1* and *RASSF1* & *GSTP1* (both AUC = 0.94;  $p < 0.0001$ ) combinations had the largest area under the curve (Figure 10, Table 4). The same AUC (AUC = 0.94;  $p < 0.0001$ ) was reached with three (*RARB*, *RASSF1* & *GSTP1*, and *RARB*, *GSTP1* & *APC*, and *RASSF1*, *GSTP1* & *APC*) or all four-biomarker panel. As previously, the gene *RASSF1* had the highest sensitivity and specificity (AUC = 0.92;  $p < 0.0001$ ) as a single biomarker of PCa.

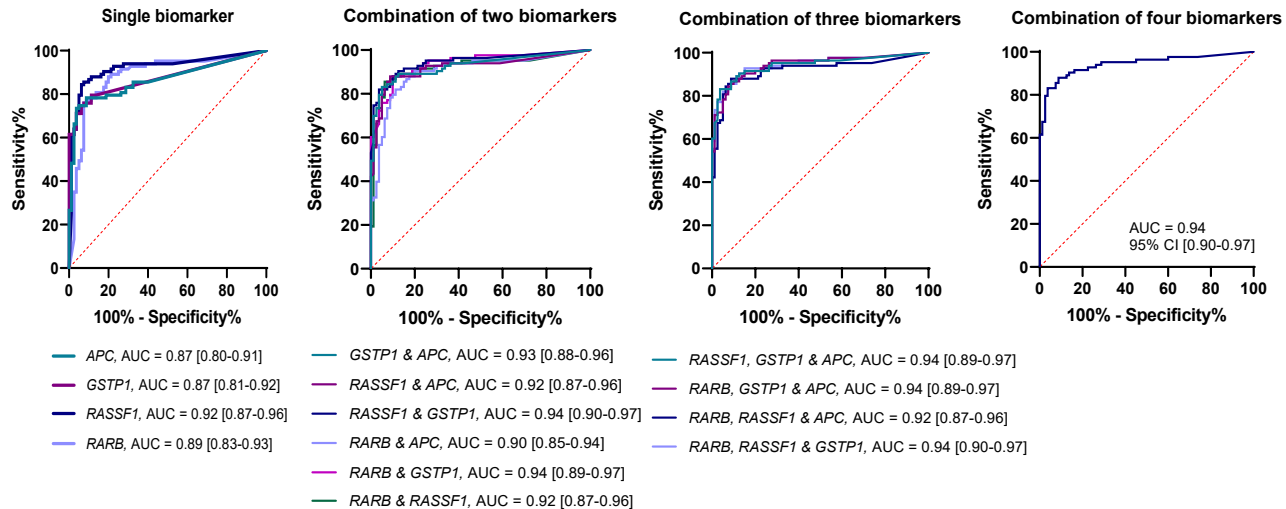


Fig. 10 Analysis of ROC curves for single biomarkers and combinations of two to four biomarkers, distinguishing between prostate cancer index lesions and perifocal tissue samples. The 95% confidence interval is indicated in the brackets, AUC – Area Under the Curve

Table 4 Analysis of ROC curves for single biomarkers and combinations of two to four biomarkers in distinguishing between prostate cancer index lesions and perifocal tissue samples. AUC – Area Under the Curve, CI – Confidence Interval, ACV – Associated Criterion Value, PPV – Positive Predictive Value, NPV – Negative Predictive Value

Biomarker	AUC	95% CI	<i>p</i> -value	Specificity, %	Sensitivity, %	Youden index <i>J</i>	ACV	PPV, %	NPV, %
<b>Single biomarker</b>									
<i>RARB</i>	0.89	0.83-0.93	<0.0001	92.50	75.90	0.68	>22.26	91.33	78.67
<i>RASSF1</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	93.75	84.34	0.78	>15.44	93.35	85.19
<i>GSTPI</i>	0.87	0.81-0.92	<0.0001	93.75	74.70	0.68	>1.32	92.56	78.07
<i>APC</i>	0.87	0.80-0.91	<0.0001	96.25	73.49	0.70	>6.28	95.33	77.72
<b>The panel of two biomarkers</b>									
<i>RARB &amp; RASSF1</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	93.75	85.54	0.79	>0.41	93.44	86.17
<i>RARB &amp; GSTPI</i>	0.94	0.89-0.97	<0.0001	90.00	87.95	0.78	>0.27	90.16	87.77
<i>RARB &amp; APC</i>	0.90	0.85-0.94	<0.0001	88.75	81.93	0.71	>0.37	88.34	82.51
<i>RASSF1 &amp; GSTPI</i>	0.94	0.90-0.97	<0.0001	96.25	81.93	0.78	>0.56	95.79	83.65
<i>RASSF1 &amp; APC</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	91.25	87.95	0.79	>0.31	91.28	87.92
<i>GSTPI &amp; APC</i>	0.93	0.88-0.96	<0.0001	95.00	83.13	0.78	>0.40	94.54	84.40
<b>The panel of three biomarkers</b>									
<i>RARB, RASSF1 &amp; GSTPI</i>	0.94	0.90-0.97	<0.0001	92.50	85.54	0.78	>0.35	92.23	86.00
<i>RARB, RASSF1 &amp; APC</i>	0.92	0.87-0.96	<0.0001	91.25	87.95	0.79	>0.31	91.28	87.92
<i>RARB, GSTPI &amp; APC</i>	0.94	0.89-0.97	<0.0001	92.50	84.34	0.77	>0.41	92.13	85.02
<i>RASSF1, GSTPI &amp; APC</i>	0.94	0.89-0.97	<0.0001	96.25	83.13	0.79	>0.47	95.85	84.57
<b>The panel of four biomarkers</b>									
<i>RARB, RASSF1, GSTPI &amp; APC</i>	0.94	0.90-0.97	<0.0001	96.25	83.13	0.79	>0.56	95.85	84.57

## Epigenetic Biomarkers in Urine Sediments

Aiming at assessment of suitability of selected biomarkers for noninvasive detection of csPCa quantitative methylation analysis of genes *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*, and *APC* was performed by the qMSP method in urine samples of PCa patients with clinically significant ( $n = 71$ ), clinically insignificant ( $n = 97$ ) PCa, and patients without PCa ( $n = 104$ ). using urine samples. In this comparison all cases from the MRI/UG-guided biopsy cohort were included and compared to control group without PCa. Out of four genes involved in analysis only *GSTP1* promoter methylation level was able to discriminate PCa cases from controls ( $p = 0.0005$ ) and even the csPCa cases from the clinically insignificant cases ( $p = 0.029$ , Figure 11).

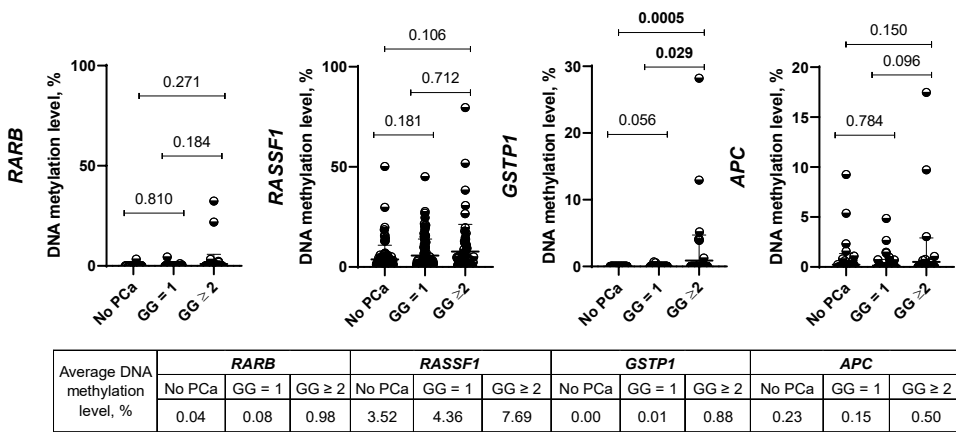


Fig. 11 DNA methylation level of regulatory regions of genes *RARB*, *RASSF1*, *GSTP1*, and *APC*, in DNA samples extracted from urine sediments. GG – grade group, PCa – prostate cancer. Lines indicate median with 95% confidence intervals.

Cell-free DNA methylation levels in urine were apparently lower than in tissue samples. However, despite the low DNA methylation levels in urine, all tested biomarkers showed the same tendency – the lowest methylation levels were detected in control group, and it was the highest in csPCa group ( $GG \geq 2$ ). The analysis of the characteristics of the potential urinary biomarkers showed that the combination of all four biomarkers with prostate-specific antigen (PSA) or PSA density (PSAD) in blood, significantly increases sensitivity and specificity in distinguishing csPCa from the control (non-cancerous) group (Figure 12). The combination of four-biomarker test with PSAD allowed the identification of csPCa with  $\geq 90\%$  sensitivity and specificity, showing a strong potential to use these noninvasive measures during follow-up the cases after focal therapy.

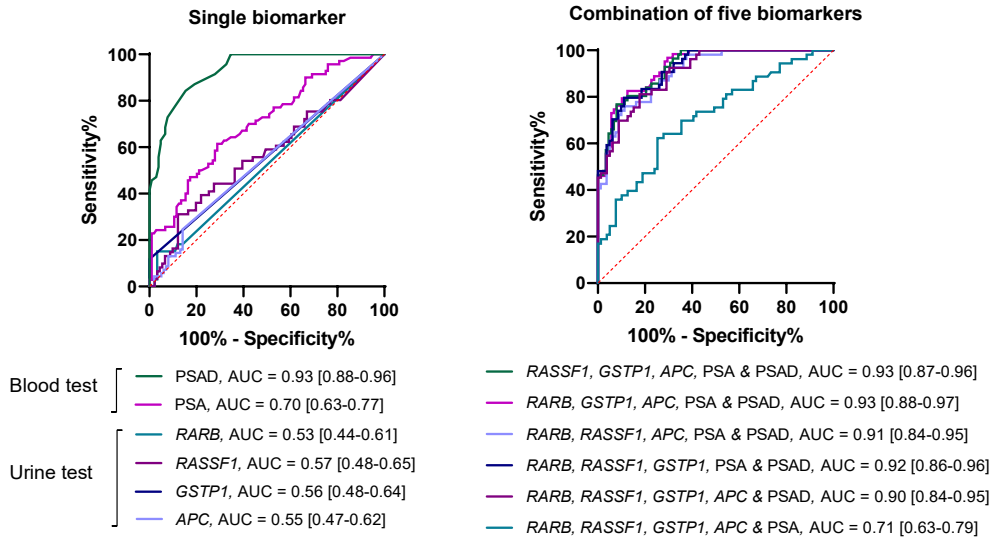


Fig. 12 Analysis of ROC curves for single biomarkers and combinations of five biomarkers, distinguishing between control group and clinically significant prostate cancer. The 95% confidence interval is indicated in the brackets, AUC – Area Under the Curve

## DISCUSSION

Systematic ultrasound-guided biopsy leads to sampling errors that delay the diagnosis of clinically significant PCa, overdiagnosis of clinically insignificant PCa, and misclassification of the disease. Based on literature data, it is known that the detection rate of clinically significant PCa in primary patients undergoing random systematic biopsy is only 23%. It is known that repeated biopsies give even worse results: secondary systematic biopsy—14% and third repeated biopsy—6% for clinically significant PCa detection. In this study, the clinically significant disease was detected in 34.28% of cases by targeted biopsy only; meanwhile, the detection rate of clinically significant disease after systematic biopsy only was just 8.48%. These results have essentially the same trend compared to the data reported in the literature. According to the PRECISION trial, men who underwent MRI-targeted biopsy had a significantly higher rate of ISUP 2 cancer detection than those who underwent systemic biopsy (38% vs. 26%,  $p = 0.005$ , detection ratio 1.46). In the mpMRI era, saturating prostate biopsy also has rare indications and is used only in exceptional cases, i.e., secondary patients with negative mpMRI (PI-RADS 1-2 scores) and elevated PSA. According to the literature, the frequency of detection of clinically significant prostate cancer after saturation biopsy (24 biopsy cores) is only 16%.

It has been reported that 8–24% of clinically significant PCa may go unnoticed on mpMRI when a tumor has been diagnosed following radical prostatectomy. However, according to our data, the overall detection rate of PCa improved only from 74.56% to 80.21% when an adapted systematic prostate biopsy was performed. A combination of systematic and targeted biopsy schemes has previously been suggested to provide the highest PCa detection rate, and our results are consistent with this fact. However, based on our results, adapted systematic prostate biopsy improved the overall detection rate of PCa but did not provide additional benefit for the detection of clinically significant disease.

The European Association of Urology recommends for primary patients to perform targeted plus systematic biopsy and targeted-only biopsy for secondary patients if their PIRADS score is  $\geq 3$ , but our data suggest that only targeted biopsy could be performed safely in biopsy-naïve patients with a PIRADS score  $\geq 3$  by avoiding systematic biopsy and maintaining a high clinically significant PCa detection rate. We substantiate this on the fact that in patients for whom no clinically significant PCa was detected by targeted prostate biopsy, also, no clinically significant cancer was detected by adapted systemic prostate biopsy. Other randomized Controlled Trials focusing on primary patients with a positive MRI found that targeted biopsy detected significantly more ISUP > grade 2 cancers than a systemic biopsy (risk difference,  $-0.11$  (95% CI:  $-0.2-0.0$ );  $p = 0.05$ ). Another extremely important fact is that targeted biopsy without systematic biopsy reduces the detection of ISUP grade 1

PCa compared to systematic biopsy. In the PRECISION and 4M trials, the detection rate of clinically insignificant PCa was significantly lower in the targeted biopsy group as compared to the systematic-only biopsy group (9% vs. 22%,  $p < 0.001$ , detection ratio of 0.41 for PRECISION; 14% vs. 25%,  $p < 0.001$ , detection ratio of 0.56 for 4M). According to the PROMIS study, a negative MRI could avoid unnecessary TRUS biopsies in 28% of patients, while 21% would be confirmed based on true negative results, but 7% would not be justified based on false negative results. However, according to the presented results, it is not possible to assess whether these clinically significant PCa detected by targeted-only biopsy would have been detected by additional systematic biopsy. Moreover, we cannot ignore the fact that the number of biopsy cores performed by targeted biopsy is significantly lower compared to a systematic biopsy (median number of cores: 2–7 vs. median number of cores: 8–15), and the detection ratio (i.e., the ratio of the detection rates obtained by targeted biopsy alone and by systematic biopsy alone) is in the superiority of targeted biopsy (1.12 (95% CI: 1.02–1.23) for ISUP grade  $\geq 2$  PCa and 1.20 (95% CI: 1.06–1.36) for ISUP grade  $\geq 3$  PCa). This fact is also reflected in our study.

An equally important question remains to be answered as to how many targeted biopsy cores are required for the detection of clinically significant disease during transperineal MRI/US-guided prostate biopsy. Based on the literature, in men undergoing mpMRI/US guided biopsy, the first two biopsy cores diagnose the most clinically significant cancers. However, there remains a proportion of men who would benefit from additional diagnostic cores, particularly those with foci greater than 8mm in diameter. In our trial, the second and third targeted samples detected an extra 16.49% and 28.87% of clinically significant PCa cases. These additional samples detected 45.36% of all clinically significant PCa cases, indicating that at least three targeted biopsy cores might be reasonable for patients with an ROI greater than 0.5 cm<sup>3</sup> or 8 mm in diameter.

Prostate cancer is characterized by a multi-focal phenomenon and 67–96% of prostatectomy specimens display more than one tumor focus. This suggests the presence of a field cancerization, whereby factors underlying carcinogenesis result in molecular changes in large areas of the prostate gland. Such changes are detectable in histologically normal or inflammatory cells and in PIN tissue which generally precedes carcinogenesis. Studies of tumor-adjacent benign tissue have found alterations in gene expression, telomere DNA content, and gene copy number that mimics a malignant phenotype. Additionally, there is an increased prevalence of methylation in genes such as *APC*, *GSTP1*, and *RARB2* known to be methylated in PCa. DNA methylation biomarkers in combination with PSA level or PSAD could be used to stratify risk for latent cancer, monitoring disease progression, and in combination with radiological prostate imaging can assist in proper and safe treatment selection.

Prostate mpMRI is a proven imaging modality that can detect clinically significant foci of PCa with a high degree of accuracy. However, it lacks the precision to separate csPCa from clinically insignificant disease. This is due to the pitfalls in the interpretation and technical evaluation of MRI images. A failure to recognize these issues can result in suboptimal patient treatment in low-grade PCa. The main routine clinical and pathological variables (PSA levels, GG/ISUP Grade Group, tumor clinical and radiological staging) are useful in the diagnostic assessment of the tumor, but they lack sensitivity and specificity in classifying the risk of the disease. Thus, mpMRI alone may not be enough to choose an individualized treatment for PCa patients.

DNA methylation biomarker discovery has accelerated rapidly with the development of whole-genome profiling techniques. The clinically added value of biomarkers in the era of upfront MRI and targeted biopsies remains unclear.

In this study, we tried to evaluate the DNA methylation extent of target tumor suppressor genes in perifocal tissue on mpMRI-non-visible PCa and compare it to the normal prostate tissue and mpMRI visible PCa. It was hypothesized that DNA methylation biomarkers can subsequently be used as a sensitive measure to detect the local spread of PCa. Based on previous studies, we chose to study these genes that best reflect the PCa-specific changes and local spread of PCa in prostate tissue. *GSTP1*, *RASSF1*, *APC*, and *RARB* genes are the most frequently methylated genes in PCa, with a frequency range from 70 to almost 100 % in different studies. Our results revealed that the DNA methylation level of all studied genes was statistically significantly higher in the index lesion, compared to the perifocal samples and histopathologically normal tissues. Also, the four-gene biomarker combination showed the highest sensitivity and specificity to PCa with 94% sensitivity and 100% specificity. The main finding of this study is that although from a radiological point of view by mpMRI, the perifocal prostate tissue and the area 20 mm away from the index lesion did not differ, at the genetic level significant differences were determined. This leads to the assumption that  $\geq 10$  mm area seems safe enough for focal PCa therapy based on molecular mapping of extent of field cancerization.

In the study conducted by Hanson et al. (2006), *GSTP1* and *RARB2* methylation were detected in some of the histologically normal-appearing epithelial samples from two and four patients, respectively. Additionally, normal stromal samples from one and two patients, respectively, also exhibited methylation. Most of these samples displayed partial methylation, although two samples showed methylation levels exceeding 51%. These findings indicated the potential presence of a field effect, where gene methylation extends beyond the tumor region<sup>34</sup>. In study conducted by Mehrotra et al. (2008), the sensitivity and specificity of methylation markers were evaluated by analyzing 51 pairs of histologically malignant and nonmalignant tissues from prostatectomies. Additionally, one prostatectomy sample without matching normal



tissue was included in the analysis. The study observed the presence of *GSTP1* methylation in 62% of cancer tissues compared to 2% of nonmalignant tissues. *APC* methylation was found in 69% of cancer tissues and none of the non-malignant tissues. *RARB2* methylation was detected in 58% of cancer tissues but was absent in nonmalignant tissues. Similarly, *RASSF1A* methylation was identified in 58% of cancer tissues and 11% of non-malignant tissues<sup>35</sup>. Similar DNA methylation levels in PCa foci were found in the study by Serenaite et al. (2015), it was shown that *GSTP1*, *RASSF1*, and *RARB* were also frequently (>75 %) methylated and they also showed a high level of methylation (21–36 %). Thus, DNA methylation levels and sensitivity of tested biomarkers found in this study are similar to the findings of other researchers. However, it is necessary to consider that methods and experimental conditions in different studies can influence the results.

To date, focal prostate therapy is based only on the results of histological examination, and we do not have a comparative molecular analysis technique. Our study showed that epigenetic tests have the potential to be combined with radiomics, to increase the precision of focal prostate therapy to avoid local progression of cancer in the future. Moreover, mpMRI misses up to 20% of foci with potentially csPCa. In such case the liquid biopsy-based tests can be used to improve the diagnostic value of MRI. The epigenetic test used in field cancerization analysis was also informative on cell-free DNA extracted from urine of the patients. Despite the low DNA methylation levels, all tested biomarkers showed the same tendency as in tissues, and the highest DNA methylation levels were detected in the csPCa group ( $GG \geq 2$ ). These values were significantly improved by combining urinary biomarkers with blood test parameters such as PSA and PSAD. Non-invasive urine test Select MDx (MDxHealth, Irvine, California, USA) is recommended for preselection of aggressive prostate cancer cases before the mpMRI of the prostate, while our study suggest possible benefit of such non-invasive testing for follow-up of the patients after focal therapy. However, to prove the concept additional prospective study is needed in the group of cases treated by focal PCa therapy.

## CONCLUSIONS

- In the mpMRI era, systematic prostate biopsy loses its relevance in clinical practice to select the appropriate treatment for PCa patients. The frequency of clinically insignificant PCa detection and over-diagnosis rates can be reduced by completely replacing adapted systematic biopsy with targeted MRI/US-guided prostate biopsy.
- This study demonstrates that targeted prostate biopsy is sufficient for safe and sensitive identification of clinically significant PCa in primary biopsy-naïve cases without the need to perform an adapted systematic biopsy.
- Our study shows, that the DNA methylation level of all studied genes was statistically significantly higher in the index lesion compared to the perifocal samples, and hypermethylation significantly decreases after reaching a distance of >10 mm.
- Based on this, we can conclude that the safe distance from the index lesion is no less than 10 mm and possible focal therapy for intermediate-risk PCa could be performed by region target hemi-ablation.
- Non-invasive urine tests are a highly valuable for further follow-up of patients after prostate cancer treatment, however, larger prospective studies with external validation are needed.

## RECOMMENDATIONS

- To reduce the frequency of clinically insignificant PCa detection and over-diagnosis rates we could recommend completely replace adapted systematic biopsy to only targeted MRI/US-guided prostate biopsy. This study demonstrates that targeted prostate biopsy is sufficient for safe and sensitive identification of clinically significant PCa in primary biopsy-naïve cases without the need to perform an adapted systematic biopsy.
- In order to improve the detection rate of clinically significant PCa during MRI/US fusion guided prostate biopsy procedure, we recommend to take at least four samples from each lesion, when the index lesion size is not less than 8 mm visible on mpMRI.
- In order to better detect clinically significant prostate cancer, it is recommended to use mpMRI for initial diagnostic tool, also perform targeted prostate biopsy, perform liquid prostate biopsy and combine all data with clinical indicators, especially PSAD.
- In order to investigate the local spread of the PCa by determining the epigenetic field effect around the cancer focus we recommend to evaluate the

methylation level of these *RASSF1*, *GSTP1*, *RARB* and *APC* genes in prostate biopsies taken from MRI-detected cancer foci and 10 and 20 mm from the focus edge.

- We can conclude that the safe distance from the index lesion is no less than 10mm and possible focal therapy for intermediate-risk PCa could be performed by region target hemi-ablation.

## 12. PADĖKA

Ypatingai dėkoju savo doktorantūros vadovui prof. dr. Feliksui Jankevičiui už pasitikėjimą, palaikymą ir visapusišką pagalbą. Ačiū, kad doktorantūros metais į iškilusias problemas ir sunkumus padėjote pažvelgti iš įvairių perspektyvų, ieškant bendro konstruktyvaus sprendimo.

Nuoširdžiai dėkoju prof. dr. Sonatai Jarmalaitei už galimybę dirbti kartu. Profesorė atvėrė man duris ir nukreipė mane į mokslininko kelią. Ačiū už vertingus patarimus, skirtą brangų laiką, publikacijų ir rankraščio taisymams, bei išties nuoširdų bendravimą.

Taip pat norėčiau padėkoti Kristinai Žukauskaitei už nuolatinės konsultacijas disertacijos rašymo metu, už ypač vertingas pastabas ir pataisymus rengiant publikacijas.

Dėkoju recenzentams dr. Daivai Dabkevičienei ir prof. dr. Editai Mišeikytei Kaubrienei už laiką, skirtą disertacijos peržiūrai, ir vertingas pastabas. Esu dėkingas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centrui už suteiktą finansavimą ir stipendijas.

Ir svarbiausia visos širdies dėkoju savo šeimai: žmonai Erikai Matulevičienei ir dukrytei Emilei Matulevičiūtei už palaikymą, supratingumą ir kantrybę. Taip pat mylintiems tėvams Elenai ir Daliui bei broliui Simonui.

### 13. CURRICULUM VITAE

1. Tyrėjas:  
Augustinas Matulevičius  
Gimimo data: 1989-11-21  
A.k. 38911210146
2. Informacija kontaktams:  
Telefonas: +370 693 87889  
Elektroninio pašto adresas: augustinas.matulevicius@santa.lt
3. Dabartinė darbovietė (*įstaigos pavadinimas, adresas*) ir pareigos

2022 - dabar	UAB Affidea, gyd. urologas
2021 - dabar	UAB Bolerada Innmed klinika, gyd. urologas
2020 – dabar	VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, urologijos skyrius, gydytojas urologas.
2017 – dabar	UAB „Kardiolita“, chirurgijos skyrius, gydytojas asistentas.

4. Veiklos sritis, nurodyta licencijoje, licencijos data bei numeris  
Gydytojas urologas licencija Nr. MPL-25003 2020 m. Liepos 13 d.
5. Mokslo laipsnis (*mokslo laipsnio suteikimo data ir institucijos, suteikusios mokslo laipsnį, pavadinimas*)  
2015 m. Aukštasis Universitetinis Vilniaus Universitetas Medicinos fakultetas, Medicinos studijų programa (valstybinis kodas 60107B102). Suteiktas medicinos magistro laipsnis.
6. Išsilavinimas (*kvalifikacijos suteikimo data; institucijos, suteikusios kvalifikaciją, pavadinimas*) ir kvalifikacijos tobulinimas per paskutinius penkerius metus (*stažuotės, kursai*)  
2018 – dabar Doktorantūra, Vilniaus universitetas, GMC, studijų programa biologija, tema: Naujos kartos vaizdinimo technologijos ir genetiniai testai kliniškai reikšmingo prostatos vėžio nustatymui. Numatomi studijų baigimo metai 2022.  
2015 – 2020 Rezidentūra, Vilniaus universitetas Medicinos fakultetas, studijų programa Urologija, pareigos gydytojas rezidentas. Numatomi studijų baigimo metai 2020.  
2015.06 Internatūra Vilniaus universitetas Medicinos fakultetas, Medicinos internatūra, suteikta medicinos gydytojo kvalifikacija (Medicinos praktikos licencijos numeris MPL-20677).  
2009 – 2015 Aukštasis Universitetinis Vilniaus Universitetas Medicinos fakultetas, Medicinos studijų programa (valstybinis kodas 60107B102). Suteiktas medicinos magistro laipsnis.

Stažuotė 51st Congress of the European Society for Surgical Research, Praha, Čekija (2016 m.).

Stažuotė Radboud UMC, radiologijos ir branduolinės medicinos centras, praktiniai mokymai, Olandija (2019 m.).

Stažuotė 6th Baltic Meeting in conjunction with the EAU: Baltic 2019, Talinas, Estija (2019 m.).

Darbo patirtis (*laikotarpis, institucijos pavadinimas, pareigos*)

2022 - dabar	UAB Affidea, gyd. urologas	gydytojas urologas
2021 - dabar	UAB Bolerada Innmed klinika	gydytojas urologas
2020 - dabar	VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, urologijos skyrius	gydytojas urologas
2019 – 2020	NVI, onkurologijos skyrius	koordinatorius
2019 – 2021	NVI, klinikinės onkologijos laboratorija	jaunesnysis mokslo darbuotojas
2017 – 2020	VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos, urologijos skyrius	gydytojas asistentas
2017 – dabar	UAB „Kardiolita“, chirurgijos skyrius	gydytojas urologas
2015 – 2020	Medicinos fakulteto rezidentūros chirurgijos skyrius	gydytojas rezidentas

Dalyvavimo biomedicininuose tyrimuose patirtis (*tyrimo sritis, tyrimo pradžios ir pabaigos data, tyrimo fazė (jei yra), pareigos tyrime*)

Biomedicininė studija : BAY 21140 Darolutamide in Addition to ADT Versus ADT in Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer (ARANOTE) 57002/ VšĮ Vilniaus Universiteto Ligoninė Santaros klinikos , Santariškių g. 2, Vilnius, LT-08661, Lithuania Koordinatorius nuo 2021 m.

- Informacija apie dalyvavimą Geros klinikinės praktikos mokymuose (*nurodoma mokymų data ir sertifikatą išdavusi įstaiga*)
- Good Clinical Practice E6 (R2) on 15 11 2020. No.: e-881. UAB BIOMAPAS

## 14. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210
2. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1320-1328. doi:10.1056/NEJMoa0810084
3. Draisma G, Boer R, Otto SJ, et al. Lead times and overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(12):868-878. doi:10.1093/jnci/95.12.868
4. Gulati R, Inoue LYT, Gore JL, Katcher J, Etzioni R. Individualized estimates of overdiagnosis in screen-detected prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(2):djt367. doi:10.1093/jnci/djt367
5. de Rooij M, Hamoen EHJ, Fütterer JJ, Barentsz JO, Rovers MM. Accuracy of Multiparametric MRI for Prostate Cancer Detection: A Meta-Analysis. *American Journal of Roentgenology*. 2014;202(2):343-351. doi:10.2214/AJR.13.11046
6. Dickinson L, Ahmed HU, Allen C, et al. Magnetic Resonance Imaging for the Detection, Localisation, and Characterisation of Prostate Cancer: Recommendations from a European Consensus Meeting. *Eur Urol*. 2011;59(4):477-494. doi:10.1016/j.eururo.2010.12.009
7. Bratan F, Niaf E, Melodelima C, et al. Influence of imaging and histological factors on prostate cancer detection and localisation on multiparametric MRI: a prospective study. *Eur Radiol*. 2013;23(7):2019-2029. doi:10.1007/s00330-013-2795-0
8. Franz T, von Hardenberg J, Blana A, et al. MRT/TRUS-fusionierte Biopsiesysteme. *Urologe*. 2017;56(2):208-216. doi:10.1007/s00120-016-0268-1
9. Moore CM, Robertson NL, Arsanious N, et al. Image-Guided Prostate Biopsy Using Magnetic Resonance Imaging-Derived Targets: A Systematic Review. *Eur Urol*. 2013;63(1):125-140. doi:10.1016/j.eururo.2012.06.004
10. Radtke JP, Kuru TH, Boxler S, et al. Comparative Analysis of Transperineal Template Saturation Prostate Biopsy Versus Magnetic Resonance Imaging Targeted Biopsy with Magnetic Resonance Imaging-Ultrasound Fusion Guidance. *Journal of Urology*. 2015;193(1):87-94. doi:10.1016/j.juro.2014.07.098

11. Valerio M, Donaldson I, Emberton M, et al. Detection of Clinically Significant Prostate Cancer Using Magnetic Resonance Imaging–Ultrasound Fusion Targeted Biopsy: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2015;68(1):8-19. doi:10.1016/j.eururo.2014.10.026
12. Schoots IG, Roobol MJ, Nieboer D, Bangma CH, Steyerberg EW, Hunink MGM. Magnetic Resonance Imaging–targeted Biopsy May Enhance the Diagnostic Accuracy of Significant Prostate Cancer Detection Compared to Standard Transrectal Ultrasound-guided Biopsy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol.* 2015;68(3):438-450. doi:10.1016/j.eururo.2014.11.037
13. Siddiqui MM, Rais-Bahrami S, Turkbey B, et al. Comparison of MR/Ultrasound Fusion–Guided Biopsy With Ultrasound-Guided Biopsy for the Diagnosis of Prostate Cancer. *JAMA.* 2015;313(4):390. doi:10.1001/jama.2014.17942
14. van Hove A, Savoie PH, Maurin C, et al. Comparison of image-guided targeted biopsies versus systematic randomized biopsies in the detection of prostate cancer: a systematic literature review of well-designed studies. *World J Urol.* 2014;32(4):847-858. doi:10.1007/s00345-014-1332-3
15. Zhao F, Olkhov-Mitsel E, van der Kwast T, et al. Urinary DNA Methylation Biomarkers for Noninvasive Prediction of Aggressive Disease in Patients with Prostate Cancer on Active Surveillance. *Journal of Urology.* 2017;197(2):335-341. doi:10.1016/j.juro.2016.08.081
16. Haluskova J, Lachvac L, Nagy V. The investigation of *GSTP1*, *APC* and *RASSF1* gene promoter hypermethylation in urine DNA of prostate-diseased patients. *Bratislava Medical Journal.* 2015;116(02):79-82. doi:10.4149/BLL\_2015\_014
17. Daniunaite K, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, et al. Prognostic Value of *RASSF1* Promoter Methylation in Prostate Cancer. *Journal of Urology.* 2014;192(6):1849-1855. doi:10.1016/j.juro.2014.06.075
18. *Prostate Source: Globocan 2020 Number of New Cases in 2020, Both Sexes, All Ages.*; 2020. <https://gco.iarc.fr/today>
19. Jansson KF, Akre O, Garmo H, et al. Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer. *Eur Urol.* 2012;62(4):656-661. doi:10.1016/j.eururo.2012.02.032
20. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World J Urol.* 2012;30(2):143-148. doi:10.1007/s00345-011-0801-1
21. Randazzo M, Müller A, Carlsson S, et al. A positive family history as a risk factor for prostate cancer in a population-based study with organised prostate-specific antigen screening: results of the Swiss European



- Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC, Aarau). *BJU Int.* 2016;117(4):576-583. doi:10.1111/bju.13310
22. Amin Al Olama A, Dadaev T, Hazelett DJ, et al. Multiple novel prostate cancer susceptibility signals identified by fine-mapping of known risk loci among Europeans. *Hum Mol Genet.* 2015;24(19):5589-5602. doi:10.1093/hmg/ddv203
  23. Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, et al. Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nat Genet.* 2018;50(7):928-936. doi:10.1038/s41588-018-0142-8
  24. Leitzmann M, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol.* Published online January 2012:1. doi:10.2147/CLEP.S16747
  25. Breslow N, Chan CW, Dhom G, et al. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. Collaborative study organized by the International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J Cancer.* 1977;20(5):680-688. doi:10.1002/ijc.2910200506
  26. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, et al. Effect of metabolic syndrome and its components on prostate cancer risk: Meta-analysis. *J Endocrinol Invest.* 2013;36(2):132-139. doi:10.1007/BF03346748
  27. Blanc-Lapierre A, Spence A, Karakiewicz PI, Aprikian A, Saad F, Parent MÉ. Metabolic syndrome and prostate cancer risk in a population-based case-control study in Montreal, Canada. *BMC Public Health.* 2015;15(1):913. doi:10.1186/s12889-015-2260-x
  28. Preston MA, Riis AH, Ehrenstein V, et al. Metformin Use and Prostate Cancer Risk. *Eur Urol.* 2014;66(6):1012-1020. doi:10.1016/j.eururo.2014.04.027
  29. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology.* 2016;40(2):244-252. doi:10.1097/PAS.0000000000000530
  30. D'Amico A V., Whittington R, Malkowicz SB, et al. Pretreatment Nomogram for Prostate-Specific Antigen Recurrence After Radical Prostatectomy or External-Beam Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 1999;17(1):168-168. doi:10.1200/JCO.1999.17.1.168
  31. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer—2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2021;79(2):243-262. doi:10.1016/j.eururo.2020.09.042

32. COOPERBERG MR, PASTA DJ, ELKIN EP, et al. THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO CANCER OF THE PROSTATE RISK ASSESSMENT SCORE: A STRAIGHTFORWARD AND RELIABLE PREOPERATIVE PREDICTOR OF DISEASE RECURRENCE AFTER RADICAL PROSTATECTOMY. *Journal of Urology*. 2005;173(6):1938-1942. doi:10.1097/01.ju.0000158155.33890.e7
33. Mohler JL, Antonarakis ES, Armstrong AJ, et al. Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2019;17(5):479-505. doi:10.6004/jnccn.2019.0023
34. Bell KJL, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer*. 2015;137(7):1749-1757. doi:10.1002/ijc.29538
35. Moyer VA. Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. 2012;157(2):120. doi:10.7326/0003-4819-157-2-201207170-00459
36. Anderson BB, Oberlin DT, Razmaria AA, et al. Extraprostatic Extension Is Extremely Rare for Contemporary Gleason Score 6 Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2017;72(3):455-460. doi:10.1016/j.eururo.2016.11.028
37. Ross HM, Kryvenko ON, Cowan JE, Simko JP, Wheeler TM, Epstein JI. Do Adenocarcinomas of the Prostate With Gleason Score (GS) $\leq$ 6 Have the Potential to Metastasize to Lymph Nodes? *American Journal of Surgical Pathology*. 2012;36(9):1346-1352. doi:10.1097/PAS.0b013e3182556dcd
38. Goel S, Shoag JE, Gross MD, et al. Concordance Between Biopsy and Radical Prostatectomy Pathology in the Era of Targeted Biopsy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Oncol*. 2020;3(1):10-20. doi:10.1016/j.euo.2019.08.001
39. Inoue LYT, Trock BJ, Partin AW, Carter HB, Etzioni R. Modeling grade progression in an active surveillance study. *Stat Med*. 2014;33(6):930-939. doi:10.1002/sim.6003
40. Overland MR, Washington SL, Carroll PR, Cooperberg MR, Herlemann A. Active surveillance for intermediate-risk prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 2019;29(6):605-611. doi:10.1097/MOU.0000000000000671
41. Borofsky S, George AK, Gaur S, et al. What Are We Missing? False-Negative Cancers at Multiparametric MR Imaging of the Prostate. *Radiology*. 2018;286(1):186-195. doi:10.1148/radiol.2017152877

42. Johnson DC, Raman SS, Mirak SA, et al. Detection of Individual Prostate Cancer Foci via Multiparametric Magnetic Resonance Imaging. *Eur Urol.* 2019;75(5):712-720. doi:10.1016/j.eururo.2018.11.031
43. Drost FJH, Osses DF, Nieboer D, et al. Prostate MRI, with or without MRI-targeted biopsy, and systematic biopsy for detecting prostate cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2019;2019(4). doi:10.1002/14651858.CD012663.pub2
44. Weinreb JC, Barentsz JO, Choyke PL, et al. PI-RADS Prostate Imaging – Reporting and Data System: 2015, Version 2. *Eur Urol.* 2016;69(1):16-40. doi:10.1016/j.eururo.2015.08.052
45. Turkbey B, Rosenkrantz AB, Haider MA, et al. Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2.1: 2019 Update of Prostate Imaging Reporting and Data System Version 2. *Eur Urol.* 2019;76(3):340-351. doi:10.1016/j.eururo.2019.02.033
46. Omri N, Kamil M, Alexander K, et al. Association between PSA density and pathologically significant prostate cancer: The impact of prostate volume. *Prostate.* 2020;80(16):1444-1449. doi:10.1002/pros.24078
47. Maggi M, Panebianco V, Mosca A, et al. Prostate Imaging Reporting and Data System 3 Category Cases at Multiparametric Magnetic Resonance for Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Focus.* 2020;6(3):463-478. doi:10.1016/j.euf.2019.06.014
48. Nordström T, Akre O, Aly M, Grönberg H, Eklund M. Prostate-specific antigen (PSA) density in the diagnostic algorithm of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2018;21(1):57-63. doi:10.1038/s41391-017-0024-7
49. Yusim I, Krenawi M, Mazor E, Novack V, Mabweesh NJ. The use of prostate specific antigen density to predict clinically significant prostate cancer. *Sci Rep.* 2020;10(1):20015. doi:10.1038/s41598-020-76786-9
50. Cuocolo R, Stanzione A, Rusconi G, et al. PSA-density does not improve bi-parametric prostate MR detection of prostate cancer in a biopsy naïve patient population. *Eur J Radiol.* 2018;104:64-70. doi:10.1016/j.ejrad.2018.05.004
51. Hendriks RJ, van Oort IM, Schalken JA. Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20(1):12-19. doi:10.1038/pcan.2016.59
52. Ploussard G, de la Taille A. The role of prostate cancer antigen 3 (PCA3) in prostate cancer detection. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(10):1013-1020. doi:10.1080/14737140.2018.1502086

53. Van Neste L, Herman JG, Otto G, Bigley JW, Epstein JI, Van Criekinge W. The Epigenetic promise for prostate cancer diagnosis. *Prostate*. 2012;72(11):1248-1261. doi:10.1002/pros.22459
54. Lendínez-Cano G, Ojeda-Claro AV, Gómez-Gómez E, et al. Prospective study of diagnostic accuracy in the detection of high-grade prostate cancer in biopsy-naïve patients with clinical suspicion of prostate cancer who underwent the Select MDx test. *Prostate*. 2021;81(12):857-865. doi:10.1002/pros.24182
55. Roumigié M, Ploussard G, Nogueira L, et al. Independent Evaluation of the Respective Predictive Values for High-Grade Prostate Cancer of Clinical Information and RNA Biomarkers after Upfront MRI and Image-Guided Biopsies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2):285. doi:10.3390/cancers12020285
56. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent Fusion of *TMPRSS2* and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science (1979)*. 2005;310(5748):644-648. doi:10.1126/science.1117679
57. Tomlins SA, Day JR, Lonigro RJ, et al. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur Urol*. 2016;70(1):45-53. doi:10.1016/j.eururo.2015.04.039
58. Donovan MJ, Noerholm M, Bentink S, et al. A molecular signature of PCA3 and ERG exosomal RNA from non-DRE urine is predictive of initial prostate biopsy result. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2015;18(4):370-375. doi:10.1038/pcan.2015.40
59. McKiernan J, Donovan MJ, O'Neill V, et al. A Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer at Initial Biopsy. *JAMA Oncol*. 2016;2(7):882. doi:10.1001/jamaoncol.2016.0097
60. Goering W, Kloth M, Schulz WA. DNA Methylation Changes in Prostate Cancer. In: ; 2012:47-66. doi:10.1007/978-1-61779-612-8\_4
61. Valdés-Mora F, Clark SJ. Prostate cancer epigenetic biomarkers: next-generation technologies. *Oncogene*. 2015;34(13):1609-1618. doi:10.1038/onc.2014.111
62. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(24):11733-11737. doi:10.1073/pnas.91.24.11733
63. Vanaja DK, Ehrlich M, Van den Boom D, et al. Hypermethylation of Genes for Diagnosis and Risk Stratification of Prostate Cancer. *Cancer Invest*. 2009;27(5):549-560. doi:10.1080/07357900802620794

64. Kwabi-Addo B, Wang S, Chung W, et al. Identification of Differentially Methylated Genes in Normal Prostate Tissues from African American and Caucasian Men. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(14):3539-3547. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3342
65. Song CX, He C. Balance of DNA methylation and demethylation in cancer development. *Genome Biol*. 2012;13(10):173. doi:10.1186/gb-2012-13-10-173
66. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983;301(5895):89-92. doi:10.1038/301089a0
67. Esteller M. ABERRANT DNA METHYLATION AS A CANCER-INDUCING MECHANISM. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45(1):629-656. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095832
68. Pulukuri SMK, Estes N, Patel J, Rao JS. Demethylation-Linked Activation of Urokinase Plasminogen Activator Is Involved in Progression of Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2007;67(3):930-939. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2892
69. Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2009;1796(2):114-128. doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.004
70. Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S. RASSF tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation. *FEBS Lett*. 2014;588(16):2671-2684. doi:10.1016/j.febslet.2014.02.041
71. Huang YQ, Guan H, Liu CH, et al. Association between *RASSF1A* promoter methylation and renal cell cancer susceptibility: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*. 2016;15(2). doi:10.4238/gmr.15026994
72. Association Between *RASSF1A* Promoter Methylation and Testicular Germ Cell Tumor: A Meta-analysis and a Cohort Study. *Cancer Genomics Proteomics*. 2017;14(5). doi:10.21873/cgp.20046
73. Zhan L, Zhang B, Tan Y, et al. Quantitative assessment of the relationship between *RASSF1A* gene promoter methylation and bladder cancer (PRISMA). *Medicine*. 2017;96(7):e6097. doi:10.1097/MD.0000000000006097
74. Niu H, Yang J, Yang K, Huang Y. The relationship between *RASSF1A* promoter methylation and thyroid carcinoma. *Medicine*. 2017;96(46):e8630. doi:10.1097/MD.0000000000008630
75. Huang YZ, Wu W, Wu K, Xu XN, Tang WR. Association of *RASSF1A* Promoter Methylation with Lung Cancer Risk: a Meta-analysis. *Asian*

- Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;15(23):10325-10328. doi:10.7314/APJCP.2014.15.23.10325
76. Shi H, Li Y, Wang X, et al. Association between *RASSF1A* Promoter Methylation and Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(10):e76787. doi:10.1371/journal.pone.0076787
  77. Pan J, Chen J, Zhang B, et al. Association between *RASSF1A* Promoter Methylation and Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013;8(9):e75283. doi:10.1371/journal.pone.0075283
  78. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987;196(2):261-282. doi:10.1016/0022-2836(87)90689-9
  79. di Masi A, Leboffe L, De Marinis E, et al. Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med*. 2015;41:1-115. doi:10.1016/j.mam.2014.12.003
  80. Jatkoe TA, Karnes RJ, Freedland SJ, Wang Y, Le A, Baden J. A urine-based methylation signature for risk stratification within low-risk prostate cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(5):802-808. doi:10.1038/bjc.2015.7
  81. Suzuki H, Aida S, Akimoto S, Igarashi T, Yatani R, Shimazaki J. State of Adenomatous Polyposis Coli Gene and ras Oncogenes in Japanese Prostate Cancer. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1994;85(8):847-852. doi:10.1111/j.1349-7006.1994.tb02957.x
  82. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (*APC*): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci*. 2007;120(19):3327-3335. doi:10.1242/jcs.03485
  83. Chen Y, Li J, Yu X, et al. *APC* gene hypermethylation and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(9):929-935. doi:10.1038/ejhg.2012.281
  84. Henrique R, Ribeiro FR, Fonseca D, et al. High Promoter Methylation Levels of *APC* Predict Poor Prognosis in Sextant Biopsies from Prostate Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(20):6122-6129. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1042
  85. Richiardi L, Fiano V, Grasso C, et al. Methylation of *APC* and *GSTP1* in Non-Neoplastic Tissue Adjacent to Prostate Tumour and Mortality from Prostate Cancer. *PLoS One*. 2013;8(7):e68162. doi:10.1371/journal.pone.0068162
  86. Rybicki BA, Rundle A, Kryvenko ON, et al. Methylation in benign prostate and risk of disease progression in men subsequently diagnosed with prostate cancer. *Int J Cancer*. 2016;138(12):2884-2893. doi:10.1002/ijc.30038

87. Park JY. Promoter Hypermethylation as a Biomarker in Prostate Adenocarcinoma. In: ; 2015:607-625. doi:10.1007/978-1-4939-1804-1\_32
88. Hayes JD, Pulford DJ. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995;30(6):445-520. doi:10.3109/10409239509083491
89. Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett.* 2018;433:33-42. doi:10.1016/j.canlet.2018.06.028
90. Lin X, Tascilar M, Lee WH, et al. *GSTP1* CpG Island Hypermethylation Is Responsible for the Absence of *GSTP1* Expression in Human Prostate Cancer Cells. *Am J Pathol.* 2001;159(5):1815-1826. doi:10.1016/S0002-9440(10)63028-3
91. Costa VL, Henrique R, Jerónimo C. Epigenetic Markers for Molecular Detection of Prostate Cancer. *Dis Markers.* 2007;23(1-2):31-41. doi:10.1155/2007/356742
92. Shen X, Wang J, Yan X, et al. Predictive value of *GSTP1* Ile105Val polymorphism in clinical outcomes of chemotherapy in gastric and colorectal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77(6):1285-1302. doi:10.1007/s00280-016-3047-1
93. Gonzalgo ML, Nakayama M, Lee SM, De Marzo AM, Nelson WG. Detection of *GSTP1* methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis. *Urology.* 2004;63(2):414-418. doi:10.1016/j.urology.2003.08.039
94. Suh CI, Shanafelt T, May DJ, et al. Comparison of telomerase activity and *GSTP1* promoter methylation in ejaculate as potential screening tests for prostate cancer. *Mol Cell Probes.* 2000;14(4):211-217. doi:10.1006/mcpr.2000.0307
95. GOESSL C, MÜLLER M, HEICAPPELL R, KRAUSE H, MILLER K. DNA-Based Detection of Prostate Cancer in Blood, Urine, and Ejaculates. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;945(1):51-58. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03863.x
96. Steiner I, Jung K, Schatz P, et al. Gene Promoter Methylation and Its Potential Relevance in Early Prostate Cancer Diagnosis. *Pathobiology.* 2010;77(5):260-266. doi:10.1159/000318017
97. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, et al. A Quantitative Promoter Methylation Profile of Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2004;10(24):8472-8478. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0894

98. Woodson K, O'Reilly KJ, Hanson JC, Nelson D, Walk EL, Tangrea JA. The Usefulness of the Detection of *GSTP1* Methylation in Urine as a Biomarker in the Diagnosis of Prostate Cancer. *Journal of Urology*. 2008;179(2):508-512. doi:10.1016/j.juro.2007.09.073
99. Devaney J, Stirzaker C, Qu W, et al. Epigenetic Deregulation Across Chromosome 2q14.2 Differentiates Normal from Prostate Cancer and Provides a Regional Panel of Novel DNA Methylation Cancer Biomarkers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2011;20(1):148-159. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0719
100. Litovkin K, Van Eynde A, Joniau S, et al. DNA Methylation-Guided Prediction of Clinical Failure in High-Risk Prostate Cancer. *PLoS One*. 2015;10(6):e0130651. doi:10.1371/journal.pone.0130651
101. Mahon KL, Qu W, Lin HM, et al. Serum Free Methylated Glutathione S-transferase 1 DNA Levels, Survival, and Response to Docetaxel in Metastatic, Castration-resistant Prostate Cancer: Post Hoc Analyses of Data from a Phase 3 Trial. *Eur Urol*. 2019;76(3):306-312. doi:10.1016/j.eururo.2018.11.001
102. Henrique R, Jerónimo C, Teixeira MR, et al. Epigenetic Heterogeneity of High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Clues for Clonal Progression in Prostate Carcinogenesis. *Molecular Cancer Research*. 2006;4(1):1-8. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0113
103. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol*. 2004;202(2):233-240. doi:10.1002/path.1503
104. Aitchison A, Warren A, Neal D, Rabbitts P. *RASSF1A* promoter methylation is frequently detected in both pre-malignant and non-malignant microdissected prostatic epithelial tissues. *Prostate*. 2007;67(6):638-644. doi:10.1002/pros.20475
105. Mehrotra J, Varde S, Wang H, et al. Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer. *Prostate*. 2008;68(2):152-160. doi:10.1002/pros.20675
106. Tang D, Kryvenko ON, Mittrache N, et al. Methylation of the *RARB* Gene Increases Prostate Cancer Risk in Black Americans. *Journal of Urology*. 2013;190(1):317-324. doi:10.1016/j.juro.2013.01.083
107. Hanson JA, Gillespie JW, Grover A, et al. Gene Promoter Methylation in Prostate Tumor-Associated Stromal Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(4):255-261. doi:10.1093/jnci/djj051
108. Dou M, Zhou X, Fan Z, et al. Clinical Significance of Retinoic Acid Receptor Beta Promoter Methylation in Prostate Cancer: A Meta-



- Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;45(6):2497-2505. doi:10.1159/000488268
109. Brooks JD, Weinstein M, Lin X, et al. CG island methylation changes near the *GSTP1* gene in prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(6):531-536.
  110. Jentzmik F, Krause H, Reichelt U, et al. *GSTP1* CpG island hypermethylation for DNA-based detection of occult tumor cells in surgical margins after radical prostatectomy. *World J Urol*. 2012;30(4):541-546. doi:10.1007/s00345-011-0764-2
  111. Borghesi M, Ahmed H, Nam R, et al. Complications After Systematic, Random, and Image-guided Prostate Biopsy. *Eur Urol*. 2017;71(3):353-365. doi:10.1016/j.eururo.2016.08.004
  112. Basourakos SP, Alshak MN, Lewicki PJ, et al. Role of Prophylactic Antibiotics in Transperineal Prostate Biopsy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Open Sci*. 2022;37:53-63. doi:10.1016/j.euro.2022.01.001
  113. van der Kwast TH, van Leenders GJ, Berney DM, et al. ISUP Consensus Definition of Cribriform Pattern Prostate Cancer. *American Journal of Surgical Pathology*. 2021;45(8):1118-1126. doi:10.1097/PAS.0000000000001728
  114. van Leenders GJLH, van der Kwast TH, Grignon DJ, et al. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*. 2020;44(8):e87-e99. doi:10.1097/PAS.0000000000001497
  115. Cimadamore A, Cheng L, Lopez-Beltran A, et al. Added Clinical Value of Whole-mount Histopathology of Radical Prostatectomy Specimens: A Collaborative Review. *Eur Urol Oncol*. 2021;4(4):558-569. doi:10.1016/j.euo.2020.08.003
  116. Brait M, Ford JG, Papaiahgari S, et al. Association between Lifestyle Factors and CpG Island Methylation in a Cancer-Free Population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2009;18(11):2984-2991. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-1245
  117. Daniunaite K, Jarmalaite S, Kalinauskaite N, et al. Prognostic Value of *RASSF1* Promoter Methylation in Prostate Cancer. *Journal of Urology*. 2014;192(6):1849-1855. doi:10.1016/j.juro.2014.06.075
  118. Lehmann U, Länger F, Feist H, Glöckner S, Hasemeier B, Kreipe H. Quantitative Assessment of Promoter Hypermethylation during Breast Cancer Development. *Am J Pathol*. 2002;160(2):605-612. doi:10.1016/S0002-9440(10)64880-8

119. Bakavicius A, Daniunaite K, Zukauskaite K, Barisiene M, Jarmalaite S, Jankevicius F. Urinary DNA methylation biomarkers for prediction of prostate cancer upgrading and upstaging. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):115. doi:10.1186/s13148-019-0716-z
120. Ukimura O, Coleman JA, de la Taille A, et al. Contemporary Role of Systematic Prostate Biopsies: Indications, Techniques, and Implications for Patient Care. *Eur Urol*. 2013;63(2):214-230. doi:10.1016/j.eururo.2012.09.033
121. Djavan B, Ravery V, Zlotta A, et al. Prospective evaluation of prostate cancer detected on biopsies 1, 2, 3 and 4: when should we stop? *J Urol*. 2001;166(5):1679-1683.
122. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, et al. MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(19):1767-1777. doi:10.1056/NEJMoa1801993
123. Artiles Medina A, Rodríguez-Patrón Rodríguez R, Ruiz Hernández M, et al. Identifying Risk Factors for MRI-Invisible Prostate Cancer in Patients Undergoing Transperineal Saturation Biopsy. *Res Rep Urol*. 2021;Volume 13:723-731. doi:10.2147/RRU.S323823
124. Le JD, Tan N, Shkolyar E, et al. Multifocality and Prostate Cancer Detection by Multiparametric Magnetic Resonance Imaging: Correlation with Whole-mount Histopathology. *Eur Urol*. 2015;67(3):569-576. doi:10.1016/j.eururo.2014.08.079
125. van der Leest M, Cornel E, Israël B, et al. Head-to-head Comparison of Transrectal Ultrasound-guided Prostate Biopsy Versus Multiparametric Prostate Resonance Imaging with Subsequent Magnetic Resonance-guided Biopsy in Biopsy-naïve Men with Elevated Prostate-specific Antigen: A Large Prospective Multicenter Clinical Study. *Eur Urol*. 2019;75(4):570-578. doi:10.1016/j.eururo.2018.11.023
126. El-Shater Bosaily A, Parker C, Brown LC, et al. PROMIS — Prostate MR imaging study: A paired validating cohort study evaluating the role of multi-parametric MRI in men with clinical suspicion of prostate cancer. *Contemp Clin Trials*. 2015;42:26-40. doi:10.1016/j.cct.2015.02.008
127. Kenigsberg AP, Renson A, Rosenkrantz AB, et al. Optimizing the Number of Cores Targeted During Prostate Magnetic Resonance Imaging Fusion Target Biopsy. *Eur Urol Oncol*. 2018;1(5):418-425. doi:10.1016/j.euo.2018.09.006
128. Turkbey B, Brown AM, Sankineni S, Wood BJ, Pinto PA, Choyke PL. Multiparametric prostate magnetic resonance imaging in the evaluation

- of prostate cancer. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(4):326-336. doi:10.3322/caac.21333
129. Quon JS, Moosavi B, Khanna M, Flood TA, Lim CS, Schieda N. False positive and false negative diagnoses of prostate cancer at multiparametric prostate MRI in active surveillance. *Insights Imaging.* 2015;6(4):449-463. doi:10.1007/s13244-015-0411-3
  130. Eggener SE, Scardino PT, Walsh PC, et al. Predicting 15-Year Prostate Cancer Specific Mortality After Radical Prostatectomy. *Journal of Urology.* 2011;185(3):869-875. doi:10.1016/j.juro.2010.10.057
  131. Gandaglia G, Ploussard G, Isbarn H, et al. What is the optimal definition of misclassification in patients with very low-risk prostate cancer eligible for active surveillance? Results from a multi-institutional series. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2015;33(4):164.e1-164.e9. doi:10.1016/j.urolonc.2014.12.011
  132. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *JAMA.* 2017;317(24):2532. doi:10.1001/jama.2017.7248
  133. Smith CP, Czarniecki M, Mehravand S, et al. Radiomics and radiogenomics of prostate cancer. *Abdominal Radiology.* 2019;44(6):2021-2029. doi:10.1007/s00261-018-1660-7
  134. Strand S, Orntoft T, Sorensen K. Prognostic DNA Methylation Markers for Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2014;15(9):16544-16576. doi:10.3390/ijms150916544
  135. Chiam K, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. *Cancer Lett.* 2014;342(2):248-256. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.011
  136. Chao C, Chi M, Preciado M, Black MH. Methylation markers for prostate cancer prognosis: a systematic review. *Cancer Causes & Control.* 2013;24(9):1615-1641. doi:10.1007/s10552-013-0249-2
  137. Aryee MJ, Liu W, Engelmann JC, et al. DNA Methylation Alterations Exhibit Intraindividual Stability and Interindividual Heterogeneity in Prostate Cancer Metastases. *Sci Transl Med.* 2013;5(169). doi:10.1126/scitranslmed.3005211
  138. Baylin SB. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10(7):687-692. doi:10.1093/hmg/10.7.687
  139. Majumdar S, Buckles E, Estrada J, Koochekpour S. Aberrant DNA Methylation and Prostate Cancer. *Curr Genomics.* 2011;12(7):486-505. doi:10.2174/138920211797904061

140. Hanson JA, Gillespie JW, Grover A, et al. Gene Promoter Methylation in Prostate Tumor–Associated Stromal Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(4):255-261. doi:10.1093/jnci/djj051
141. Mehrotra J, Varde S, Wang H, et al. Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer. *Prostate*. 2008;68(2):152-160. doi:10.1002/pros.20675
142. Serenaite I, Daniunaite K, Jankevicius F, et al. Heterogeneity of DNA methylation in multifocal prostate cancer. *Virchows Archiv*. 2015;466(1):53-59. doi:10.1007/s00428-014-1678-3
143. Tay KJ, Amin MB, Ghai S, et al. Surveillance after prostate focal therapy. *World J Urol*. 2019;37(3):397-407. doi:10.1007/s00345-018-2363-y
144. Rosenzweig B, Laitman Y, Zilberman DE, et al. Effects of “real life” prostate MRI inter-observer variability on total needle samples and indication for biopsy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2020;38(10):793.e13-793.e18. doi:10.1016/j.urolonc.2020.03.015
145. Stewart GD, Van Neste L, Delvenne P, et al. Clinical Utility of an Epigenetic Assay to Detect Occult Prostate Cancer in Histopathologically Negative Biopsies: Results of the MATLOC Study. *Journal of Urology*. 2013;189(3):1110-1116. doi:10.1016/j.juro.2012.08.219
146. Woodson K, Gillespie J, Hanson J, et al. Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: A histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate*. 2004;60(1):25-31. doi:10.1002/pros.20013
147. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, et al. Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer. *Cancer Res*. 2004;64(6):1975-1986. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3972
148. Cho NY, Kim JH, Moon KC, Kang GH. Genomic hypomethylation and CpG island hypermethylation in prostatic intraepithelial neoplasm. *Virchows Archiv*. 2009;454(1):17-23. doi:10.1007/s00428-008-0706-6

## 15. PRIEDAI

### 1 priedas. Lietuvos bioetikos komiteto leidimo kopija



VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS  
*sui generis* darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

**Biomedicininio tyrimo „Radiogenomikos technologijos kliniškai reikšmingo prostatos vėžio nustatymui“ pagrindiniam tyrėjui Albertui Uliui** 2020-10-27 Nr. 2020-LP-68

### PRITARIMAS BIOMEDICININIO TYRIMO DOKUMENTŲ PAKEITIMAMS

#### Leidimo Nr. 2019/11-1166-654 pakeitimas Nr. 1

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas išnagrinėjęs prašymą atlikti su vykdomu biomedicininiu tyrimu „Radiogenomikos technologijos kliniškai reikšmingo prostatos vėžio nustatymui“ (leidimas Nr. 2019/11-1166-654, išduotas 2019 11 05 d.) susijusių dokumentų pakeitimus nusprendė, kad pakeitimai **atitinka** LR biomedicininių tyrimų etikos įstatymo II skyriuje nustatytus biomedicininių tyrimų etikos reikalavimus. Atsižvelgiant į tai **pritariama**, kad būtų:

- vadovaujamosi protokolu (Nr. 3, versija Nr. 3, data 2019 10 29 d.);
- įtraukiama papildoma tyrėja - Justina Gaiževska;
- tyrimas pratęsiamas iki 2023 11 mėn.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

UŽRAŠAMS

# UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 30 egz.