

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Zorana Z. Nikolić

Studija asocijacije varijanti u genima za
mikroRNK i za proteine utišavajućeg
kompleksa sa rizikom za razvoj i progresiju
karcinoma prostate kod bolesnika iz Srbije

-doktorska disertacija-

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Zorana Z. Nikolić

The study of association of variants in
genes encoding microRNAs and the
proteins of silencing complex with prostate
cancer risk among patients from Serbia

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2016

Mentor:

dr Goran Brajušković, vanredni profesor, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

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

dr Milena Krajnović, naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu

dr Nikola Tanić, naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

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

Svom mentoru prof. dr Goranu Brajuškoviću dugujem zahvalnost za priliku da svoju naučnu delatnost otpočnem u Centru za humanu molekularnu genetiku, kao i za neprocenljivu pomoć tokom odabira teme istraživanja, sprovođenja eksperimentalnog rada, obrade rezultata i njihovog tumačenja, kao i tokom pisanja naučnih radova koji su proistekli iz ove disertacije i uobličavanja teksta doktorske teze.

Prof. dr Dušanki Savić-Pavićević dugujem zahvalnost za sugestije tokom dizajniranja studije, kao i za pomoć u tumačenju rezultata i njihovom predstavljanju, kako u okviru doktorske reze, tako i u vidu publikacija.

Prof. dr Vinki Vukotić i njenoj mlađoj saradnici dr Nataši Filipović zahvaljujem na saradnji u vidu kliničkog dijagnostikovanja bolesnika, kao i prikupljanja uzoraka i kliničkih podataka koji su bili osnova za sprovođenje ove doktorske disertacije. Zahvalnost za pružanje neophodnih histopatoloških podataka bolesnika dugujem i prof. dr Snežani Cerović.

Svojim kolegama iz Centra za humanu molekularnu genetiku, Milošu Brkušaninu, Jovanu Pešoviću, Nemanji Vučiću i Jeleni Karanović dugujem zahvalnost za svaku ukazanu pomoć tokom rada, uključujući i svesrdnu podršku. Takođe zahvaljujem doktorantima, master studentima i diplomcima koji su tokom izrade ove doktorske disertacije, kao i pre njegovog sprovođenja, učestvovali u istraživanjima vezanim za molekularnu osnovu karcinoma prostate u Centru za humanu molekularnu genetiku i pomogli na različite načine njenoj realizaciji.

Svojoj porodici zahvaljujem na razumevanju i podršci tokom celokupnog školovanja, pogotovo studija i rada čija je kruna ova doktorska disertacija.

Studija asocijacije varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj i progresiju karcinoma prostate kod bolesnika iz Srbije

Sažetak

Karcinom prostate (KP) predstavlja jedan od vodećih globalnih zdravstvenih problema, s obzirom na to da je reč o drugom najučestalijem malignom tumoru kod muškaraca. U kliničkoj praksi vezanoj za KP jedan od najvećih izazova je razlikovanje latentnog od klinički značajnog karcinoma. U tom smislu, od izuzetnog značaja je identifikacija genetičkih varijanti čija bi primena kao nestandardnih prognostičkih parametara mogla da se koristi za konstruisanje preciznih algoritama za procenu rizika za razvoj i progresiju KP. U okviru ove disertacije analizirana je potencijalna asocijacija varijanti u četiri gena za mikroRNK (rs2910164 u *hsa-miR-146a*, rs3746444 u *hsa-miR-499*, rs11614913 u *hsa-miR-196a2* i rs895819 u genu za miR-27a) sa rizikom za razvoj i progresiju KP. Takođe, analizirana je asocijacija varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa (RISC) (*DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* i *GEMIN4*) sa navedenim rizicima. Studija je obuhvatala 355 bolesnika sa KP, 360 bolesnika sa benignom hiperplazijom prostate (BPH) i 318 muškaraca koji su činili kontrolnu grupu. Genotipizacija genetičkih varijanti vršena je metodama PCR-RFLP, HRMA, alel-specifičnog PCR-a, primenom TaqMan[®] eseja za genotipizaciju polimorfizama i PCR-a u realnom vremenu baziranom na korišćenju specifičnih proba. Rezultati genotipizacije su statistički obrađeni u cilju ispitivanja asocijacija sa rizikom za razvoj i progresiju KP, kao i statističkih epistatičkih interakcija. Takođe, sprovedena je meta-analiza koja je uključivala naše rezultate, kao i rezultate prethodnih studija koje su analizirale asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj drugih malignih tumora. Rezultati ove studije pokazali su asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj bolesti, dok je za gotovo sve ostale analizirane genetičke varijante ustanovljena asocijacija sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP i/ili rizikom za progresiju KP. Pokazana je i asocijacija epistatičke interakcije između varijanti rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2*, rs7813 u genu *GEMIN4*, kao i rs784567 u genu *TARBP2* sa rizikom za progresiju

bolesti. Za rs2910164 u meta-analizu ustanovljena je asocijacija sa rizikom za razvoj više tipova malignih tumora.

Ključne reči: studija asocijacije, genetičke varijante, mikroRNK, RNK-indukovani utišavajući kompleks, karcinom prostate, statističke epistatičke interakcije, meta-analiza.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija

UDK broj: 577.21:[616-006.6:611.637](497.11)(043.3)

The study of association of variants in genes encoding microRNAs and the proteins of silencing complex with prostate cancer risk among patients from Serbia

Abstract

Being the second most common cancer among men worldwide, prostate cancer (PCa) is one of the major global health issues. In the clinical practice related to this malignant disease, one of the most important challenges is to distinct latent from clinically significant forms of disease. Therefore, it is of utmost importance to identify genetic variants which could be used as nonstandard prognostic parameters for constructing precise algorithms for evaluating the risk of PCa onset and progression. In this dissertation, the association of four microRNA genetic variants (rs2910164 in *hsa-miR-146a*, rs3746444 in *hsa-miR-499*, rs11614913 in *hsa-miR-196a2* and rs895819 in the gene encoding miR-27a) with PCa risk and progression was assessed. Also, the potential association with PCa was estimated for genetic variants located in genes encoding the proteins of RNA-induced silencing complex (RISC) (*DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* and *GEMIN4*). The study involved 355 patients with PCa, 360 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH), as well as 318 healthy controls. Genotyping was performed by using PCR-RFLP, HRMA, allele-specific PCR, TaqMan[®] SNP Genotyping Assays and real-time PCR-based genotyping assay using specific probes. Results were statistically analyzed, aiming to evaluate the potential associations of genetic variants with PCa risk and progression, as well as to assess statistical epistatic interactions. Furthermore, a meta-analysis was conducted involving our results, together with the results of previous studies on association between rs2910164 and different types malignant tumors. The results of this study suggested the association of rs2910164 with PCa risk, while for most of the other analyzed genetic variants the association with the values of standard prognostic parameters and/or PCa progression was found. Also, the epistatic interaction between rs11614913 in *hsa-miR-196a2*, rs7813 in *GEMIN4* and rs784567 in *TARBP2* was shown to be associated with the risk of PCa progression. For rs2910164, the meta-analysis showed the association with multiple types of malignant tumors.

Key words: association study, genetic variants, microRNA, RNA-induced silencing complex, prostate cancer, statistical epistatic interactions, meta-analysis.

Scientific field: Biology

Special topic: Biochemistry and Molecular Biology

UDC number: 577.21:[616-006.6:611.637](497.11)(043.3)

Skraćenice

AGO – protein Argonaut (eng. *Argonaute*, AGO)

AGO2 – protein Argonaut 2 (eng. *Argonaute 2*, AGO2)

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

AR – androgeni receptor

BHP – benigna hiperplazija prostate

bp – bazni par

BRCA1 – gen karconoma dojke 1 (eng. *Breast Cancer Gene 1*, BRCA1)

BRCA2 – gen karconoma dojke 2 (eng. *Breast Cancer Gene 2*, BRCA2)

CI – interval poverenja (eng. *Confidence Interval*, CI)

c-MYC – homolog virusnog onkogenog v-Myc (eng. *V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*, c-MYC)

CVC – konzistentnost unakrsnih validacija (eng. *Cross-Validation Consistency*, CVC)

DDX20 – Dead-box helikaza 20 (eng. *DEAD-box helicase 20*, DDX20)

DGCR8 – Kritični region 8 za DiGeorge-ov sindrom (eng. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*, DGCR8)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

dNTP – dezoksiribonukleozid-trifosfat

DRE – digitalni rektalni pregled (eng. *Digital Rectal Examination*, DRE)

EDTA – etilen diamin tetra sirćetna kiselina

Et-Br – etidijum-bromid

EXP5 – eksportin 5 (eng. *Exportin 5*, EXP5)

Fw – uzvodni prajmer (eng. *forward*)

GEMIN3 – Gem-asocirani protein 3 (eng. *Gem (Nuclear Organelle) Associated Protein 3*, GEMIN3)

GEMIN4 – Gem-asocirani protein 4 (eng. *Gem (Nuclear Organelle) Associated Protein 4*, GEMIN4)

GS – Glison skor

GTP – guanozin trifosfat (eng. *Guanosine Triphosphate*, GTP)

GWAS – studija genetičkih asocijacija na čitavom genomu (eng. *Genome Wide Association Study*, GWAS)

H&E – hematoksilin-eozin

HRMA – analiza krivih topljenja visoke rezolucije (*High Resolution Melting Analysis*, HRMA)

HWE – Hardi-Vajnbergova ravnoteža (eng. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE)
I² – indeks nedoslednosti (eng. *inconsistency index*, I²)
iRNK – informacijska RNK
KLK2 – peptidaza srodna kalikreinu (eng. *Kallikrein Related Peptidase 2*, KLK2)
KP – karcinom prostate
MDR – metoda redukcije dimenzionalnosti višestrukih faktora (eng. *Multifactor Dimensionality Reduction*, MDR)
MID – središnji domen proteina Argonaut (eng. *Middle*, MID)
NIH – američki Nacionalni institut za zdravlje (eng. *National Institute of Health*, NIH)
NK – negativna kontrola
OR – odnos šansi (eng. *Odds Ratio*, OR)
PAP – prostatična kiselina fosfataza (eng. *Prostatic Acid Phosphatase*, PAP)
PAZ – domen proteina Piwi, Argonaut i Zwiller (eng. *Piwi-Argonaute-Zwiller*, PAZ)
PCR – lančana reakcija polimeraze
PCR-CTPP – PCR sa dva suprotno orijentisana para prajmera
PHB – inhibitin (eng. *Prohibitin*, PHB)
Pre-mikroRNK – prekursor mikroRNK
Pri-mikroRNK – primarna mikroRNK
PSA – prostata-specifični antigen (eng. *Prostate-specific Antigen*, PSA)
 BPSA – benigni PSA
 Pro PSA – prekursor PSA
PTEN – fosfataza i homolog tenzina (eng. *Phosphatase And Tensin Homolog*, PTEN)
RFLP – polimorfizam u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
RISC – RNK-indukovani utišavajući kompleks (eng. *RNA-induced Silencing Complex*, RISC)
RNK – ribonukleinska kiselina
RNPs – ribonukleoproteinske čestice (eng. *Ribonucleoproteins*, RNPs)
Rv – nizvodni prajmer (eng. *reverse*)
siRNA – mala interferirajuća RNK (eng. *Small Interfering RNA*, siRNA)
SRD5A2 – steroid 5- α -reduktaza tip 2 (eng. *Steroid 5 Alpha-Reductase 2*, SRD5A2)
TARBP2 – gen za TAR RNK-vezujući protein 2 (eng. *TAR (HIV-1) RNA Binding Protein 2*, TARBP2)
TBA – uravnotežena tačnost testiranja (eng. *Testing Balanced Accuracy*, TBA)
TBE – Tris-borat-EDTA

Tm – temperatura topljenja (eng. *Melting Temperature*, Tm)

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

TP53 – tumor protein p53 (eng. *Tumor Protein p53*, TP53)

TRBP – TAR RNK-vezujući protein (eng. *TAR RNA Binding Protein*, TRBP)

TRIS – Tris(hidroksimetil)aminometan

TRUS – transrektalni ultrazvučni pregled (eng. *Transrectal Ultrasound*, TRUS)

UTR – netranslatirajući region gena

UV – ultraljubičasta svetlost

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Prostata kao egzokrina žlezda muškog polnog sistema.....	1
1.2. Bolesti prostate	2
1.2.1. Prostatitis	2
1.2.2. Benigna hiperplazija prostate.....	2
1.2.3. Maligni tumori prostate	3
1.3. Karcinom prostate	4
1.3.1. Epidemiologija karcinoma prostate	4
1.3.2. Faktori rizika za karcinom prostate.....	6
1.3.3. Dijagnostika i lečenje karcinoma prostate	7
1.3.4. Standardni prognostički parametri karcinoma prostate	9
1.3.4.1. Prostata-specifični antigen kao biohemijski parametar KP	9
1.3.4.2. Stadijum KP kao vodeći prognostički parametar KP	10
1.3.4.3. Glison skor kao parametar biološkog potencijala KP.....	11
1.4. Molekularna osnova KP	12
1.4.1. Genetičke varijante asociirane sa KP	14
1.4.1.1. Studije genetičkih asocijacija na čitavom genomu (GWAS)	14
1.4.1.2. Studije genetičkih asocijacija bazirane na genima kandidatima.....	16
1.5. Karcinom prostate i RNK interferencija.....	16
1.5.1. MikroRNK i proces RNK interferencije.....	16
1.5.2. Uloga mikroRNK u molekularnoj osnovi KP.....	20
1.5.3. Varijante u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa uključene u patogenezu KP	20
2. Ciljevi rada	24
3. Materijal i metode	25
3.1. Materijal.....	25
3.2. Metode	26
3.2.1. Selekcija bolesnika sa KP prema vrednostima standardnih prognostičkih parametara i riziku za progresiju bolesti.....	26

3.2.2. Izolacija genomske DNK iz periferne krvi i brisa bukalne sluznice	27
3.2.3. Kriterijumi za odabir genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa.....	29
3.2.4. Genotipizacija odabranih genetičkih varijanti u genima za mirkoRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa	30
3.2.4.1. Genotipizacija varijanti rs2910164 u genu za miR-146a i rs7813 u genu <i>GEMIN4</i> korišćenjem TaqMan® eseja za genotipizaciju polimorfizama.....	30
3.2.4.2. Genotipizacija varijanti rs3746444 u genu za miR-499 i rs197414 u genu <i>GEMIN3</i> metodom RFLP	32
3.2.4.3. Genotipizacija varijanti rs11614913 u genu za miR-196a2, rs3742330 u genu <i>DICER1</i> i rs784567 u genu <i>TARBP2</i> metodom analize krivih topljenja visoke rezolucije	35
3.2.4.4. Genotipizacija varijante rs895819 u genu za miR-27a pomoću PCR-a specifičnog za alel.....	41
3.2.4.5. Genotipizacija varijante rs4961280 u genu <i>AGO2</i> pomoću eseja za genotipizaciju baziranog na PCR-u u realnom vremenu uz upotrebu specifičnih proba.....	43
3.2.5. Statistička obrada rezultata.....	45
3.2.5.1. Statistička obrada rezultata genotipizacije u cilju procene potencijalne asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i progresiju KP	45
3.2.5.2. Statistička obrada rezultata genotipizacije u cilju procene potencijalne asocijacije epistatičkih interakcija genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i progresiju KP.....	46
3.2.6. Meta-analiza utvrđenih asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj karcinoma prostate i rezultata prethodnih studija vezanih za maligne tumore.....	48
3.2.6.1. Pretraživanje baze naučnih publikacija PubMed.....	48
3.2.6.2. Procena pogodnosti studija za uključivanje u meta-analizu	49
3.2.6.3. Ekstrakcija podataka iz studija selektovanih za meta-analizu.....	50

3.2.6.4. Procena heterogenosti rezultata selektovanih studija i odabir modela meta-analize	51
3.2.6.5. Kvantitativna sinteza podataka	52
3.2.6.6. Procena prisustva greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije.....	53
4. Rezultati	54
4.1. Rezultati selekcije bolesnika sa KP prema vrednostima standardnih prognostičkih parametara i riziku za progresiju bolesti.....	54
4.2. Rezultati provere količine i kvaliteta izolovane DNK elektroforezom u agaroznom gelu.....	55
4.3. Rezultati odabira genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa	56
4.4. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs7813.....	57
4.5. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs3746444 i rs197414.....	59
4.6. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs11614913, rs3742330 i rs784567	62
4.7. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs895819	64
4.8. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs4961280	65
4.9. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK sa rizikom za razvoj KP	67
4.10. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj KP.....	70
4.11. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP	74
4.12. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP	81
4.13. Rezultati analize potencijalne asocijacije epistatičkih interakcija između ispitivanih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i progresiju KP.....	86
4.14. Rezultati meta-analize utvrđenih asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj karcinoma prostate i rezultata prethodnih studija.....	90

4.14.1. Rezultati pretraživanja baze naučnih publikacija <i>PubMed</i>	90
4.14.2. Rezultati procene pogodnosti studija za meta-analizu.....	90
4.14.3. Rezultati ekstrakcije podataka iz selektovanih studija.....	93
4.14.4. Rezultati kvantitativne sinteze podataka.....	97
4.14.5. Rezultati procene prisustva greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije.....	99
5. Diskusija	105
6. Zaključci	129
7. Literatura	131
8. Prilozi	156

1. Uvod

1.1. Prostata kao egzokrina žlezda muškog polnog sistema

Prostata je inkapsulirana egzokrina žlezda koja funkcioniše u sastavu muškog polnog sistema (1, 2). Smeštena je ispod mokraćne bešike i obuhvata početni deo mokraćnog kanala u koji se izliva njen produkt sekrecije. U sastav prostate ulazi do 50 tubulo-alveolarnih žlezda oko kojih se nalazi fibromuskularna stroma, dok je na površini prostate tanka vezivna kapsula (1-3). Žlezde su kružno organizovane oko mokraćnog kanala u mukozni, submukozni i periferni sloj u čijem sastavu su glavne žlezde (2, 3).

Anatomske celine prostate predstavljaju tri žlezdane zone: centralna, tranziciona i periferna (2-4). Perifernu zonu čini oko 70% žlezdanog tkiva i ona je locirana posterolaterano, od vrha do baze prostate. Centralna zona okružuje ejakulatorne kanale i čini najveći deo baze žlezde, dok je tranziciona zona prisutna u vidu dva lobusa koji okružuju mokraćni kanal (5). Zonalna podela tkiva prostate ima klinički značajnu primenu u kontekstu patoloških promena prostate, usled preferencijalnog razvoja malignih tumora u perifernoj, a benigne hiperplazije prostate (BHP) u tranzicionoj zoni (3-5).

Žlezdani epitel prostate je cilindrični, a u pojedinim delovima kockasti ili pseudostratifikovani i čine ga u najvećoj meri glavne ćelije sa sekretornom funkcijom. Pored njih, žlezdani epitel formiraju i bazalne ćelije, kao i ćelije slične entero-endokrinim (1, 5).

Produkt sekrecije glavnih ćelija se izvodnim kanalima iz alveola žlezda izliva u uretru i predstavlja značajan deo semene tečnosti (2, 3). Svojom funkcijom u stimulaciji pokretljivosti spermatozoida, kao i u neutralisanju kiselosti vaginalne tečnosti, značajno utiče na muški fertilitet. Glavne ćelije prostate proizvode enzime prostatičnu kiselu fosfatazu (eng. *Prostatic Acid Phosphatase*, PAP), fibrinolizin, kao i serin proteaze

među kojima je prostata-specifični antigen (eng. *Prostate-specific Antigen*, PSA). Takođe, produkt sekrecije ovih ćelija sadrži mnogobrojne jone, poput jona cinka i citrata (3, 5).

1.2. Bolesti prostate

Bolesti prostate, putem poremećaja u funkciji ovog žlezdanog organa, ispoljavaju negativan efekat na funkcionisanje urinarnog i reproduktivnog sistema. Među najučestalije svrstavaju se prostatitis, BHP, kao i maligni tumori prostate (6, 7).

1.2.1. Prostatitis

Prostatitis je inflamatorna bolest prostate sa učestalošću od 10-14% kod muškaraca različite starosti i različitim etničkim poreklom. Ujedno, predstavlja najčešće dijagnostikovanu urološku bolest kod muškaraca mlađih od 50 godina. U najvećem broju slučajeva, etiologija prostatitisa nije poznata, dok je 5-10% slučajeva uzrok pojave ove bolesti bakterijska infekcija (8).

Terminom prostatitis obuhvaćeni su sindromi čija se klasifikacija menjala u poslednjim decenijama. Prema kriterijumima američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (eng. *National Institute of Health*, NIH) oni se dele na akutni i hronični bakterijski, sindrom hroničnog bola u karlici i asimptomatski (9). Navedena podela prostatitisa bazirana je na kliničkoj slici bolesnika, kao i na rezultatima analiza prisustva patogenih bakterija i leukocita u sekretu prostate. Među simptome karakteristične za ovu izuzetno heterogenu grupu bolesti svrstava se bol u regionu genitourinarnog trakta, koji je i najčešći razlog za klinički pregled, kao i poremećaji u funkciji urinarnog i reproduktivnog sistema (8).

1.2.2. Benigna hiperplazija prostate

Benigna hiperplazija prostate predstavlja benigno uvećanje prostate usled proliferacije ćelija žlezdanog epitela i strome prostate u okviru tranzicione zone. Ovaj

benigni tumor ne predstavlja premalignu leziju KP, na šta upućuje i razvoj BHP u različitoj zoni u odnosu na onu u kojoj se najčešće razvija maligni tumor prostate (10).

Učestalost BHP, na osnovu podataka dobijenih histološkom analizom bioptiranog materijala, iznosi svega 20% kod muškaraca starosti 40 godina i raste sa starošću do 80-90% kod osoba starijih od 70 godina. Međutim, značajan procenat ostaje asimptomatski tokom života, te se klinički značajnom BHP smatra ona koja izaziva poremećaje u funkciji urinarnog trakta (11). Naime, povećanjem volumena prostate, odnosno njene tranzicione zone, dolazi do potiskivanja zida uretre i smanjenja njenog lumena, usled čega se smanjuje provodljivost urina. Na ovaj način dolazi do „statičke“ urinarne opstrukcije, dok promene u kontrakciji i/ili relaksaciji glatke muskulature prostate dovode do „dinamičke“ opstrukcije (12). Klinička manifestacija urinarnih simptoma u korelaciji je sa intenzitetom i trajanjem opstrukcije protoka urina (6). U retkim slučajevima, usled neležanja, dolazi do komplikacija BHP, poput oštećenja zida mokraćne bešike ili bubrega (6, 13).

Etiologija BHP nije u potpunosti razjašnjena, ali se efekat dva faktora, starosti i androgenih hormona, smatra presudnim za razvoj ove bolesti. Takođe, značaj se pridaje efektu faktora rasta, estrogenih hormona, citokina i inflamatornih medijatora, kao i poremećajima u regulaciji programirane ćelijske smrti i u interakcijama ćelija žlezdanog epitela sa vezivnom stromom (14).

1.2.3. Maligni tumori prostate

Među malignim tumorima prostate, najveću učestalost ima adenokarcinom (KP), koji je zastupljen u oko 95% slučajeva. KP nastaje neoplastičnom transformacijom ćelija žlezdanog epitela prostate, pri čemu maligne ćelije stiču sposobnost izbegavanja procesa apoptoze, kao i sposobnost metastaziranja (15). Sekretorna aktivnost žlezdanih ćelija, a time i morfologija i funkcija prostate, zavisna je od androgenih hormona. U uznapredovalim fazama neoplastične transformacije, preživljavanje i proliferacija malignih ćelija postaju nezavisni od ovih hormona (16).

Drugi tipovi malignih tumora prostate imaju relativno malu učestalost, a odlikuju se kliničkim i histopatološkim osobinama koje ih značajno razlikuju od najčešćeg adenokarcinoma. Na listi Svetske zdravstvene organizacije iz 2004. godine nalazi se više histoloških tipova neacinarnih karcinoma prostate, među kojima su sarkomatoidni karcinom, duktalni adenokarcinom, urotelijalni karcinom, skvamozni i adenoskvamozni karcinom, karcinom bazalnih ćelija, neuroendokrini karcinom, kao i svetloćelijski karcinom. Pored epitelijalnih, maligni tumori prostate mogu biti i mezenhimalnog porekla, odnosno sarkomi, koji su zastupljeni u manje od 0.3% slučajeva neoplazmi prostate (15).

1.3. Karcinom prostate

Adenokarcinom prostate, koji je najučestaliji tip malignih tumora ove žlezde, odlikuje se visokom incidencom, ali i visokim mortalitetom, pogotovu u manje razvijenim zemljama (17). Kada je reč o ekonomski razvijenijim područjima, primena uznapredovalih kliničkih protokola, pre svega skrininga baziranog na određivanju serumskih vrednosti PSA, dovela je do sve češćeg dijagnostikovanja KP u ranim fazama bolesti. Veliki procenat slučajeva KP dijagnostikovanih u ranoj fazi predstavljaju latentni karcinomi koji ne progrediraju u klinički značajne KP i nemaju letalan ishod. Latentne forme KP ne zahtevaju primenu invazivnih terapijskih pristupa već aktivno posmatranje. Prema predikcijama, oko 40% slučajeva KP detekovanih skriningom u SAD čine latentne forme KP, a ovaj procenat u Evropi procenjen je na čak 67% (18). Distinkcija latentnog i klinički značajnog KP u cilju izbegavanja „preterane dijagnoze“ (eng. *overdiagnosis*) i „preteranog lečenja“ (eng. *overtreatment*) KP predstavlja jedan od najvećih izazova u savremenoj kliničkoj praksi (18, 19).

1.3.1. Epidemiologija karcinoma prostate

Adenokarcinom prostate je drugi najučestalije dijagnostikovani maligni tumor kod muškaraca, kao i šesti najučestaliji uzrok smrtnosti od malignih bolesti u svetu, zbog čega predstavlja značajni globalni zdravstveni problem. Takođe, prema podacima GLOBOCAN projekta za 2012. godinu, ovaj karcinom predstavlja najučestaliji maligni

tumor kod muškaraca u razvijenim zemljama. Naime, procenjeno je da je u godini za koju je objavljen izveštaj broj novodijagnostikovanih KP iznosio 1.1 milion, čineći oko 15% svih dijagnostikovanih malignih tumora na globalnom nivou, a čak 70% u razvijenim zemljama (17).

Objašnjenje za navedenu razliku je izrazito variranje u incidenci KP u zavisnosti od geografskog položaja, što je najverovatnije posledica razlika u primeni skrininga baziranog na merenju serumskih vrednosti PSA. Takođe, različite su učestalosti KP, kao i smrtnost od ove bolesti, kod muškaraca različitog etničkog porekla, odnosno kod osoba poreklom iz Evrope, Azije i Afrike. Naime, KP je najučestaliji kod Afroamerikanaca, dok je najmanja učestalost ove bolesti u azijskim populacijama (17, 20) (slika 1.1). Takođe, smrtnost od KP najveća je u populacija poreklom iz Afrike, dok je kod Azijata čak desetostruko manja u odnosu na afričke populacije (17).



Slika 1.1. **Geografska distribucija incidence karcinoma prostate.** Crvenom bojom označeni regioni sa najvišom, a zelenom bojom regioni sa najnižom incidencom KP (Slika dostupna na URL: <http://www.prostatecancerprevention.net/index.php?p=prostate-cancer-world-map>).

Podaci Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, koji se odnose na Centralnu Srbiju, pokazali su da je u 2013. godini dijagnostikovano ukupno 1508 slučajeva KP, dok je deset godina ranije navedena cifra iznosila 1045. U istom periodu, KP po smrtnosti zauzima visoko treće mesto kod muškaraca u populaciji Srbije (21, 22).

1.3.2. Faktori rizika za karcinom prostate

Incidenca KP raste sa starošću, te je ovaj karcinom označen kao bolest starijeg životnog doba. Naime, verovatnoća dijagnostikovanja KP kod muškaraca u sedmoj deceniji života procenjena je na oko 6%, dok kod muškaraca u osmoj deceniji i starijih ona iznosi preko 10% (20). Međutim, poslednje dve decenije verovatnoća razvoja KP kod muškaraca mlađih od 50 godina ima rastući trend (23).

O značaju starosti kao etiološkog faktora KP govore i predikcije da ukoliko bi se životni vek muškaraca produžio iznad sto godina, kod većine bi došlo do razvoja KP. Ove predikcije bazirane su na podacima o rastu incidence KP sa starošću, kao i na autopsijskim nalazima kod muškaraca starijih od 50 godina koji pokazuju pristvo mikroskopskog KP kod oko trećine svih analiziranih slučajeva (24, 25).

Pored starosti i etničkog porekla, značajni faktor rizika za razvoj KP je i pozitivna porodična anamneza. Naime, 5-10% slučajeva KP čine familijarne forme, dok kod bolesnika mlađih od 55 godina ovaj procenat dostiže 40% (26). Takođe, među najcitiranijim podacima koji govore u prilog efektu pozitivne porodične anamneze na rizik za razvoj bolesti su i rezultati studija koje su analizirale pojavu KP kod parova blizanaca. Ovi rezultati ukazuju na visok procenat (oko 20-27%) slučajeva razvoja KP kod oba monozigotna blizanca, i na više od upola manji procenat kada je reč o dizigotnim blizancima (oko 7%) (27-29). Objašnjenje za efekat porodične istorije bolesti na rizik za razvoj KP je u genetičkoj sličnosti, kao i u sličnim faktorima sredine koji utiču na članove iste porodice (30).

Podtip familijarnog KP je nasledni tip ove bolesti koji se karakteriše jasnim naslednim obrascem. Naime, nasledne forme karcinoma uzrokovane su najčešće genetičkim varijantama visoke penetrabilnosti (31). S obzirom na to da nije uvek lako definisati familijarni KP kao nasledni, kriterijumi koji se koriste za određivanje naslednog tipa KP su: tri uzastopne generacije sa KP, dijagnoza KP kod tri srodnika u prvom kolenu, ili dva srodnika kod kojih je dijagnoza KP postavljena pre 55. godine života (32, 33).

Povećani rizik za razvoj KP ustanovljen je ne samo kod bliskih srodnika bolesnika kod kojih je dijagnostikovana ova bolest, već i kod sinova i braće žena sa karcinomom dojke (34). Ovakvi rezultati objašnjavaju se sličnošću genetičke osnove ovih bolesti, koje se ogledaju i u biološkim sličnostima poput inicijalne zavisnosti tumorskog rasta od steroidnih hormona. Slične osobine ove dve maligne bolesti ispoljavaju i u vidu intratumorske sinteze steroidnih hormona (34, 35). Podaci iz studija koje analiziraju familijarni tip KP, a koji ističu značaj porodične istorije, kao i epidemiološki podaci vezani za etničko poreklo bolesnika, ukazuju na značaj genetičkih faktora u patogenezi KP (36). Iako su najčešće forme KP sporadične, koje čine 90-95% svih slučajeva, inicijalne studije koje su analizirale genetičku osnovu KP odnosile su se na familijarni tip bolesti i dovele su do identifikacije prvih genetičkih varijanti asociраниh sa KP (37).

1.3.3. Dijagnostika i lečenje karcinoma prostate

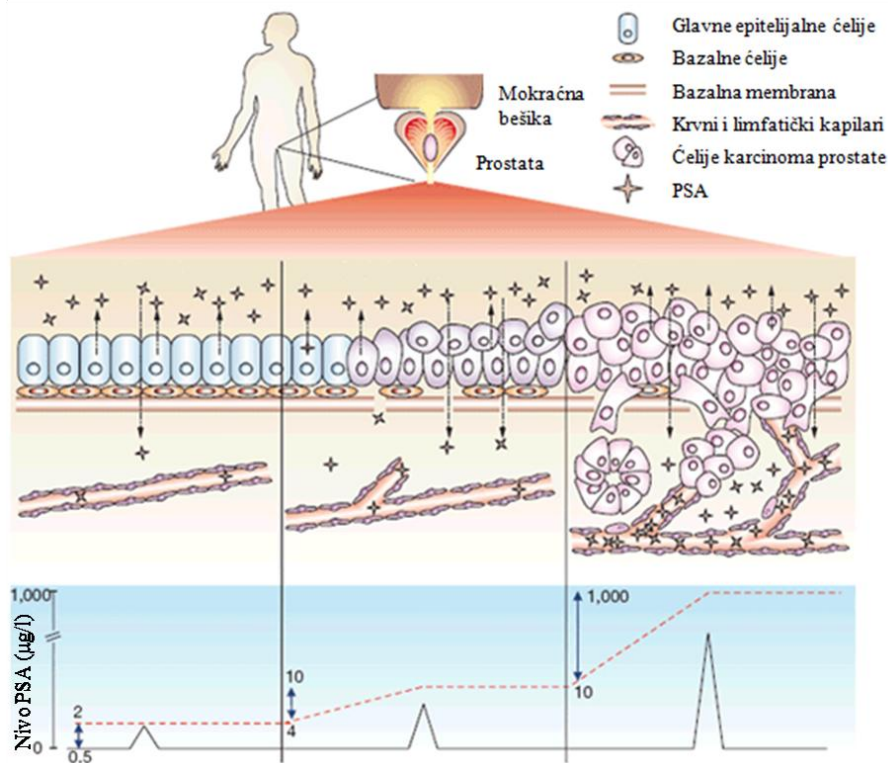
Rana dijagnostika KP primenom savremenih unapređenih dijagnostičkih procedura od izuzetnog je značaja u smislu pravovremene primene najadekvatnije terapije. Standardne metode koje se koriste u dijagnostici KP uključuju digitalni rektalni pregled (eng. *Digital Rectal Examination*, DRE), transrektalni ultrazvučni pregled (eng. *Transrectal Ultrasound*, TRUS), kao i određivanje serumskih vrednosti PSA (15, 38). Definitivna dijagnoza KP se postavlja primenom invazivne dijagnostičke metode, biopsije prostate, i histopatološkom analizom bioptiranog tkiva (15).

Tokom razvoja malignog tumora prostate, uvećanje žlezdanog tkiva ogleda se u povećanju serumske vrednosti PSA usled njegovog pojačanog oslobađanja u krvotok (39). Naime, narušavanjem bazalne membrane, kao i usled pojačane vaskularizacije, pojačana je sekrecija PSA u cirkulaciju (39) (slika 1.2). Međutim, do promene vrednosti navedenog parametra može doći i u drugim patološkim stanjima prostate, poput inflamacije ili prisustva BHP. Stoga, osim sličnošću simptoma bolesti, povećanjem serumske vrednosti PSA i njenim korišćenjem kao biohemijskog biomarkera KP u dijagnostičkoj proceduri otežana je distinkcija malignog i benignog tumora prostate (39, 40). Dakle, iako PSA predstavlja tkivno-specifičan biohemijski marker, nije ujedno i

bolest-specifičan. Kao vrednost praga za detekciju KP koristi se vrednost od 4 ng/ml, a radi povećanja senzitivnosti pojedini istraživači savetuju smanjivanje ove vrednosti na 2.5 ng/ml, pri čemu se istovremeno očekuje veći procenat detektovanih latentnih KP (41, 42).

U cilju povećanja specifičnosti, predložene su različite modifikacije procedure u vidu merenja derivata PSA, kao i određivanja dinamike ovog markera. Među navedene modifikacije spadaju normalizacija serumske vrednosti PSA prema veličini prostate. Ovako određena vrednost PSA naziva se PSA gustina. Kada je reč o parametrima dinamike PSA, određuju se brzina promene (eng. *PSA Velocity*) i vreme udvostručenja (eng. *PSA Doubling time*) bazične vrednosti ovih proteina. U kliničkoj upotrebi je i određivanje slobodne forme PSA (eng. *free PSA*) odnosno njegov odnos prema totalnom PSA (%fPSA). Takođe, moguće je vršiti i određivanje serumskih vrednosti enzimski inaktivnih formi slobodnog PSA kao što su benigni PSA (BPSA), intaktni PSA i pro PSA. Testovi bazirani na određivanju derivata PSA i parametara dinamike još uvek se ne smatraju alternativnim metodama, već dopunskim uz standardno određivanje serumskih vrednosti PSA (39, 43).

Lečenje KP uslovljeno je stadijumom u kome je bolest dijagnostikovana. Modaliteti lečenja KP obuhvataju kako hiruršku i zračnu terapiju, tako i široki spektar medikamentozne androgene supresije. Zbog sve češćeg dijagnostikovanja KP u ranom stadijumu, poslednjih godina, jedan od čestih modaliteta lečenja KP predstavlja i aktivno praćenje bolesnika (44).



Slika 1.2. Povećanje nivoa serumske vrednosti PSA tokom progresije KP. Povaćan nivo PSA u serumu uzrokovan je olakšanim prelaskom ovog molekula u cirkulaciju usled izmena u arhitekturi žlezdanog epitela (Modifikovano iz Kulasingam V & Diamandis EP, 2008)(45).

1.3.4. Standardni prognostički parametri karcinoma prostate

Nakon dijagnostikovanja KP, od izuzetnog značaja u odabiru adekvatnog terapijskog pristupa je procena biološkog potencijala tumora. U tu svrhu koriste se standardni prognostički parametri u koje se ubrajaju serumska vrednost PSA, klinički stadijum primarnog tumora i zbirni Glison gradus (46).

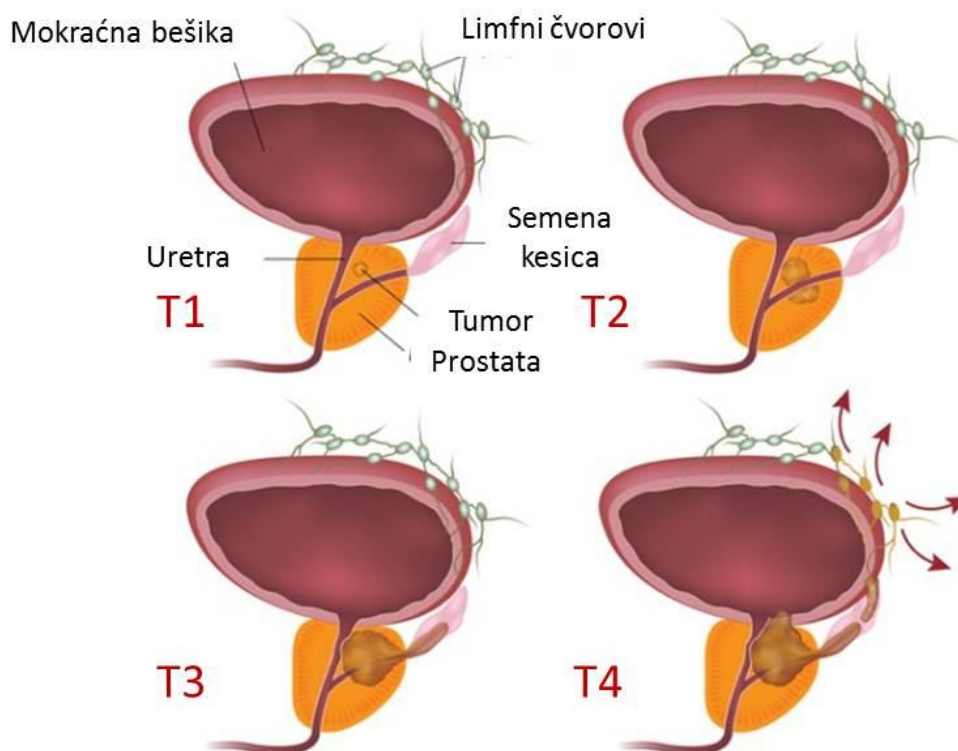
1.3.4.1. Prostata-specifični antigen kao biohemijski parametar KP

Serumska vrednost PSA predstavlja ne samo dijagnostički, već i prognostički parametar KP. Do povećanja ove vrednosti dolazi usled rasta i progresije malignog tumora koji dovode do progresivnog narušavanja arhitekture žlezdanog epitela. Takođe, serumska vrednost PSA koristi se za praćenje odgovora na terapiju i predikciju ishoda primene terapije i preživljavanja bolesnika (47). Sa rastom serumskih vrednosti PSA takođe raste i verovatnoća da histopatološkom analizom tumora bude ustanovljen zbirni

Glison gradus ≥ 7 , a ovaj parametar je u različitim studijama asociran sa veličinom tumora, kao i sa kliničkim stadijumom (39, 48).

1.3.4.2. Stadijum KP kao vodeći prognostički parametar KP

Stadijum KP predstavlja vodeći prognostički parametar. Kliničkim pregledom bolesnika sa KP pomoću metoda DRE i TRUS utvrđuje se klinički stadijum primarnog tumora. U proceni kliničkog stadijuma primarnog tumora koristi se više sistema klasifikacije, a najčešće korišćen je TNM (eng. *Tumour Node Metastasis*, TNM) sistem (slika 1.3). Ujedno, klasifikacija na osnovu ovog sistema preporučena je i od strane Evropskog udruženja urologa (eng. *European Association of Urology*, EAU) (46).



Slika 1.3. **Klinički stadijum KP po TNM (eng. *Tumour Node Metastasis*) sistemu klasifikacije.** Stadijum T1: tumori koji nisu detektabilni kliničkim pregledom i ultrazvukom; Stadijum T2: tumori koji zahvataju jedan ili oba lobusa prostate; Stadijum T3: tumori koji probijaju kapsulu prostate, invadiraju semene kesice i ekstrakapsularne forme; Stadijum T4: karcinomi koji invadiraju okolne organe i tkiva, poput mokraćne bešike. Na slici označenoj stadijumom T4 prokazano je prisustvo malignih ćelija u regionalnim limfnim čvorovima (T4N+) (Modifikovana slika dostupna na URL: http://www.brighamandwomens.org/Departments_and_Services/surgery/services/urology/prostate-cancer.aspx)

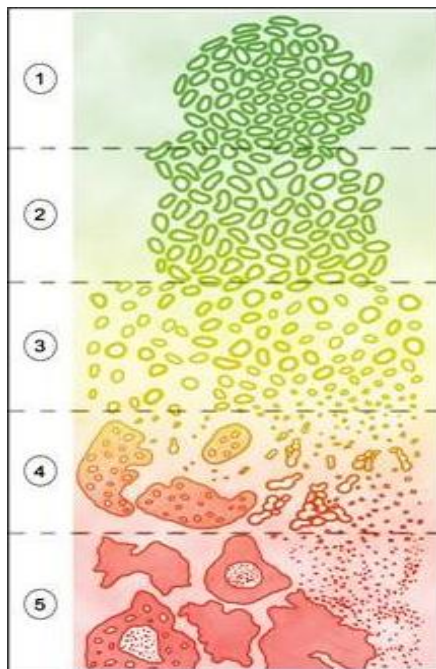
Primarni tumori lokalizovani u okviru prostate označavaju se stadijumima T. U okviru kliničkog stadijuma T definiše se lokalna zahvaćenost prostate tumorom, pri čemu se razlikuju organ-ograničeni (T1-T2 stadijumi) i lokalno uznapredovali KP (T3-T4) (44). Sa T1 označeni su tumori koji nisu detektabilni kliničkim pregledom i ultrazvukom, sa T2 maligni tumori koji zahvataju jedan ili oba lobusa prostate, a sa T3 karcinomi koji probijaju kapsulu prostate, invadiraju semene kesice, kao i ekstrakapsularne forme KP. Višim stadijumom T4 označavaju se karcinomi koji invadiraju okolne organe i tkiva. Na kraju, T0 označava odsustvo malignih tumora (48).

Lokalna uznapredovalost KP procenjuje se i određivanjem N stadijuma KP. Stadijumima N karakteriše se prisustvo (N+), odnosno odsustvo (N0) malignih ćelija KP u regionalnim limfnim čvorovima. Na sličan način određuju se M stadijumi koji se odnose na odsustvo/prisustvo metastaza KP u kostima i drugim udaljenim organima (M0, M+) (48).

1.3.4.3. Glison skor kao parametar biološkog potencijala KP

Glison skor (GS) je parametar koji se određuje histopatološkom analizom bioptiranog tkiva prostate, odnosno mikroskopskom analizom tkiva na malom uvećanju. Promene žlezdane arhitekture uočene na tkivnim presecima porede se sa histološkim slikama tumorskog rasta kojima je dodeljen Glison gradus od 1 do 5 (slika 1.4). Slike tumorskog rasta opisuju veličinu, oblik, diferenciranost žlezda, kao i eventualno prisustvo stromalne invazije adenokarcinoma. Sabiranjem dve najučestalije histološke slike tumorskog rasta dobija se zbirni Glison gradus. Zbirni Glison gradus ili Glison skor ima vrednosti od 2 do 10, pri čemu viši gradusi odgovaraju većim promenama arhitekture žlezdanog tkiva, odnosno manjoj diferenciranosti žlezda, kao i većoj agresivnosti KP (49). Vrlo retko, dodeljeni GS ima vrednost manju od 6, te je vrednost 6 ujedno i najmanja koja se dodeljuje KP i odnosi se na dobro diferencirane žlezde i ujedno bolju prognozu. S druge strane, $GS \geq 8$ dodeljuje se KP sa slabom diferencijacijom žlezda i lošijom prognozom. Kada je reč o $GS=7$, razlikuju se $GS=3+4$ i $GS=4+3$ usled različite zastupljenosti dobro diferenciranih žlezda i različite prognoze, zbog čega je navedenu podelu prihvatila i Svetska zdravstvena organizacija. Naime,

GS=4+3 dodeljuje se tumorima koje odlikuje manja zastupljenost žlezda očuvane morfologije, a veća izmenjenih, kribriformnih ili fuzionisanih žlezda. U slučaju GS=3+4, preovladavaju žlezde sa dobro očuvanom morfologijom i ovaj GS asociiran je sa boljom prognozom u odnosu na GS=4+3 (50).



Slika 1.4. **Glison gradus karcinoma prostate.** Na osnovu kako veličine, oblika i stepena glandularne diferencijacije ćelija i prisustva stromalne invazije KP razlikuje se pet histoloških slika ili gradusa (slika dostupna na URL: <http://prostatecancer.chesapeakeurology.com/about-prostate-cancer/how-is-prostate-cancer-diagnosed>)

S obzirom na ograničenja u primeni standardnih prognostičkih parametara KP u proceni rizika za progresiju bolesti, što je od posebnog značaja u odabiru terapijskih metoda u slučaju klinički indolentnih formi bolesti, brojna istraživanja usmerena su u pravcu otkrića potencijalnih genetičkih markera koji bi se kao nestandardni prognostički parametri koristili u dijagnostici i lečenju KP (51).

1.4. Molekularna osnova KP

Kao i u slučaju drugih malignih bolesti, razvoj i progresija KP karakterišu se progresivnom akumulacijom genetičkih i epigenetičkih promena. Karakterizacija navedenih promena, odnosno definisanje molekularnih mehanizama u osnovi razvoja KP, otežano je činjenicom da se radi o jednom od genetički najheterogenijih malignih tumora (52).

Među najučestalije detektovane somatske mutacije kod KP ubrajaju se mutacije u genima čiji proteinski produkti učestvuju u biosintezi ili metabolizmu androgenih hormona, kao i u genu za androgeni receptor (AR). Mutacije koje utiču na funkciju AR posebno su česte kod uznapredovalih formi KP nezavisnih od androgenih hormona, što ukazuje na njihov značaj u progresiji ove bolesti (52, 53). Pored mutacija u genu za AR, česte su i one locirane u genu *SRD5A2* (eng. *Steroid 5 Alpha-Reductase 2, SRD5A2*), koji kodira glavni enzim koji konvertuje testosteron u dihidrotestosteron (52).

Geni u kojima se takođe često detektuju somatske mutacije kod KP su i važni tumor-supresorski geni poput *PTEN* (eng. *Phosphatase And Tensin Homolog, PTEN*) i *TP53* (eng. *Tumor Protein p53, TP53*), kao i proto-onkogen *c-MYC* (eng. *V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog, c-MYC*). Takođe, česte su somatske mutacije u genima za receptore faktora rasta, komponente signalnog puta MAP kinaze, proteine uključene u zaštitu ćelije od dejstva reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, kao i za faktore uključene u kontrolu progresije ćelijskog ciklusa, proliferacije, preživljavanje ćelija i invazivnosti (52, 53). Pored genskih mutacija, progresiju KP karakterišu i amplifikacije gena, pogotovu *c-MYC* i gena za AR, ali i veliki hromozomski rearanžmani najčešće po tipu translokacija (52).

Glavne epigenetičke promene tokom razvoja i progresije KP su globalno smanjenje metilacije molekula DNK, kao i promene u metilaciji DNK i obrascu modifikacije histona u regionima pojedinačnih gena. Pojava hipometilacije molekula DNK dovodi do aktivacije utišanih proto-onkogenata. Istovremeno, povećava se i aktivnost mobilnih genetičkih elemenata koja uzrokuje pojavu genomske nestabilnosti. Suprotno aktivaciji proto-onkogenata, hipermetilacijom, kao i deacetilacijom N-krajeva repova histonskih proteina, dolazi do inaktivacije tumor-supresornih gena. Navedene epigenetičke promene povezane su i sa izmenjenim obrascima ekspresije brojnih mikroRNK molekula u malignom u odnosu na neizmenjeno tkivo prostate (54).

1.4.1. Genetičke varijante asocirane sa KP

Karcinom prostate predstavlja multifaktorijalnu, poligenski determinisanu bolest. Na razvoj KP utiče veliki broj genetičkih varijanti sa malom penetrabilnošću, epigenetičkih i sredinskih faktora, kao i njihov udruženi efekat. Prvi lokusi asocirani sa KP identifikovani su u studijama koje su izučavale nasledni tip bolesti i oni su označeni kao lokusi sa visokom penetrabilnošću. Međutim, kako su sporadične forme KP znatno učestalije, većina studija koje se bave analizom efekata genetičkih varijanti na rizik za razvoj KP fokusirana je na lokuse sa malom penetrabilnošću (55).

Osim genetičkih varijanti asociranih sa rizikom za razvoj KP, od značaja su i varijante asocirane sa rizikom za progresiju KP. Upotreba navedenih genetičkih markera kao nestandardnih prognostičkih parametara, uz standarne prognostičke parametre, u okviru optimizovanih algoritama za procenu rizika za razvoj ili progresiju KP mogla bi značajno da unapredi kliničke protokole u oblasti KP (51).

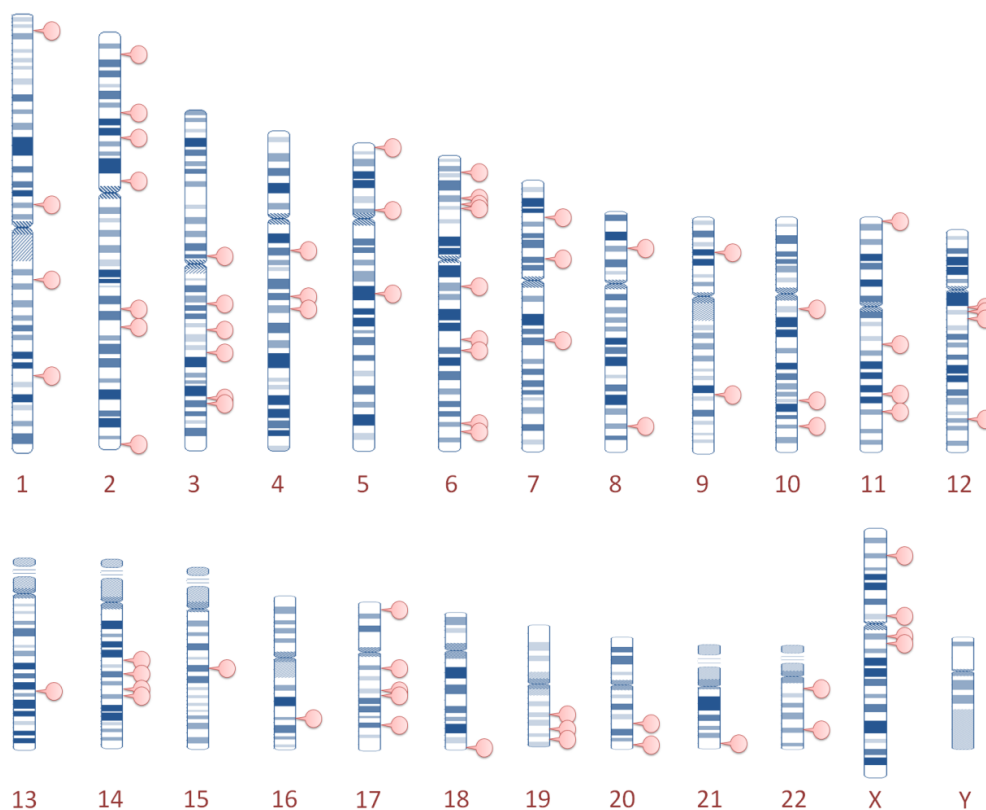
Studije koje se sprovode sa ciljem identifikacije genetičkih varijanti asociranih sa KP dizajnirane su kao studije slučajeva i kontrola ili kao studije koje uključuju samo grupu slučajeva, ukoliko se ispituju genetičke varijante potencijalno asocirane sa rizikom za progresiju KP, parametrima vezanim za ishod terapije ili preživljavanje bolesnika. Najveći broj varijanti asociranih sa rizikom za razvoj KP identifikovan je u studijama genetičkih asocijacija na čitavom genomu (eng. *Genome-Wide Association Study*, GWAS) (56). Međutim, pojedine značajne genetičke varijante asocirane sa KP identifikovane su i u studijama koje su analizirale varijante u genima kandidatima (57).

1.4.1.1. Studije genetičkih asocijacija na čitavom genomu (GWAS)

Projekat Genoma čoveka omogućio je ne samo iščitavanje sekvence molekula DNK, već i metodološke inovacije i unapređenja u vidu eseja za istovremenu analizu veće količine genetičkih podataka, kao i softverskih alata za analizu velikog broja rezultata genotipizacije. Na taj način, obezbeđena je osnova za sprovođenje GWAS,

kako u početnim informacijama za dizajn studije i odabir genetičkih varijanti za analizu, tako i u metodološkom pogledu (58, 59).

Trenutno, broj genetičkih varijanti asociраниh sa KP identifikovanih u GWAS iznosi preko 75 (60, 61) (slika 1.5). Prve GWAS vezane za KP sprovedene su 2007. godine i od tada je najveći broj studija ovog dizajna rađen u populacijama evropskog porekla (60-64). Još u prvim GWAS bila je jasna potreba za velikim grupama ispitanika, a njihovi rezultati upućivali su na pretežnu lokalizaciju genetičkih varijanti asociраниh sa KP u regionima “genskih pustinja”. Odsustvo gena koji kodiraju proteine u navedenim regionima objašnjeno je prisustvom regulatornih elemenata značajnih proto-onkogenih ili tumor-supresorskih gena (65, 66). U skorije vreme, istraživanja su ukazala i na dodatno objašnjenje koje se zasniva na prisustvu gena za nekodirajuće regulatorne molekule RNK u glavnim regionima asociраниm sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP, poput 8q24 (67).



Slika 1.5. Pozicije genetičkih varijanti asociраниh sa KP koje su identifikovane u GWA studijama (68).

1.4.1.2. Studije genetičkih asocijacija bazirane na genima kandidatima

Još pre prvih GWAS sprovedene su studije bazirane na genima kandidatima sa ciljem identifikacije genetičkih varijanti asociраних sa KP. Ovim pristupom, analizirani su brojni geni kandidati i identifikovane su varijante sa malim ili umerenim efektom na rizik za razvoj KP, pri čemu je uspešnost pristupa diskutabilna, usled mnogobrojnih lažno pozitivnih rezultata i izostanka validacije (69).

Geni kandidati birani su na osnovu njihovog značaja u mehanizmima uključenim u procese rasta ćelija prostate, maligne transformacije, kao i metastaziranja. Stoga, analizirane su varijante u genima uključenim u androgenu signalizaciju i kontrolu progresije ćelijskog ciklusa, u važnim proto-onkogenima i tumor-supresornim genima, kao i u genima uključenim u ćelijsku adheziju i komunikaciju sa okolnim ćelijama i komponentama matriksa (70-72).

Iako su počele da se primenjuju pre GWAS, studije sa dizajnom baziranim na genima kandidatima primenjuju se i u savremenim istraživanjima u cilju identifikacije novih asocijacija, kao i validacije ili replikacije rezultata prethodnih studija. Novi geni kandidati proističu iz savremenih saznanja, poput onih o regulatornoj funkciji nekodirajućih molekula RNK i njihovoj ulozi u neoplastičnoj transformaciju ćelija žlezdanog epitela prostate (73).

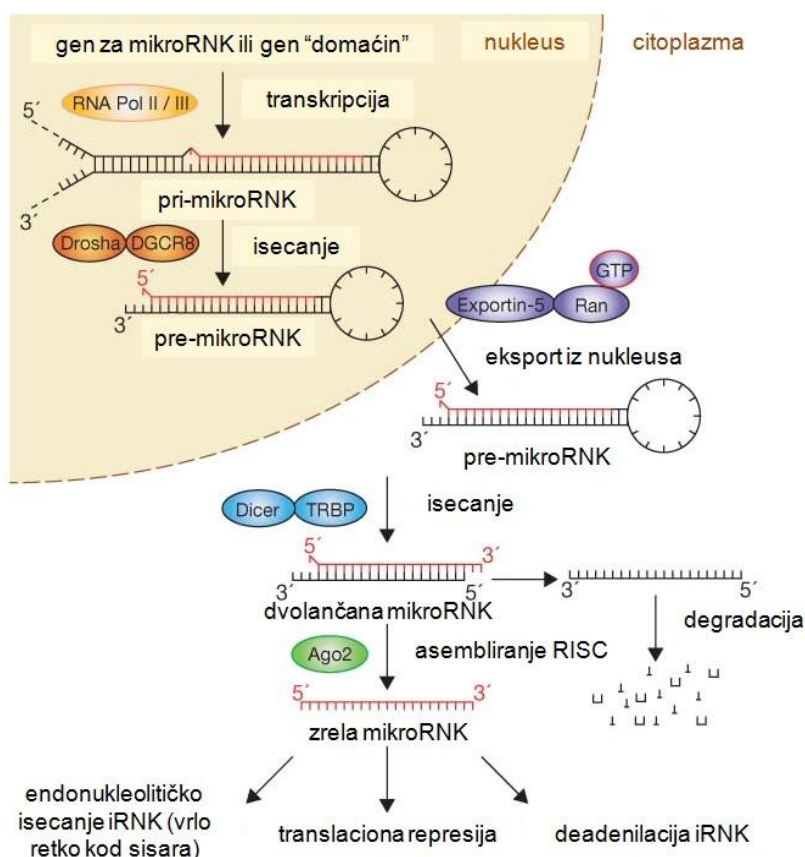
1.5. Karcinom prostate i RNK interferencija

1.5.1. MikroRNK i proces RNK interferencije

RNK interferencija predstavlja proces negativne regulacije ekspresije gena na posttranskripcionom nivou posredovan malim regulatornim RNK molekulima (74). U okviru ovog procesa, regulatornu ulogu obavljaju male nekodirajuće RNK koje odlikuje homologija sekvence sa njihovim ciljnim iRNK. U navedenu grupu malih regulatornih RNK spadaju i mikroRNK, koje svoje regulatorne funkcije obavljaju u sklopu

ribonukleoproteinskog kompleksa označenog kao RNK-indukovani utišavajući kompleks (eng. *RNA-induced Silencing Complex*, RISC) (slika 1.6) (75, 76).

Biosinteza mikroRNK otpočinje transkripcijom njihovog prekursora označenog kao primarna mikroRNK (pri-mikroRNK) sa zasebnih gena koji kodiraju ove molekule ili sa gena za iRNK ili druge nekodirajuće RNK (gen “domaćin”) (77, 78) (slika 1.5). Tipična pri-mikroRNK je dužine preko 1 kb i karakteriše je lokalna struktura „petlje sa drškom“. Ovaj transkript podleže endonukleolitičkom isecanju od strane enzima Drosha u kompleksu sa proteinom DGCR8 (eng. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*, DGCR8), pri čemu se otklanjaju jednolančani segmenti pri-mikroRNK koji se nastavljaju na strukturu „petlje sa drškom“ i nastaje prekursorna mikroRNK (pre-mikroRNK). Drosha, koji je enzim iz familije RNaza III, zajedno sa proteinom DGCR8 koji sadrži dva vezujuća domena za dvolančanu RNK čini mikroprocesorski kompleks (eng. *Microprocessor Complex*). Smatra se da je uloga DGCR8 u okviru ovog kompleksa u obezbeđivanju dodatnih mesta interakcije sa dvolančanim segmentom pri-mikroRNK, što omogućava njenu efikasnu obradu (77).



Slika 1.6. **Biogeneza mikroRNK** (Modifikovano iz Winter J et al., 2009) (79).

Pre-mikroRNK ima strukturu „petlje sa drškom“ i iz jedra ćelije transportuje se u citoplazmu pomoću proteina eksportina 5 (eng. *Exportin 5*, EXP5) koji koristi energiju dobijenu hidrolizom GTP-a (eng. *Guanosine Triphosphate*, GTP). U citoplazmi, enzim Dicer u kompleksu sa TRBP (eng. *TAR RNA Binding Protein*, TRBP) iseca pre-mikroRNK do dvolančane mikroRNK uklanjajući terminalnu petlju. Uloga TRPB je slična ulozi DGCR8 u mikroprocesorskom kompleksu, s obzirom na to da poseduje tri domena za vezivanje za dvolančanu RNK. Ovaj protein funkcioniše kao kofaktor enzima Dicer i povećava efikasnost obrade određenih mikroRNK, ali nije neophodan za obradu pre-mikroRNK. Takođe ima sposobnost modulisanja dužine mikroRNK promenom mesta sečenja Dicer-a (77).

Jedan od lanaca dvolančane mikroRNK, dužine ~22 nukleotida (nt), ugrađuje se u RNK-indukovani utišavajući kompleks nakon čega učestvuje u utišavanju ekspresije iRNK sa kojima ostvaruje komplementarno sparivanje. Lanac zrele mikroRNK koji se inserira u RISC označava se kao vodeći lanac (eng. *leader strand*), dok se drugi lanac naziva prateći lanac (eng. *passenger strand*) (79, 80). Za prateći lanac mikroRNK smatralo se da nema regulatorna svojstva i da se degraduje prilikom uspostavljanja interakcije vodećeg lanca sa RISC, ali je u poslednjim godinama prikupljeno sve više dokaza koji idu u prilog njegovom funkcionalnom značaju u procesu regulacije ekspresije gena, pre svega bazirani na visokom nivou ekspresije u pojedinim tkivima, evolucionoj konzerviranosti sekvence i represiji ekspresije ciljnih gena (81).

Ključne komponente RISC su proteini AGO (eng. *Argonaute*, AGO), Dicer i TRBP koji čine kompleks za uvođenje mikroRNK u RISC (eng. *RISC loading complex*), koji se označava i kao minimalni RISC (76). Utišavajući kompleks u širem smislu čine i proteini GEMIN3 (eng. *Gem (Nuclear Organelle) Associated Protein 3*, GEMIN3) i GEMIN4 (eng. *Gem (Nuclear Organelle) Associated Protein 4*, GEMIN4) (82, 83).

Proteini AGO su centralne komponente RISC koje indukuju translacionu represiju i destabilizaciju molekula ciljne iRNK. Takođe, u slučaju perfektnog sparivanja mikroRNK sa ciljnom iRNK pojedini protein AGO mogu endonukleolitički

degradovati ciljnu iRNK, kao što je često slučaj kod biljaka, a retko kod životinja i čoveka. Proteine koji pripadaju familiji Argonaut karakteriše prisustvo domena PAZ (eng. *Piwi-Argonaute-Zwille*, PAZ), MID (eng. *Middle*, MID) i PIWI, a poseduju i N-terminalni domen. PAZ domen interaguje sa 3'-krajem malih regulatornim RNK, poput mikroRNK, dok domen MID ostvaruje interakciju sa 5'-krajem ovih molekula. Uloga N-terminalnog domena je u inserciji mikroRNK u RISC, kao i u narušavanju sekundarne strukture dvolančanih mikroRNK i drugih malih regulatornih RNK. Domen PIWI poseduje endonukleolitičku aktivnost koja je slaba u odsustvu perfektnog sparivanja mikroRNK sa ciljnim iRNK. Kod čoveka, jedini Argonaut protein koji poseduje endonukleolitičku aktivnost je AGO2. Stoga, AGO2 posreduje i u aktivnostima druge klase regulatornih molekula RNK, malih interferirajućih RNK (eng. *Small Interfering RNA*, siRNA) (77, 82).

GEMIN3 i GEMIN4 predstavljaju pridružene komponente kompleksa koje uspostavljaju interakciju sa mikroRNK čineći ribonukleoproteinske komplekse (eng. *microRNA-Ribonucleoproteins*, miRNPs). Osim toga, ovi proteini su sastavni deo SNM (eng. *Survival of Motor Neurons*, SMN) kompleksa koji ima različite uloge u metabolizmu RNK, uključujući i formiranje RNP-ova (eng. *Ribonucleoproteins*, RNPs), poput komponenti splajsozoma (84). GEMIN3 poseduje RNK-helikaznu aktivnost, te utiče na narušavanje sekundarnih struktura molekula RNK, a potencijalno i na restrukturiranje RNP-ova (83).

Mehanizam utišavanja ekspresije ciljne iRNK zavisi od stepena komplementarnosti sa mikroRNK u sastavu RISC. Naime, perfektno sparivanje, koje se sreće kod biljaka, dovodi do endonukleolitičkog isecanja iRNK podsredstvom AGO. Kod životinja i čoveka, sparivanje nije perfektno i najznačajniji region koji učestvuje u baznom sparivanju označen je kao region „semena“. Stoga, u procesu RNK interferencije posredovane molekulima mikroRNK dolazi do destabilizacije i egzonukleolitičke degradacije ili translacione represije ciljnih iRNK. Osim represivnih mehanizama, molekulima mikroRNK pripisuje se i uloga aktivatora translacije u specifičnim uslovima (85).

1.5.2. Uloga mikroRNK u molekularnoj osnovi KP

Obrasci ekspresije molekula mikroRNK značajno se razlikuju u neoplastično transformisanom tkivu žlezdanog epitela prostate u odnosu na neizmenjeno tkivo, kao i između različitih faza u progresiji KP. Ovi podaci, uz rezultate koji upućuju na promene u ekspresiji proteina uključenih u biogenezu i efektorske funkcije mikroRNK tokom maligne transformacije, govore u prilog značaju procesa RNK interferencije u patogenezi KP (86-93).

Kada je reč o ulogama u razvoju i progresiji malignih bolesti, za brojne mikroRNK određene su ciljne iRNK među kojima su i važni onkogeni i tumor-supresorski geni. Stoga, na osnovu funkcije u regulaciji ekspresije navedenih gena, ove mikroRNK su označene kao onkogene ili tumor-supresorske (94). Osim toga, ovakva karakterizacija potiče i iz ekspresionih analiza koje pokazuju njihovu značajno povećanu, odnosno smanjenu ekspresiju u malignom tkivu u odnosu na neizmenjeno tkivo (95).

Kod KP, onkogeni svojstva potvrđena u većem broju studija poseduju miR-21, miR-221, miR-222, dok se tumor-supresorska svojstva pripisuju miR-15a, miR-16-1, miR-449, miR-34a, kao i članovima *let-7* familije mikroRNK (96).

1.5.3. Varijante u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa uključene u patogenezu KP

Eksperimentalni dokazi o značaju fenomena RNK interferencije u patogenezi KP omogućili su i identifikaciju potencijalno funkcionalnih genetičkih varijanti u genima za mikroRNK asociranih sa KP. Svoj potencijalni efekat ove genetičke varijante mogu ostvarivati putem uticaja kako na biogenezu i stabilnost zrelih mikroRNK, tako i na selekciju i efikasnost u prepoznavanju ciljnih iRNK (97-99).

Prve studije slučajeva i kontrola koje su uključivale varijante u genima za mikroRNK sprovedene su u azijskim populacijama. Dve studije asocijacije varijante

rs2910164 u genu *MIR146A* (*hsa-miR-146a*) sa rizikom za razvoj KP sprovedene u populaciji Han Kineza i kod muškaraca iz Severne Indije dale su suprotne rezultate (100, 101). Međutim, rezultati testova asocijacije navedene varijante sa standardnim prognostičkim parametrima KP nisu bili statistički značajni u ovim studijama. Kasnije, analizirana je varijanta rs3746444 u genu *MIR499A* (*hsa-miR-499*) čija je asocijacija sa rizikom za razvoj i progresiju KP testirana i potvrđena u okviru jedne studije. Osim za ovu varijantu, statistička značajnost dobijena je u istoj studiji i u testu asocijacije varijante rs11614913 u genu *MIR196A2* (*hsa-miR-196a2*) sa KP. S druge strane, navedena studija nije pokazala asocijaciju rs3746444 i rs11614913 sa standardnim prognostičkim parametrima KP (101).

Pretpostavljeni funkcionalni značaj rs2910164 i rs3746444 je u efektu na biogenezu zrele mikroRNK, usled lokalizacije u delu gena koji kodira segment prekursora mikroRNK u regionu ukosnice i posledičnim uticajem na sekundarnu strukturu ovog molekula. S druge strane, navedene genetičke varijante utiču i na sekvencu pratećih lanaca mikroRNK, i to regiona „semena“ koji je najznačajniji za interakciju sa ciljnim iRNK. Sličan mehanizam efekta na sekundarnu strukturu prekursora mikroRNK predložen je za efekat rs11614913 u *hsa-miR-196a2*, pri čemu ova varijanta utiče takođe na sekvencu zaostajućeg lanca, ali ne i u regionu semena (99-102). Na taj način, prisustvo manje učestalog alela navedene genetičke varijante moglo bi da utiče na efikasnost interakcije miR-196a2 sa određenim ciljnim iRNK (101).

Osim u prethodno navedenim studijama koje su analizirale potencijalnu asocijaciju genetičkih varijanti u genima za mikroRNK sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP, *hsa-miR-146a* bila je predmet istraživanja koja su ispitivala potencijalni značaj miR-146a kao tumor-supresorske mikroRNK u KP (103-105). Za navedenu mikroRNK pokazana je izmenjena ekspresija u neoplastično transformisanom u odnosu na neizmenjeno tkivo prostate, a takođe i razlika u nivou ekspresije u ćelijskim kulturama koje odražavaju različite faze u progresiji ovog karcinoma (103, 105). Osim toga, identifikovane su i pojedine ciljne iRNK ove mikroRNK sa značajnim ulogama u patogenezi KP (104-106). O potencijalnoj ulozi u molekularnoj osnovi KP gena *hsa-miR-499* i *hsa-miR-196a2* ima značajno manje podataka, ali je pokazana promena u

nivou ekspresije mikroRNK kodiranih navedenim genima u maligno transformisanom u odnosu na okolno neizmenjeno tkivo žlezdanog epitela prostate (107).

Kada je reč o molekulima mikroRNK sa potencijalno značajnom ulogom u patogenezi KP, ističe se miR-27a. Njena ekspresija regulisana je androgenim hormonima putem mehanizma pozitivne povratne sprege (108). Genetičke varijante u navedenom genu nisu prethodno analizirane u kontekstu potencijalne asocijacije sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP. Međutim, asocijacija rs895819 sa brojnim drugim malignim tumorima ispitivana je u većem broju dosadašnjih studija (109).

Pored varijanti u genima za mikroRNK, značajan efekat na proces RNK interferencije mogu imati i varijante u genima za proteine uključene u njihovu biogenezu, kao i u ostvarivanje efektorskih aktivnosti (99). Jedine genetičke varijante u genima za navedene proteine čija je potencijalna asocijacija sa KP analizirana do sada su varijante locirane u genu *GEMIN4*. Naime, studija sprovedena u populaciji Han Kineza pokazala je asocijaciju dveju varijanti u ovom genu sa rizikom za razvoj i progresiju KP (110). Za egzonsku varijantu rs7813 u genu *GEMIN4* ustanovljena je asocijacija manje učestalog alela G sa smanjenim rizikom za razvoj KP, kao i sa smanjenim rizikom za progresiju KP (110).

Iako do sada nije analiziran efekat genetičkih varijanti u genima za druge proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP, pojedine genetičke varijante u navedenim genima ističu se kao kandidati za studije genetičkih asocijacija vezane za KP na osnovu prethodno ustanovljenih asocijacija sa drugim malignim tumorima. Među njih se ubrajaju potencijalno funkcionalne genetičke varijante rs3742330 u 3'-UTR-u (eng. *Untranslated Region*, UTR) gena *DICER1*, rs784567 u promotoru gena *TARBP2* (eng. *TAR (HIV-1) RNA Binding Protein 2*, TARBP2), rs4961280 u genu *AGO2*, kao i egzonska varijanta rs197414 u genu *GEMIN3*.

Većina studija asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP bazirala se isključivo na proceni efekata pojedinačnih varijanti, ili

eventualno haplotipova. U navedenu grupu studija svrstavaju se i prethodne studije slučajeva i kontrola koje su uključivale varijante u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa (100, 101, 110). Međutim, uz ovakav dizajn studija mogu se prevideti potencijalno značajni efekti epistatičkih interakcija (111, 112). Eventualno detektovane interakcije genetičkih varijanti značajne su zbog korekcije tokom optimizacije budućih algoritama za procenu rizika za razvoj i progresiju KP baziranih na primeni genetičkih markera. Takođe, statističke epistaze potencijano mogu reflektovati realne biološke epistaze (113) i ukazati na značaj interakcija pojedinih gena u molekularnoj osnovi KP.

Jedan od načina za izvođenje zaključka o efektima genetičkih varijanti na rizik za razvoj i/ili progresiju malignih bolesti, uključujući i KP, jeste kvantitativna sinteza podataka, odnosno sprovođenje meta-analiza. Uz odgovarajući dizajn, kroz meta-analize mogu biti detektovani i efekti etničkog porekla ispitanika, načina njihovog regrutovanja (iz opšte populacije ili bolnica), kao i tipa malignog tumora na rezultate studija, što je od značaja za tumačenje njihovih podudarnosti i odstupanja.

S obzirom na mali dosadašnji broj studija koje analiziraju potencijalni doprinos varijanti u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa riziku za razvoj i progresiju KP, neophodne su dodatne studije kako bi se rasvetlio njihov efekat. Takođe, dosadašnje analize uključivale su relativno mali broj ispitanika, što dodatno ukazuje na neophodnost daljih istraživanja u ovoj oblasti. Kako su sve navedene studije sprovedene u azijskim populacijama, uz jedinstvene ili suprotne rezultate, usled potencijalnih međupopulacionih genetičkih razlika ukazala se potreba za sprovođenje studija asocijacije i u evropskim populacijama. Takođe, usled funkcionalne povezanosti produkata gena u kojima se nalaze, od značaja je procena eventualnih statističkih epistatičkih interakcija među navedenim genetičkim varijantama. Meta-analiza novodobijenih rezultata, kao i rezultata prethodnih studija koje se odnose na KP i druge maligne tumore od izuzetne je važnosti za procenu efekata različitih faktora koji mogu uticati na razlike i sličnosti rezultata, poput etničkog porekla učesnika u studijama slučajeva i kontrola.

2. Ciljevi rada

1. Ispitati moguću asocijaciju varijanti u genima za mikoRNK (miR-146a, miR-499, miR-196a2 i miR-27a) sa rizikom za razvoj KP.
2. Ispitati moguću asocijaciju varijanti u genima za mikoRNK (miR-146a, miR-499, miR-196a2 i miR-27a) sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.
3. Ispitati moguću asocijaciju varijanti u genima za mikoRNK (miR-146a, miR-499, miR-196a2 i miR-27a) sa rizikom za progresiju KP.
4. Ispitati moguću asocijaciju varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa (*DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* i *GEMIN4*) sa rizikom za razvoj KP.
5. Ispitati moguću asocijaciju varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa (*DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* i *GEMIN4*) sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP.
6. Ispitati moguću asocijaciju varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa (*DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* i *GEMIN4*) sa rizikom za progresiju KP.
7. Ispitati efekat potencijalnih statističkih epistatičkih interakcija između varijanti u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa na rizik za razvoj i/ili progresiju KP.
8. Sprovesti meta-analizu rezultata studija asocijacije varijanti u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa na rizik za razvoj KP i drugih malignih tumora.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

U analizi asocijacije varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj i progresiju karcinoma prostate (KP) u Srbiji korišćeni su uzorci periferne krvi bolesnika koji su u periodu od 2009. do 2013. godine lečeni u Klinici za urologiju Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović - Dedinje“. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost Etičkog odbora Kliničko-bolničkog centra „Dr Dragiša Mišović - Dedinje“ u Beogradu (broj 01-1907/17 od 11.02.2011. i 18-5309/29 od 17.04.2013. godine). Analizirano je 355 uzoraka periferne krvi bolesnika sa KP, 360 uzoraka periferne krvi bolesnika sa benignom hiperplazijom prostate (BHP), kao i 318 uzoraka brisa bukalne sluznice muškaraca kod kojih nisu dijagnostikovane bolesti prostate i koji su činili kontrolnu grupu. Grupa bolesnika sa BHP predstavljala je u ovom istraživanju superkontrolnu grupu. Od bolesnika sa KP i BPH uzorkovano je po 5 ml periferne krvi sa natrijum-citratom koji je korišćen kao antikoagulans u finalnoj koncentraciji 0.38%. Od zdravih volontera iz opšte populacije koji su činili kontrolnu grupu uzorkovano je po dva brisa bukalne sluznice. Uzorci krvi i bukalni brisevi čuvani su na temperaturi od -20°C.

Dijagnostika KP i BPH izvršena je prema standardnom kliničkom protokolu koji uključuje: digitalni rektalni pregled prostate, transrektalni ultrazvuk, ultrazvuk abdomena i karlice, radiografiju i scintigram kostiju, određivanje serumske vrednosti PSA i biopsiju prostate. Serumske vrednosti PSA određene su monoklonskim imunoesejem *Hybritech* metodom (*Beckman Hybritech assay*; Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, SAD). Kod svih bolesnika analiziran je status regionalnih limfnih čvorova, a kod bolesnika kod kojih je izvršena biopsija prostate, tkivo prostate je histološki obrađeno prema topografskoj shemi. Patohistološkim izveštajem obuhvaćeni su standardni parametri za prijavljivanje KP. Klinički stadijum KP određivan je po TNM sistemu klasifikacije. Iz parafinskih kalupa obrađenog tkiva prostate, na

standardnom hematoksilin-eozin (H&E) bojenju, određen je histološki tip, Gleason skor (zbirni od 2 do 10) i patohistološki stadijum KP.

3.2. Metode

3.2.1. Selekcija bolesnika sa KP prema vrednostima standardnih prognostičkih parametara i riziku za progresiju bolesti

Bolesnici sa KP selektovani su u grupe prema vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP. Na osnovu kriterijuma koje su predložili *D'Amico* i saradnici (114), a koje preporučuje Evropsko udruženje urologa (48), formirane su tri grupe bolesnika sa KP na osnovu serumske vrednosti PSA: prvu grupu činili su bolesnici sa serumskim vrednostima PSA manjim od 10 ng/ml, drugu grupu činili su bolesnici sa serumskim vrednostima PSA u granicama od 10 do 20 ng/ml i treću grupu činili su bolesnici sa serumskim vrednostima PSA većim od 20 ng/ml. Bolesnici sa KP podeljeni su i u tri grupe sa različitim vrednostima GS: prvu sa $GS < 7$, drugu sa $GS = 7$ i treću sa $GS > 7$. Na osnovu kliničkog stadijuma primarnog tumora, bolesnici su svrstavani u grupu sa stadijumom T1, grupu sa stadijumom T2 i grupu sa stadijumom T3 ili T4 primarnog KP. Na kraju, na osnovu prisustva odnosno odsustva metastaza KP u kostima i drugim udaljenim organima, bolesnici su svrstavani u dve grupe (M0 i M+) (48).

Bolesnici sa KP selektovani su u tri grupe sa različitim rizikom za progresiju KP prema kriterijumima *D'Amico*-a i saradnika: grupu bolesnika sa niskim rizikom za progresiju KP (serumske vrednosti PSA < 10 ng/ml, $GS < 7$ i klinički stadijum T1-T2b), grupu bolesnika sa srednjim rizikom za progresiju KP (serumske vrednosti PSA između 10 i 20 ng/ml ili $GS = 7$ ili stadijum T2c) i grupu bolesnika sa visokim rizikom za progresiju bolesti (serumske vrednosti PSA > 20 ng/ml ili $GS > 7$ ili klinički stadijum T3 ili T4) (114). Bolesnici sa metastazama, bez obzira na vrednosti standardnih prognostičkih parametara, svrstavani su u grupu bolesnika sa visokim rizikom za progresiju KP.

Selekcija bolesnika sa KP prema riziku za progresiju bolesti vršena je i prema preporukama *Medeiros*-a i saradnika prema kojima su bolesnici svrstavani u dve grupe: grupu sa niskim (GS <7 i klinički stadijum primarnog KP T1 ili T2) i grupu sa visokim rizikom (GS >7 ili stadijum primarnog KP T3 ili T4, ili prisustvo metastaza u kostima) (115).

3.2.2. Izolacija genomske DNK iz periferne krvi i brisa bukalne sluznice

Izolacija genomske DNK iz periferne krvi i briseva bukalne sluznice vršena je korišćenjem komercijalnog seta *QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*, Hilden, Nemačka).

Procedura izolovanja DNK iz pune periferne krvi sprovedena je prema protokolu proizvođača:

1. U *Eppendorf* mikrotube zapremine 1.5 ml pipetirano je po 20 µl proteinaze K, 200 µl AL pufera i 200 µl periferne krvi;
2. Smeša je vorteksovana 15 sekundi, zatim inkubirana 10 minuta na temperaturi od 56°C i centrifugirana na 8000 rpm (eng. *rotation per minute*, rpm) 1 minut (*Labofuge 400R*, rotor 3324, *Heraus Instruments*, Hanau, Nemačka);
3. Dodavano je 200 µl etanola (96%) u smešu, koja je zatim vorteksovana 15 sekundi i centrifugirana na 8000 rpm 1 minut;
4. Po 620 µl smeše presipano je u obeležene kolonice i centrifugirano na 8000 rpm 1 minut;
5. Kolektorske tubice sa filtratom su odbacivane, a kolonice su prenošene u nove kolektorske tubice, dodavano je po 500 µl AW1 pufera i smeša je centrifugirana na 8000 rpm 1 minut;
6. Kolektorske tubice sa filtratom su odbacivane, a kolonice su prenošene u nove kolektorske tubice, dodavano je po 500 µl AW2 pufera i smeša je centrifugirana na 13000 rpm 3 minuta;
7. Kolektorske tubice sa filtratom su odbacivane, a kolonice su prenošene u nove *Eppendorf* mikrotube zapremine 1.5 ml i dodavano je po 200 µl dejonizovane vode kojom je vršena elucija DNK sa membrane kolonice;

8. Smeša je inkubirana 5 minuta na temperaturi od 15°C do 25°C, a zatim je centrifugirana na 8000 rpm 1 minut;
9. Izolovana DNK čuvana je na temperaturi od 4°C do analize, a zatim na temperaturi od -20°C.

Procedura izolovanja DNK iz briseva bukalne sluznice sprovedena je prema protokolu proizvođača a koji se razlikuje od protokola za izolaciju DNK iz pune periferne krvi po početnim koracima koji uključuju isecanje vrhova drvenih štapića sa vatom na kojoj su se nalazili uzorci ćelija bukalne sluznice i smeštanje u *Eppendorf* mikrotube zapremine 1.5 ml u koje je zatim pipetirano 300 µl pufera TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8.0), 300 µl AL pufera i 20 µl proteinaze K. Takođe, elucija DNK sa membrane kolonice vršena je sa 80 µl dejonizovane vode i centrifugiranjem na 13000 rpm 1 minut nakon inkubacije u trajanju od 5 minuta na temperaturi od 15°C do 25°C.

Količina i kvalitet izolovane DNK proveravani su elektroforezom na agaroznom gelu koncentracije 0.8%. Po 5 µl izolovane DNK nalivano je na agarozni gel pomešano sa puferom za nalivanje uzoraka. Koncentracija izolovane DNK procenjivana je poređenjem intenziteta fluorescencije analiziranih uzoraka DNK i serije koncentracija standarda K562 DNK (humana genomska DNK; *Promega*, SAD). Kvalitet izolovane DNK određivan je posmatranjem DNK na gelu, pri čemu je prisustvo diskretnih traka ukazivalo na to da je izolovana DNK nativna, dok je degradovana DNK formirala razmaz (eng. *smear*) na agaroznom gelu nakon elektroforeze (116).

Priprema agaroznog gela i elektroforeza vršeni su po sledećem protokolu:

1. 0.8% rastvor agaroze (*Serva*, Nemačka) u 0.5XTBE puferu (0.045 M Tris-borat, 0.001 M EDTA, pH 8.0) zagrevan je do ključanja dok rastvor nije postao potpuno bistar;
2. Dodavan je Et-Br u finalnoj koncentraciji od 0.5 µg/ml i rastvor je hlađen do temperature od ~50°C;
3. Ohlađen rastvor nalivan je u kadicu za elektroforezu i gel je ostavljan da polimerizuje na sobnoj temperaturi;

4. Uzorci i standard za količinu DNK mešani su sa puferom za nalivanje uzoraka (0.25% bromfenol-plavo, 50% glicerol, 1 mM EDTA) u odnosu 5:1 i nanošeni na gel;
5. Elektroforeza je vršena u 0,5XTBE puferu (0.045 M Tris-borat, 0.001 M EDTA, pH 8.0) 10 minuta na konstantnom naponu od 100 V u sistemu za elektroforezu (*Wide Mini-Sub[®] Cell GT, BioRad, SAD*);
6. Po završetku elektroforeze, gel je vađen iz sistema za elektroforezu, izlagan UV svetlu ($\lambda=254$ nm) na transiluminatoru (*Mini-transiluminator, BioRad, SAD*) i fotografisan.

3.2.3. Kriterijumi za odabir genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa

Osnovni kriterijum za odabir gena kandidata i genetičkih varijanti za ovu studiju bio je njihov potencijalni funkcionalni značaj. Genetičke varijante u genima za mikroRNK birane su za analizu ukoliko su ispunjavale minimum tri, dok je za varijante u genima za komponente utišavajućeg kompleksa uslov bio ispunjenje minimum jednog od sledećih kriterijuma:

- a) Urađene su prethodno studije asocijacije ovih genetičkih varijanti sa KP u drugim populacijama;
- b) Potvrđena je njihova asocijacija sa rizikom za razvoj i/ili progresiju drugih malignih tumora čoveka;
- c) Pokazana izmenjena ekspresija gena u malignim ćelijama u odnosu na neizmenjene ćelije žlezdanog epitela prostate;
- d) Nalaze se u genima za miRNK koje utiču na androgenu signalizaciju.

Kada je reč o proteinima utišavajućeg kompleksa, razmatrane su varijante iz jednog gena za proteine iz familije Argonaut (*AGO2*). Ukoliko je u određenom genu pronađen veći broj varijanti koje ispunjavaju zadate kriterijume, birana je samo jedna na osnovu statističke značajnosti rezultata iz prethodnih studija.

3.2.4. Genotipizacija odabranih genetičkih varijanti u genima za mirkoRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa

Genotipizacija varijanti rs2910164 u genu za miR-146a i rs7813 u genu *GEMIN4* vršena je korišćenjem TaqMan® eseja za genotipizaciju (eng. *Taqman® SNP Genotyping Assay*) (*Applied Biosystems*, Foster City, Kalifornija, SAD). Varijante rs3746444 u genu za miR-499 i rs197414 u genu *GEMIN3* genotipizovane su pomoću metode analize polimorfizama u dužini restrikcionih fragmenata (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP). Za određivanje genotipova varijanti rs11614913 u genu za miR-196a2, rs3742330 u genu *DICER1* i rs784567 u genu *TARBP2* primenjena je metoda analize krivih topljenja visoke rezolucije (*High Resolution Melting Analysis*, HRMA), dok je rs895819 u genu za miR-27a genotipizovana pomoću PCR-a specifičnog za alel (eng. *Allele-specific PCR*). Genotipizacije varijante rs4961280 u genu *AGO2* vršena je pomoću eseja za genotipizaciju baziranog na PCR-u u realnom vremenu uz upotrebu specifičnih proba (*Primerdesign Ltd*, Southampton, VB).

3.2.4.1. Genotipizacija varijanti rs2910164 u genu za miR-146a i rs7813 u genu *GEMIN4* korišćenjem TaqMan® eseja za genotipizaciju polimorfizama

Za genotipizaciju genetičke varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* korišćen je komercijalno dostupan esej C_15946974_10 (*Applied Biosystems*, SAD), dok je genetička varijanta rs7813 u genu *GEMIN4* genotipizovana pomoću eseja C_2988802_40 (*Applied Biosystems*, SAD). PCR reakcija vršena je na plejtu sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*, SAD) prekrivenom optičkom adhezivnom folijom (MicroAmp® Optical Adhesive Film, *Applied Biosystems*, SAD) u mašini za PCR u realnom vremenu (7500 Fast System, *Applied Biosystems*, SAD). Reakciona smeša za alelsku diskriminaciju svakog uzorka pripremana je prema protokolu proizvođača u finalnoj zapremini od 10 µl. Sastav ove smeše prikazan je u tabeli 3.1. Temperaturni profil PCR reakcije prikazan je na slici 3.1.

Tabela 3.1. Sastav reakcione smeše za pojedinačnu PCR reakciju u okviru genotipizacije varijanti rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* i rs7813 u genu *GEMIN4* korišćenjem Taqman[®] eseja za genotipizaciju polimorfizama.

Komponenta	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina u reakcionoj smeši
SNP Genotyping Assay Mix	40 X	1 X	0.25 µl
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase [®] UNG (Applied Biosystems, SAD)	2 X	1 X	5 µl
Voda bez nukleaza (<i>Qiagen</i> , Nemačka)			3.75 µl
Genomska DNK			1 µl (2.5-25 ng)



Slika 3.1. Temperaturni profil PCR reakcije u okviru genotipizacije varijanti rs2910164 u genu *hsa-miR 146a* i rs7813 u genu *GEMIN4* korišćenjem Taqman[®] eseja za genotipizaciju polimorfizama.

Nivoi fluorescencije svake PCR smeše očitavani su i beleženi u okviru odgovarajućeg dokumenta pre („AD Pre-Read” dokument), za vreme („AD Amplification” dokument) i nakon („AD Post-Read” dokument) PCR amplifikacije pomoću odgovarajućeg softvera (*7500 Fast System SDS Software*, Applied Biosystems, SAD). Očitavanjem fluorescencije PCR reakcionih smeša pre amplifikacije dobijani su podaci o osnovnoj fluorescenciji prajmera i proba. Ovi rezultati automatski su oduzimani od detektovanog intenziteta fluorescentnog signala tokom očitavanja fluorescencije PCR reakcionih smeša posle amplifikacije. Na osnovu podataka dobijenih u ovom očitavanju svakom uzorku je dodeljivan genotip automatski ili manuelno.

Registrovan značajni porast fluorescencije talasne dužine koja odgovara reporterskoj fluoroboji jedne od korišćenih TaqMan[®] proba upućivao je na homozigotnost alela analizirane genetičke varijante. U slučaju heterozigotnih genotipova registrovan je značajni porast fluorescencije koja odgovara korišćenom paru proba. Rezultati očitavanja intenziteta fluorescencije u toku amplifikacije korišćeni su za proveru dodeljivanja genotipova, analizu toka PCR reakcije i identifikaciji uzroka neuspešnih genotipozacija. Dobijeni rezultati genotipozacije prikazivani su u tabelarnoj formi, kao i u vidu dijagrama na kom se na X osi nalaze vrednosti intenziteta fluorescentne boje koja odgovara jednom alelu, a na Y osi vrednosti intenziteta fluorescentne boje koja odgovara drugom alelu.

3.2.4.2. *Genotipizacija varijanti rs3746444 u genu za miR-499 i rs197414 u genu GEMIN3 metodom RFLP*

Fragmenti DNK koji okružuju ispitivane genetičke varijante umnožavani su lančanom reakcijom polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), a zatim je vršena RFLP analiza. Osnovne karakteristike prajmera korišćenih u PCR reakcijama kojima su umnožavani fragmenti DNK koji sadrže genetičke varijante rs3746444 i rs197414 prikazane su u tabeli 3.2, dok je sastav PCR reakcione smeše dat u tabeli 3.3.

Tabela 3.2. Osnovne karakteristike prajmera korišćenih u PCR reakcijama kojima su umnožavani fragmenti DNK koji okružuju varijante rs3746444 u genu *hsa-miR-499* i rs197414 u genu *GEMIN3*.

Oznaka	Sekvenca	Dužina
rs3746444 fw	5'-CAAAGTCTTCACTTCCCTGCCA-3'	22 bp
rs3746444 rv	5'-GATGTTTAACTCCTCTCCACGTGA-3'	24 bp
rs197414 fw	5'-TCTTCCCAGAGCAAAGGAAA-3'	20 bp
rs197414 rv	5'-TGGTGGTTGTTCCAAAGAAA-3'	20 bp

Prajmeri korišćeni za PCR reakciju (*Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, Njujork, SAD*) kojom je umnožavan fragment DNK koji okružuje rs3746444 preuzeti su iz prethodno objavljene studije (117). Dizajn prajmera korišćenih u PCR

reakciji kojom je umnožavan fragment DNK koji okružuje rs197414 sproveden je pomoću programa Primer3 (*Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge, Masačusets, SAD) (118). Referentne sekvence gena preuzete su iz baze podataka Ensembl. Prajmeri su označeni kao „fw“ (eng. *forward*) i „rv“ (eng. *reverse*) kako bi se naznačilo da se sinteza DNK koja otpočinje sa njihovog 3' kraja odvija u suprotnim pravcima usled antiparalelne orijentacije matičnih lanaca DNK. Očekivana dužina produkta PCR amplifikacije regiona DNK koji okružuje rs3746444 bila je 146 bp, dok u je slučaju genetičke varijante rs197414 ova dužina iznosila 111 bp.

Tabela 3.3. Sastav reakcionih smeša za PCR reakcije kojima su umnožavani fragmenti DNK koji okružuju genetičke varijante rs3746444 u genu *hsa-miR-499* i rs197414 u genu *GEMIN3*.

Komponenta PCR reakcione smeše	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (za pojedinačnu reakciju)
PCR pufer A sa 15 mM MgCl ₂ (<i>Kapa Biosystems</i> , SAD)	10X	1X	1.5 µl
dNTP (<i>Fermentas</i> , SAD)	10 mM	200 µM	0.3 µl
Fw prajmer	10 µM	0.3 µM	0.45 µl
Rv prajmer	10 µM	0.3 µM	0.45 µl
Taq polimeraza (<i>Kapa Biosystems</i> , SAD)	5 U/µl	0.067 U/µl (1U)	0.2 µl
Genomska DNK			2 µl (5-50 ng)
Dejonizovana voda (<i>Serva</i> , Westbury, Njujork, SAD)			10.1 µl

Optimizovani temperaturni profili PCR reakcija prikazani su na slici 3.2. Reakcija PCR-a izvođena je pomoću mašine Veriti[®] Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD).



Slika 3.2. Temperaturni profili PCR reakcija za amplifikaciju regiona koji okružuju genetičke varijante rs3746444 u genu *hsa-miR-499* i rs197414 u genu *GEMIN3*.

Produkti umnožavanja DNK proveravani su elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu koji je pravljen u 0.5XTBE puferu (0.045 M Tris-borat, 0.001 M EDTA, pH 8.0). U 100 ml gela dodavano je 2 µg boje Midori Green za gel (*Midori Green DNA Stain, Nippon Genetics, Dueren, Nemačka*) ili Et-Br radi vizuelizacije DNK posmatranjem gela na transiluminatoru na talasnoj dužini svetlosti od 254 nm.

Elektroforeza je izvođena u 0.5XTBE puferu (0.045 M Tris-borat, 0.001 M EDTA, pH 8.0) pod naponom od 100 V i pri intenzitetu struje od 400 mA. Po 5 µl PCR produkata nalivano je na agarozni gel pomešano sa 1 µl pufera za nalivanje uzoraka sa bojom Midori Green (*Midori Green Direct, Nippon Genetics, Dueren, Nemačka*) ukoliko su uzorci nalivani na gel sa Midori Green bojom (*Midori Green DNA Stain, Nippon Genetics, Dueren, Nemačka*), ili sa 1 µl pufera za nalivanje uzoraka (0.25% bromfenol-plavo, 50% glicerol, 1 mM EDTA) kada su nalivani na gel sa Et-Br. Za određivanje dužine umnoženog fragmenta DNK korišćeni su DNK standardi za dužinu (*GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder* ili *pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, Fermentas, Nemačka*), nalivani na gel u zapremini od 1 µl. Procedura pripreme gela, elektroforeze i vizuelizacije fragmenata DNK opisana je u odeljku 3.2.2.

Po 10 µl PCR produkata korišćeno je za pripremu reakcione smeše za restrikcionu digestiju. Ova smeša sadržala je i 1 U odgovarajućeg restrikcionog enzima (*Fermentas, Hunover, Maryland, SAD*), pufera u finalnoj koncentraciji 1X i dejonizovanu vodu (*Serva, Westbury, Njujork, SAD*). Osnovne karakteristike restrikcionih enzima korišćenih za genotipizaciju genetičkih varijanti rs3746444 i

rs197414 prikazane su u tabeli 3.4. Restrikciona digestija PCR produkata vršena je preko noći inkubacijom na optimalnoj temperaturi za rad enzima.

Tabela 3.4. Karakteristike restrikcioni enzima korišćenih za genotipizaciju genetičkih varijanti rs3746444 (BclI) i rs197414 (MboI)

Enzim	Restrikciono mesto ^a	Pufer	Temp. (°C)
BclI	5'- T↓G A T C A -3'	Buffer G	55
	5'- A C T A G↑T -3'		
MboI	5'-↓G A T C -3'	Buffer R	37
	5'- C T A G↑-3'		

^a alelske varijante koje kreiraju restrikciono mesto prikazane su podebljanim slovima

Produkti restrikcione digestije razdvajani su elektroforezom u 3% agaroznom gelu. Procedura pripreme gela, elektroforeze i vizuelizacije fragmenata DNK opisana je u poglavlju 3.2.2.

Genotip analiziranih uzoraka određivan je interpretacijom rezultata elektroforeze. Za genotip GG genetičke varijante rs3746444 očekivano je prisustvo traka veličine 120 i 26 bp, za genotip GA tri trake veličine 146, 120 i 26 bp, a za genotip AA samo jedne trake veličine 146 bp. Očekivane dužine restrikcioni produkata za genotip CC genetičke varijante rs197414 bile su 84 i 27 bp, za genotip CA 111, 84 i 27 bp, a za genotip AA 111 bp.

3.2.4.3. Genotipizacija varijanti rs11614913 u genu za miR-196a2, rs3742330 u genu DICER1 i rs784567 u genu TARBP2 metodom analize krivih topljenja visoke rezolucije

Metoda HRMA zasniva se na analizi krivih topljenja produkata PCR reakcije i omogućena je razvojem unapređenih saturišućih boja koje se vezuju za dvolančani molekul DNK. Primena HRMA podrazumeva korišćenje mašina za PCR u realnom vremenu (eng. *Real Time PCR*) novije generacije sa mogućnošću precizne kontrole temperature na koju se zagrevaju uzorci i specijalno dizajniranog softvera za analizu dobijenih podataka. Metoda HRMA može se koristiti za analizu sekvenci DNK koje se

razlikuju za samo jedan nukleotid, s obzirom na to da na oblik krive topljenja i/ili tačku topljenja DNK fragmenata utiču promene u njihovoj sekvenci, GC sastavu ili dužini (119).

Prvi korak u primeni HRMA metode za genotipizaciju genetičkih varijanti predstavlja amplifikacija fragmenta molekula DNK koji ih okružuje PCR-om. PCR amplifikacija sprovodi se u prisustvu fluorescentne boje koja pokazuje visok nivo fluorescencije samo kada je vezana za dvolančani molekul DNK. Dobijeni produkti PCR reakcije se nakon amplifikacije denaturišu povećanjem temperature na 95°C, a potom se smanjenjem temperature na 60°C favorizuje njihova renaturacija. Dodatnim korakom inkubacije uzoraka na 40°C između denaturacije i renaturacije dodatno se favorizuje u heterozigotnim uzorcima formiranje heterodupleksa, odnosno dvolančanih molekula DNK koji sadrže nesporene nukleotide zbog prisustva različitih alela određene genetičke varijante. Kada je uzorak DNK homozigotan za ispitivanu genetičku varijantu, biće formirani samo potpuno komplementarno spareni dvolančani fragmenti DNK. Temperatura se zatim ponovo povećava do 95°C, ali postepeno u dugom vremenskom periodu, pri čemu dolazi do denaturacije fragmenata DNK, usled čega se boja oslobađa i smanjuje se nivo fluorescencije.

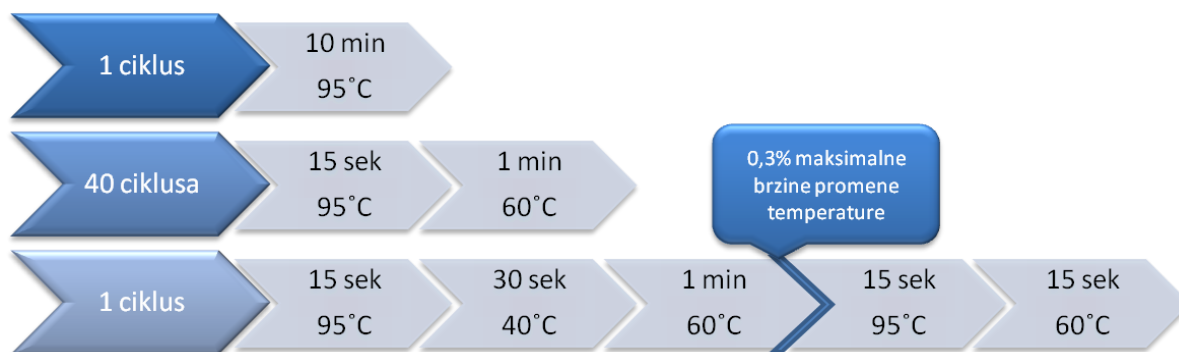
Kod homozigotnih uzoraka na jednoj karakterističnoj temperaturi na kojoj dolazi do razdvajanja lanaca molekula DNK naglo se smanjuje nivo fluorescencije, dok se kod heterozigotnih uzoraka nagli pad nivoa fluorescencije primećuje na dve karakteristične temperature, što je posledica različitih temperatura na kojima se razdvajaju lanci homodupleksa i heterodupleksa. Intenzitet fluorescencije se meri nakon svakog PCR ciklusa kako bi se konstruisala kriva amplifikacije, kao i tokom postepenog podizanja temperature sa 60°C na 95°C u cilju konstruisanja krive topljenja PCR produkata. Heterozigotni uzorci razlikuju se od homozigotnih po obliku krive topljenja PCR produkata, dok se uzorci homozigotni za različite alele genetičke varijante međusobno razlikuju po temperaturi na kojoj dolazi do razdvajanja lanaca DNK fragmenata (eng. *Melting Temperature*, T_m), odnosno naglog pada u nivou fluorescencije (119).

Komponente reakcione smeše kao i njihove finalne koncentracije nalaze se u tabeli 3.5. Temperaturni profil HRMA reakcije prikazani su na slici 3.3. Komercijalno

dostupan MeltDoctor HRM Master Mix (*Applied Biosystems, SAD*) koji se koristi za pripremu reakcione smeše sadrži AmpliTaq Gold 360 DNK polimerazu i odgovarajući pufer, magnezijum hlorid, dezoksiribonukleotide u ekvimolarnim odnosima i MeltDoctor HRM fluorescentnu boju.

Tabela 3.5. Sastav reakcionih smeša za PCR reakciju u sklopu HRMA varijanti rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2*, rs3742330 u genu *DICER1* i rs784567 u genu *TARBP2*.

Komponente	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
MeltDoctor™ HRM Master Mix	1X	3
Prajmer Rv	0.3 µM	0.18
Prajmer Fw	0.3 µM	0.18
DNK	/	1
Dejonizovana voda (<i>Serva</i>)	/	1.64
Ukupno		6



Slika 3.3. Temperaturni profil HRMA reakcija.

Karakteristike prajmera korišćenih za PCR amplifikaciju regiona koji okružuju analizirane genetičke varijante prikazani su u tabeli 3.6. Prajmeri korišćeni za genotipizaciju rs11614913 preuzeti su iz studije *Qi-a* i saradnika (120). Pomoću programa Primer3 (version 0.4.0) (*Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Masačusets, SAD*) (118) dizajnirani su prajmeri koji su korišćeni za

genotipizaciju rs3742330 i rs784567. Pomoću programa uMELT (*Wittwer Lab, Salt Lake City, SAD*) vršena je predikcija krivih topljenja PCR produkata koji bi bili dobijeni korišćenjem parova prajmera dizajniranih sa Primer3 (*Whitehead Institute for Biomedical Research, Masačusets, SAD*) (118) i odabirani su optimalni parovi na osnovu preporučenih karakteristika prajmera i krivih topljenja od strane proizvođača MeltDoctor™ HRM Master Mix-a (*Applied Biosystems, SAD*) i odgovarajućeg softvera za StepOnePlus mašinu za PCR u realnom vremenu (*StepOnePlus Real-Time PCR System*) (*Applied Biosystems, SAD*).

Tabela 3.6. Karakteristike prajmera korišćenih za PCR amplifikaciju regiona koji okružuju varijante rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2*, rs3742330 u genu *DICER1* i rs784567 u genu *TARBP2*.

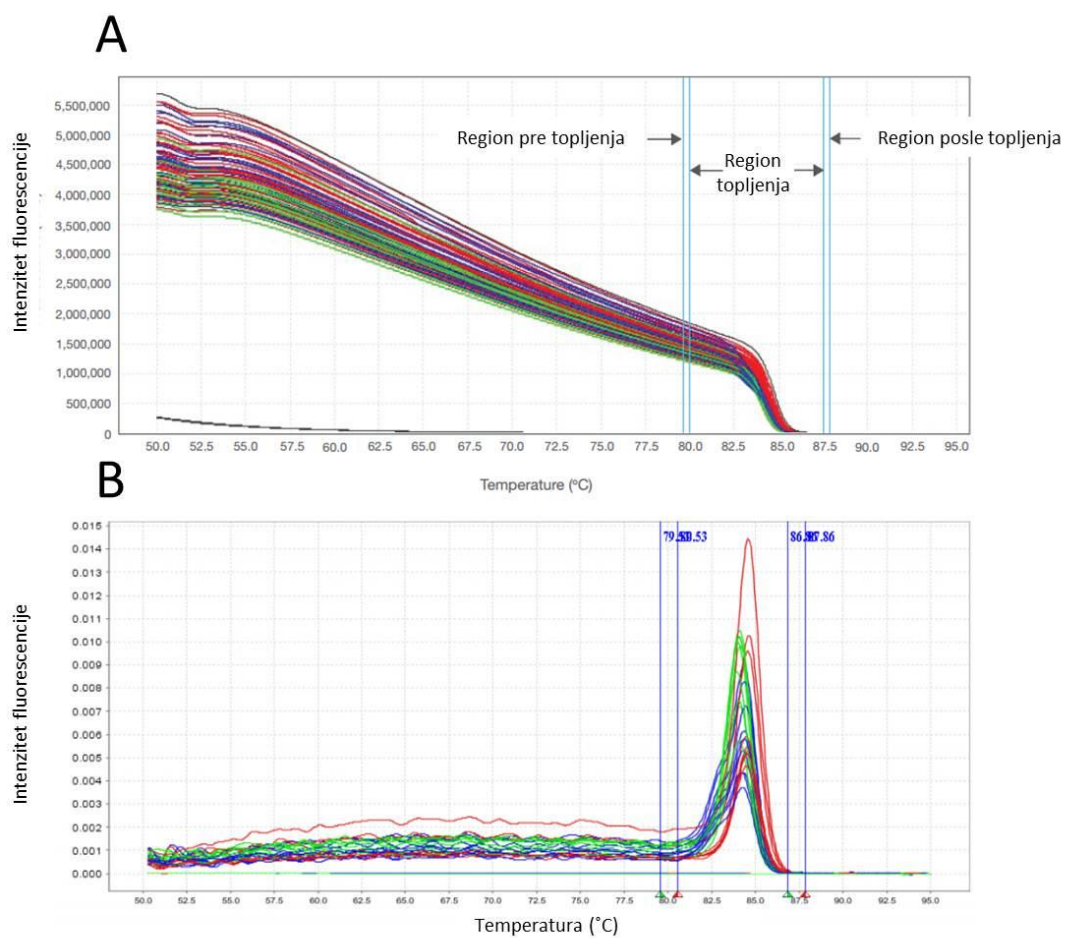
Oznaka	Sekvenca	Dužina	Dužina PCR produkata
rs11614913 fw	5'-TGAACTCGGCAACAAGAAAC-3'	20 bp	81 bp
rs11614913 rv	5'-GGTAGGAGTGGGAGAGGT-3'	18 bp	
rs3742330 fw	5'-CAAAGTCTTCACTTCCCTGCCA-3'	22 bp	198 bp
rs3742330 rv	5'-GATGTTTAACTCCTCTCCACGTGATC-3'	26 bp	
rs784567 fw	5'-AGCCCTGCGGAAACAGAG-3'	18 bp	82 bp
rs784567 rv	5'-GTCGGATCCTGGCTCTTTG-3'	19 bp	

Za analizu dobijenih rezultata korišćeni su programi StepOnePlus™Software v2.3 (*Applied Biosystems, SAD*) i High Resolution Melt Software v2.0 (*Applied Biosystems, SAD*). Pomoću programa StepOnePlus™Software v2.3 (*Applied Biosystems, SAD*) analizirane su krive amplifikacije i krive topljenja u cilju optimizacije PCR reakcije eliminisanjem prajmer-dajmer artefakata i drugih potencijalnih nespecifičnih produkata amplifikacije, kao i povećanjem prinosa reakcije. Prisustvo prajmer-dajmer artefaka detektovano je na osnovu naglog pada fluorescencije na znatno nižim temperaturama zagrevanja produkata PCR-a (70-75°C), u odnosu na temperature topljenja PCR fragmenata nastalih amplifikacijom regiona DNK od interesa.

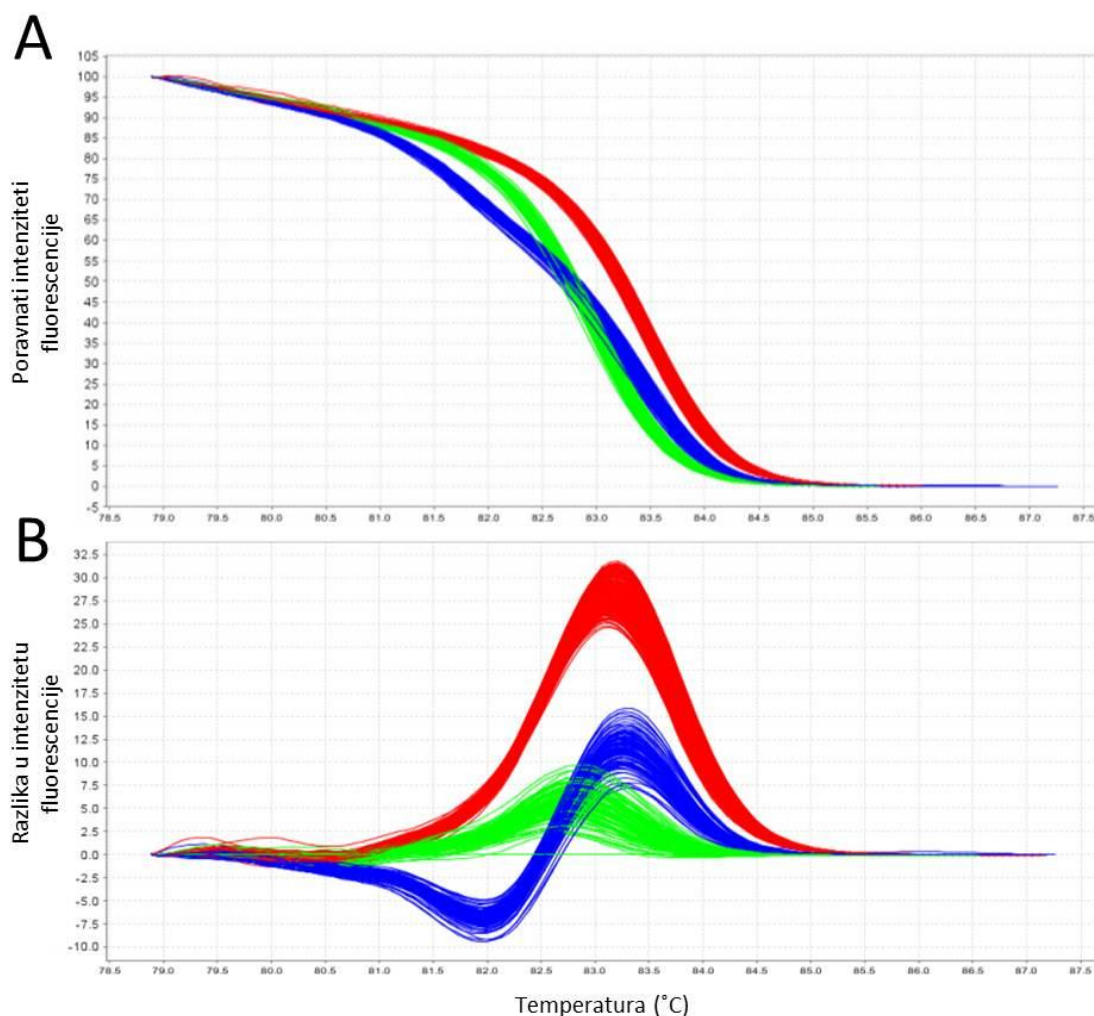
Takođe, nakon optimizacije PCR-a, analizom rezultata u ovom softveru vršena je provera prisutva kontaminacije i uspešnosti amplifikacije fragmenata DNK

pojedinačnih uzoraka. Rezultati obrađeni u softveru StepOnePlus™Software v2.3 (*Applied Biosystems, SAD*) analizirani su pomoću softvera High Resolution Melt Software v2.0 (*Applied Biosystems, SAD*), pri čemu su granice regiona topljenja koje služe za normalizaciju rezultata podešavane manuelno nakon primarnog automatskog pozicioniranja.

Manuelno podešavanje vršeno je na osnovu vizuelne inspekcije grafikona kojim su predstavljene krive topljenja kontrolnih uzoraka za sva tri genotipa ispitivane genetičke varijante u okviru softvera High Resolution Melt Software v2.0 (*Applied Biosystems, SAD*) (*Raw Melt Curves plot* i *Derivative Melt Curves plot*) (slika 3.4). Normalizacija krivih omogućava adekvatno konstruisanje dodatnih grafikona značajnih za tumačenje rezultata, a na kojima su poravnate krive topljenja različitih uzoraka (eng. *Aligned Melt Curves plot*), ili predstavljaju razlike u odnosu na krivu topljenja referentnog uzorka (eng. *Difference plot*) (slika 3.5). Genotipovi su dodeljivani uzorcima automatski ili manuelno kada automatsko određivanje genotipa nije bilo moguće na osnovu vizuelne inspekcije svih konstruisanih dijagrama i poređenjem sa krivama topljenja kontrola za sva tri genotipa. Svi rezultati automatskog određivanja genotipa uzoraka proveravani su manuelnom metodom.



Slika 3.4. Normalizacija rezultata određivanjem granica regiona topljenja. A) Dijagram neobrađenih kriva topljenja (eng. *Raw Melt Curves plot*); B) Dijagram brzine promene fluorescencije u zavisnosti od temperature (eng. *Derivative Melt Curves plot*).



Slika 3.5. **Određivanje genotipova analizirane genetičke varijante na osnovu razlika u krivama topljenja produkata amplifikacije regiona DNK koji ih okružuju PCR-om.** Plavom bojom označene su krive topljenja koje odgovaraju uzorcima homozigotnim za jedan alel, crvenom homozigotnim za drugi alel, a zelenom heterozigotnim uzorcima. A) Dijagram poravnatih krivih topljenja; B) Dijagram razlika u krivama topljenja u odnosu na izabrani referentni uzorak.

3.2.4.4. *Genotipizacija varijante rs895819 u genu za miR-27a pomoću PCR-a specifičnog za alel*

Pomoću programa BatchPrimer3 (*University of California, SAD*) (121) dizajnirani su prajmeri za PCR specifičan za alel koji je korišćen za genotipizaciju genetičke varijante rs895819. Ukupno je dizajnirano četiri prajmera: dva uzvodna prajmera koji na svojim 3' krajevima sadrže nukleotid koji odgovara jednom ili drugom alelu rs895819 (prajmer specifičan za T ili C alel), zajednički nizvodni prajmer i zajednički uzvodni prajmer (tabela 3.7.). Kako bi se povećala specifičnost reakcije, na

trećoj poziciji od 3' kraja prajmera uvedena je promena u sekvenci koja onemogućuje komplementarno sparivanje sa matricom DNK.

Tabela 3.7. Karakteristike prajmera korišćenih u genotipizaciji varijante rs895819 u genu za miR-27a PCR-om specifičnim za alel.

Oznaka	Sekvenca ^a	Dužina
rs895819 fw	5'-TGATCAAAGGAAGCATCTGG-3'	20 bp
rs895819 rv	5'-CATCTCTGCTCCAAGCATCA-3'	18 bp
rs895819_T	5'-CCACTGTGAACACGACTTTG <u>T</u> -3'	22 bp
rs895819_C	5'-CCACTGTGAACACGACTTTG <u>C</u> -3'	26 bp

^aU sekvenci prajmera podvučen je deo specifičan za alel

Sastav reakcionih smeša za PCR amplifikaciju prikazan je u tabeli 3.8. Za svaki uzorak pripremane su dve reakcione smeše, svaka sa po jednim od dva prajmera specifična za alel T ili C genetičke varijante rs895819 (T i C reakcione smeše). Očekivana dužina PCR produkata specifičnih za alele bila je 337 bp. U isto vreme, PCR reakcijom umnožavan je i segment DNK koji okružuje rs895819 usled prisustva zajedničkog uzvodnog prajmera u obe reakcione smeše. Očekivana dužina ovog PCR produkta iznosila je 547 bp i on je služio kao kontrola za PCR reakciju specifičnu za alel. Optimizovani temperaturni profili PCR reakcija prikazani su na slici 3.6. Reakcija PCR-a izvođena je pomoću mašine Veriti[®] Thermal Cycler (*Applied Biosystems*, SAD).

Produkti PCR amplifikacije analizirani su elektroforezom na 1.5% agaroznom gelu sa bojom Midori Green (*Midori Green DNA Stain, Nippon Genetics*, Dueren, Nemačka) prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.2. Određivanje genotipova vršeno je interpretacijom rezultata elektroforeze. Ukoliko je uzorak posedovao alel kojem odgovara reakciona smeša (T ili C) očekivano je prisustvo traka dužine 337 bp i 547 bp, a u suprotnom samo trake dužine 547 bp koja odgovara kontrolnom produktu PCR amplifikacije.

Tabela 3.8. Sastav reakcionih smeša za PCR reakcije koje su korišćene za genotipizaciju varijante rs895819 u genu miR-27a.

Komponenta PCR reakcione smeše	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina (za pojedinačnu reakciju)
PCR pufer A sa 15 mM MgCl ₂ (Kapa Biosystems, SAD)	10X	1X	1,5 µl
dNTP (Fermentas, SAD)	10 mM	200 µM	0,3 µl
rs895819 fw	10 µM	0.3 µM	0,45 µl
rs895819_T ili rs895819_C	10 µM	0.3 µM	0,45 µl
rs895819 rv	10 µM	0.3 µM	0,45 µl
Taq polimeraza (Kapa Biosystems, SAD)	5 U/µl	0,04 U/µl (0,6 U)	0,12 µl
Genomska DNK			2 µl (5-50 ng)
Dejonizovana voda (Serva, Westbury, Njujork, SAD)			9.73 µl



Slika 3.6. Temperaturni profili PCR-a specifičnog za alel kojim je genotipizovana varijanta rs895819 u genu za miR-27a.

3.2.4.5. Genotipizacija varijante rs4961280 u genu AGO2 pomoću eseja za genotipizaciju baziranog na PCR-u u realnom vremenu uz upotrebu specifičnih proba

Za genotipizaciju genetičke varijante rs4961280 korišćen je komercijalno dostupan set proba i prajmera za esej baziran na PCR-u u realnom vremenu proizvođača

Primerdesign Ltd (Southampton, VB). PCR reakcija vršena je na plejtu sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*, SAD) prekrivenom optičkom adhezivnom folijom (MicroAmp® Optical Adhesive Film, *Applied Biosystems*, SAD) u mašini za PCR u realnom vremenu (7500 Fast System, *Applied Biosystems*, SAD). Reakciona smeša za alelsku diskriminaciju svakog uzorka pripremana je modifikacijom protokola za primenu TaqMan® eseju za genotipizaciju polimorfizama opisanom u poglavlju 3.2.4.1. Sastav ove smeše prikazan je u tabeli 3.9.

Tabela 3.9. Sastav reakcione smeše za pojedinačnu PCR reakciju u okviru genotipizacije varijante rs4961280 u genu *AGO2* pomoću eseja za genotipizaciju baziranog na PCR-u u realnom vremenu uz upotrebu specifičnih proba.

Komponenta	Osnovna koncentracija	Finalna koncentracija	Zapremina u reakcionoj smeši
Genotyping primer/probe mix (<i>Primerdesign Ltd</i> , Southampton, VB)	40 X	1 X	0,75 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (<i>Applied Biosystems</i> , SAD)	2 X	1 X	5 µl
Voda bez nukleaza (<i>Qiagen</i> , Nemačka)			3,25 µl
Genomska DNK			1 µl (2,5-25 ng)

Procedura beleženja nivoa fluorescencije, softverske obrade podataka i genotipizacije istovetna je sa procedurom baziranom na upotrebi TaqMan® eseja za genotipizaciju polimorfizama opisanom u poglavlju 3.2.4.1., s tom razlikom što je korišćen HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 (*Applied Biosystems*, SAD). Esej proizvođača *Primerdesign Ltd* (Southampton, VB) funkcioniše po sličnom principu i kombinacija fluorescentnih boja (VIC i ROX) koja se koriste u ovom eseju razlikuje se od one koja se primenjuje u TaqMan® eseju za genotipizaciju polimorfizama (VIC i FAM). Prilikom softverskog podešavanja zadatog protokola PCR-a u realnom vremenu, potrebno je isključiti pasivnu referencu, pošto se za tu svrhu u drugim eksperimentima koristi boja ROX.

3.2.5. Statistička obrada rezultata

3.2.5.1. Statistička obrada rezultata genotipizacije u cilju procene potencijalne asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i progresiju KP

Provera kvaliteta rezultata genotipizacije, kao i ispravnosti selekcije i genetičke strukture kontrolne grupe, vršena je analizom usaglašenosti distribucije genotipova u kontrolnoj grupi sa principima Hardy–Vajnbergove ravnoteže (HWE). Za navedenu analizu korišćen je egzaktni test u okviru softverskog paketa SNPStats (*Catalan Institute of Oncology*, Barselona, Španija) (122). Statistički značajnim odstupanjem od HWE smatrane se distribucije genotipova za koje je u navedenom testu utvrđena P vrednost veća od 0.05.

Nakon provere potencijalnog odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže, usledilo je testiranje asocijacija ispitivanih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP. Statističkim testovima sprovedenim u tu svrhu analizirane su razlike u distribucijama genotipova između bolesnika sa KP i kontrolne grupe, kao i između bolesnika sa KP i BHP.

Osim testiranja asocijacije analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP, testirana je njihova asocijacija sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP, kao i sa rizikom za progresiju bolesti. Navedenim statističkim testovima poređene su distribucije genotipova u grupama bolesnika sa KP sa različitim serumskim vrednostima PSA, GS i kliničkim stadijumima primarnog tumora. Takođe, distribucije genotipova poređene su kod bolesnika sa KP svrstanim u grupe sa različitim rizikom za progresiju bolesti, procenjenim na osnovu dva različita kriterijuma.

Za statističku obradu rezultata genotipizacije korišćen je program SNPStats (*Catalan Institute of Oncology*, Barselona, Španija) (122). Primenjeni statistički testovi asocijacija zasnovani su na logističkoj regresiji, a kao mera asocijacije određenog alela ili genotipa sa rizikom za razvoji/ili progresiju KP korišćen je odnos šansi (eng. *Odds*

Ratio, OR). Navedena veličina pokazuje koliko je veća verovatnoća razvoja KP kod osoba koje poseduju određeni alel ili genotip u odnosu na osobe koje ovaj alel ne poseduju ili imaju neki drugi genotip iste genetičke varijante (123). Prilikom izračunavanja vrednosti OR, kao referentni genotip ili alel korišćen je homozigotni genotip učestalijeg alela, odnosno učestaliji alel. Statistički značajnim rezultatima smatrani su oni za koje je dobijena *P* vrednost manja od 0.05. *P* vrednosti $\geq 0,05$ i $< 0,1$ smatrane su statističkih trendom asocijacije.

Nezavisni testovi sprovedeni su za različite potencijalne genetičke modele asocijacije: dominantni, recesivni, overdominantni, kodominantni i log-aditivni model. Procena najadekvatnijeg genetičkog modela vršena je na osnovu vrednosti Akaike informacionog kriterijuma (eng. *Akaike information criterion*, AIC). Za najadekvatniji genetički model za analiziranu asocijaciju smatran je onaj za koji je dobijena najmanja vrednost AIC. Ukoliko je razlika između dve najmanje dobijene vrednosti AIC u istom testu bila manja od 2, svaki od genetičkih modela kojima odgovaraju ove vrednosti AIC smatran je potencijalno adekvatnim i donošenje zaključka o najadekvatnijem genetičkom modelu nije se smatralo statistički opravdanim (124).

3.2.5.2. *Statistička obrada rezultata genotipizacije u cilju procene potencijalne asocijacije epistatičkih interakcija genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP*

Rezultati genotipizacije analizirani su neparametarskom metodom redukcije dimenzionalnosti višestrukih faktora (eng. *Multifactor Dimensionality Reduction*, MDR) pomoću softvera MDR (v.3.0.2) (*Dartmouth Medical School*, Njuhempšir, SAD) (111) u cilju identifikacije potencijalnih statističkih epistatičkih interakcija asociраних sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP.

Rezultati su pripremani za navedenu analizu isključivanjem uzoraka za koji nisu utvrđeni genotipovi svih analiziranih genetičkih varijanti. Nakon toga, sprovedena je ponovna analiza prisustva HWE u kontrolnoj grupi na način opisan u poglavlju 3.2.5.1.

Statistički značajno odstupanje distribucije genotipova određene genetičke varijante od HWE smatrano je kriterijumom za njeno isključivanje iz dalje analize.

Uneseni podaci deljeni su u podgrupe uzoraka kako bi bila izračunata vrednost koja se odnosi na konzistentnost prilikom poređenja rezultata genotipizacije kod kontrola i bolesnika sa KP u svakoj podgrupi, uključujući i inicijalnu koja se koristi za određivanje početnih parametara (eng. *training set*). Desetostruka unakrsna validacija rezultata (eng. *10-fold cross validation*) i ponavljanje analize deset puta sa nasumično izabranim načinom podele unesenih podataka (eng. *random seeds*) korišćeni su kako bi se minimalizovala mogućnost dobijanja statistički značajnih rezultata kao posledice slučajnosti ili neodgovarajućeg načina analiziranja. Za različite brojeve lokusa uključenih u potencijalnu epistatičku interakciju (od 1 do 5), određen je najbolji model. Srednja vrednost greške predikcije, izražena kao uravnotežena tačnost testiranja (eng. *Testing Balanced Accuracy*, TBA), kao i konzistentnost unakrsnih validacija (eng. *Cross-Validation Consistency*, CVC) korišćene su za procenu najboljeg modela za ispitivane epistatičke interakcije, od ukupno pet potencijalnih koji su prethodno određeni kao najbolji za svaki broj uključenih lokusa. Prvi nivo procene najboljeg modela bazirao se na određivanju najvišeg CVC, a zatim i najvišeg TBA. Modeli sa CVC vrednostima manjim od 8/10 nisu smatrani statistički pogodnim za potencijalne statističke epistatičke interakcije asocirane sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP.

Procena statističke značajnosti najboljih modela za različit broj uključenih lokusa dobijenih kao rezultat MDR analize, vršena je pomoću permutacionog testa uključenog u softver *MDR permutation testing module* (MDRpt) v.1.0 beta 2 (*Dartmouth Medical School*, Njuhempšir, SAD) (111). Test je uključivao 1000 permutacija i izračunavane su *P* vrednosti za TBA dobijene u prethodnom testiranju. Permutacije su ponavljane sa istim načinom podele unesenih podataka kao i u MDR testu.

Radi vizuelizacije dobijenih rezultata i određivanja sinergističkih interakcija i redundantnosti konstruisani su grafikoni entropije interakcija. Grafikon koji je odabran za predstavljanje rezultata je Fruchterman-Rheingold. Vrednosti porasta u količini

informacije sistema (eng. *information gain*) koje su udružene sa pojedinačnim čvorištima grafikona odnose se na nezavisne efekte pojedinačnih lokusa, dok vrednosti udružene se linijama koje ih povezuju ukazuju na nezavisnost efekata ili epistatičku interakciju. Porast u količini informacije (vrednost > 0) ukazuje na sinergizam, smanjenje u količini informacije (vrednost < 0) ukazuje na redundantnost.

3.2.6. Meta-analiza utvrđenih asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj karcinoma prostate i rezultata prethodnih studija vezanih za maligne tumore

3.2.6.1. Pretraživanje baze naučnih publikacija PubMed

Publikacije uključene u meta-analizu pronađene su pretraživanjem baze podataka *PubMed*. Strategija pretraživanja zasnivala se na upotrebi kombinacija sledećih ključnih reči:

1. Ime genetičke varijante ili mikroRNK/proteina („rs2910164“ ili „miR-146a“, „rs3746444“ ili „miR-499“, „rs11614913“ ili „miR-196a2“, „rs895819“ ili „miR-27a“, „rs3742330“ ili „DICER1“, „rs4961280“ ili „AGO2“, „rs784567“ ili „TRBP2“, „rs7813“ ili „GEMIN4“, „rs197414“ ili „GEMIN3“);
2. "Asocijacija" (eng. *association*);
3. "Maligni tumor" (eng. *cancer*).

Prilikom definisanja kriterijuma pretrage nije uvedeno ograničenje na studije objavljene na engleskom jeziku, kako bi se izbeglo izostavljanje rezultata iz pojedinih populacija, a time i izvor potencijalne greške uzrokovane međupopulacionim razlikama. Pretraga je bila ograničena na radove sa dostupnim celokupnim tekstom.

Pretraga baze podataka rezultovala je većim brojem preklapajućih rezultata dobijenih korišćenjem više kombinacija ključnih reči. Nakon isključivanja duplikata publikacija, pristupljeno je analizi referenci pronađenih naučnih publikacija. Analiza referenci originalnih studija, revijskih radova i prethodnih meta-analiza sprovedena je sa

ciljem identifikacije dodatnih studija koje bi bile pogodne za uključivanje u meta-analizu. Selekcija referenci potencijalno pogodnih za detaljniju analizu sa ciljem procene pogodnosti za meta-analizu vršena je na osnovu naslova.

Izabrani radovi objavljeni su do septembra 2014. godine. U proces selekcije uključeni su i radovi koji su u tom trenutku bili objavljeni samo u elektronskoj formi. Studije koje nisu vezane za temu istraživanja, a bile su rezultat pretrage baze podataka, identifikovane su na osnovu iščitavanja naslova i apstrakata i isključivane iz dalje analize.

3.2.6.2. Procena pogodnosti studija za uključivanje u meta-analizu

Nakon inicijalnog skrininga na osnovu naslova i apstrakata, među studijama relevantnim za temu istraživanja selektovane su za meta-analizu one koje se ispunjavale sve navedene kriterijume:

a) Predstavljaju studije asocijacije genetičkih varijanti rs2910164, rs3746444, rs11614913, rs895819, rs3742330, rs4961280, rs784567, rs7813 ili rs197414 sa rizikom za razvoj malignog tumora kod čoveka;

b) Objavljene su distribucije genotipova ili su rezultati predstavljeni odnosom šansi (eng. *Odds Ratio*, OR) sa 95% intervalom poverenja (eng. *Confidence Interval*, CI) i *P* vrednošću;

c) Poseduju detaljne informacije o procedurama regrutovanja učesnika u studiji, dijagnostičkim protokolima i kriterijumima za procenu kliničkih i patohistoloških karakteristika bolesnika sa KP, metodama genotipizacije, statističkoj obradi rezultata i druge relevantne metodološke podatke.

Prilikom selekcije radova analiziran je ne samo tekst publikacije, već i dodatni materijali dostupni samo u elektronskom formatu (eng. *supplementary material*). Dodatni kriterijum za selekciju studija predstavljalo je prisustvo HWE u kontrolnoj grupi. Korak eliminacije studija kod kojih distribucija genotipova u kontrolnoj grupi

nije bila u skladu sa HWE usledio je nakon ekstrakcije podataka iz studija nakon inicijalne procene pogodnosti za uključivanje u meta-analizu na osnovu tri prethodno navedena kriterijuma. Takođe, iz meta-analize isključene su studije sa očiglednim greškama u prikazu rezultata, poput neusaglašenosti između teksta u tablama i poglavlju rada u kojem se navode rezultati. Svaka studija koja nije ispunjavala neki od kriterijuma isključivana je iz dalje analize.

3.2.6.3. *Ekstrakcija podataka iz studija selektovanih za meta-analizu*

Iz svake studije selektovane za uključivanje u meta-analizu izdvojeni su sledeći podaci:

- a) Prezime prvog autora publikacije;
- b) Godina publikovanja rada;
- c) Država u kojoj je studija sprovedena;
- d) Etničko poreklo učesnika u studiji;
- e) Tip malignog tumora;
- f) Karakteristike kontrolne grupe, uključujući način regrutovanja;
- g) Dizajn studije i primenjene metode;
- h) Veličina uzorka;
- i) Analizirane genetičke varijante;
- j) Broj genotipova i alela analizirane genetičke varijante ili objavljena vrednost OR sa 95% CI i *P* vrednost;
- k) *P* vrednosti dobijene testiranjem prisustva HWE u kontrolnoj grupi, ukoliko nisu navedene brojnosti genotipova u kontrolnoj grupi.

Izabrane studije podeljene su u grupe na osnovu genetičkih varijanti koje su analizirale u kontekstu asocijacije sa rizikom za razvoj malignih tumora. Meta-analiza je sprovedena samo u slučajevima kada je tri ili više studija uključivalo analizu efekata pojedinačne varijante.

U okviru grupa studija koje analiziraju efekte iste genetičke varijante formirane su podgrupe na osnovu tipa malignog tumora na koji se studija odnosi. U onim

slučajevima kada su pojedinačne studije uključivale više različitih kontrolnih grupa, više tipova malignih tumora, familijarne i sporadične tipove bolesti, ili grupe bolesnika i kontrola iz različitih etničkih grupa, formirani su paneli koji su nezavisno uključeni u meta-analizu, bez obzira na to što su deo iste studije. Formiranjem ovih panela i podgrupa studija bilo je moguće sprovesti, ne samo zajedničku meta-analizu, već i podgrupne meta-analize bazirane na tipovima malignih tumora, etničkom poreklu učesnika u studiji, veličini studija (<1000 učesnika i ≥ 1000 učesnika), kao i karakteristikama kontrolne grupe, odnosno načinu regrutovanja kontrolne grupe iz populacije (eng. *Population-based*, PB) ili bolnica (eng. *Hospital-based*, HB).

Metodološki kvalitet studija uključenih u meta-analizu procenjivan je prema Njukasl-Otava skali (eng. *Newcastle-Ottawa Scale*) (125). Ovim sistemom bodovanja ocenjuju se tri aspekta metodološkog pristupa studije: selekcija učesnika (eng. *Selection*), izjednačavanje grupe bolesnika sa kontrolnom grupom u smislu faktora koji mogu uticati na rezultat studija slučajeva i kontrola (eng. *Comparability*), kao i izjednačavanje metoda za određivanje genotipova bolesnika i kontrola (eng. *Exposure*).

3.2.6.4. Procena heterogenosti rezultata selektovanih studija i odabir modela meta-analize

Za svaku pojedinačnu meta-analizu, uključujući i podgrupne, sprovedena je analiza heterogenosti studija pomoću statističkog softvera Open Meta-analyst (*Tufts Medical Center*, Boston, Masačusets, SAD) (126). Statistički testovi u sastavu navedenog softvera koji su korišćeni za procenu heterogenosti rezultata studija su Kohranov Q statistički test (eng. *Cochran's Q test*) u kombinaciji sa određivanjem indeksa nedoslednosti (eng. *inconsistency index*, I^2).

U slučajevima kada je P vrednost dobijena primenom Kohranovog Q testa bila manja od 0,1 heterogenost rezultata studija je smatrana značajnom. Vrednosti I^2 od 0% do 25% ukazivale na odsustvo heterogenosti, vrednosti I^2 od 25% do 50% na umerenu heterogenost, vrednosti I^2 od 50% do 75% na veliku heterogenost i vrednosti I^2 od 75% do 100% na ekstremnu heterogenost studija. Ukoliko nije pokazana značajna

heterogenost rezultata studija i panela ($P \geq 0.1$ ili $I^2 < 50\%$), za meta-analizu je korišćen model fiksiranog efekta (eng. *fixed-effect model*), dok je prisustvo značajne heterogenosti uslovljavalo korišćenje modela neuređenih efekata (eng. *random-effects model*). Za svaku podgrupnu meta-analizu korišćen je model biran na osnovu procenjene heterogenosti rezultata studija i panela u okviru odgovarajućeg seta, nezavisno od heterogenosti procenjene na nivou ukupne kolekcije studija.

3.2.6.5. Kvantitativna sinteza podataka

Za kvantitativnu sintezu rezultata studija takođe je korišćen statistički softver Open Meta-analyst (*Tufts Medical Center*, Boston, Masačusets, SAD) (126). Priprema rezultata studija ili panela za statističku obradu uključivala je njihovo predstavljanje u vidu vrednosti OR i njihovih 95% CI, ili je na osnovu brojeva genotipova softver izračunavao navedene vrednosti i uključivao ih u meta-analizu. Prilikom korišćenja modela fiksiranog efekta za meta-analizu studija sa neznačajnom heterogenošću rezultata, metoda inverzne vrednosti varijanse (eng. *inverse variance method*) korišćena je dodeljivanje vrednosti "težine" (eng. *weighting*), odnosno veličine učinka pojedinačnim studijama i panelima. Za fiksirani model meta-analize, u istu svrhu korišćen je metod koji su predložili DerSimonian i Laird (127).

Na osnovu rezultata pojedinačnih studija uključenih u meta-analizu u vidu vrednosti OR i njihovih 95% CI i rezultata kvantitativne sinteze konstruisani su "šumski dijagrami" (eng. *Forest plots*). Za svaku meta-analizu, uključujući i podgrupne, izračunavane su P vrednosti, a kao prag statističke značajnosti korišćena je P vrednost od 0.05.

Zasebne meta-analize sprovedene su za dominantni, recesivni i overdominantni genetički model, kao i za efekte manje učestalog alela genetičkih varijanti, njegovih homozigota i heterozigota. Kao referentni genotip u navedenim poređenjima korišćen je homozigot učestalijeg alela ili učestaliji alel.

3.2.6.6. *Procena prisustva greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije*

Prisustvo greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija procenjivano je primenom Egerovog testa (128), kao i analizom asimetrije Funel dijagrama. Vrednost praga statističke značajnosti u Egerovom testu iznosila je 0.05.

4. Rezultati

4.1. Rezultati selekcije bolesnika sa KP prema vrednostima standardnih prognostičkih parametara i riziku za progresiju bolesti

U okviru ove studije analizirano je ukupno 355 uzoraka periferne krvi bolesnika sa KP, 360 uzoraka periferne krvi bolesnika sa BHP, kao i 318 uzoraka brisa bukalne sluznice muškaraca iz opšte populacije Srbije koji su činili kontrolnu grupu. Prosečna starost bolesnika sa KP bila je 69.91 godina, kod bolesnika sa BPH iznosila je 68.10 godina, dok je u grupi kontrola ona iznosila 69.11 godina.

Na osnovu vrednosti standardnih prognostičkih parametara, bolesnici sa KP svrstavani su u tri grupe sa različitim serumskim vrednostima PSA, GS, kao i kliničkog stadijuma primarnog tumora. Bolesnici sa KP podeljeni su i u dve grupe prema prisustvu ili odsustvu metastaza (tabela 4.1). Kod najvećeg broja bolesnika sa KP utvrđena je serumska vrednost PSA >20 ng/ml, GS vrednost <7, kao i klinički stadijum primarnog tumora T2. Kod više od 15% bolesnika detektovane su udaljene metastaze u trenutku postavljanja dijagnoze KP.

Tabela 4.1. Selekcija bolesnika sa KP prema vrednostima standardnih prognostičkih parametara.

Vrednost parametara	Broj bolesnika
PSA <10 ng/μl	99 (28.2)
PSA 10-20 ng/μl	102 (29.1)
PSA >20 ng/μl	150 (42.7)
GS <7	208 (60.8)
GS=7	81 (23.7)
GS >7	53 (15.5)
T1	49 (15.8)
T2	170 (55)
T3/T4	90 (29.2)
Prisutne metastaze (M+)	51 (15.8)
Odsutne metastaze (M0)	271 (84.2)

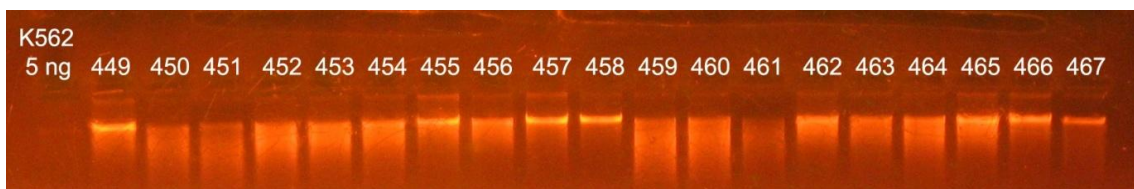
Na osnovu vrednosti navedenih parametara bolesnici sa KP podeljeni su u grupe sa niskim, srednjim i visokim rizikom za progresiju KP prema kriterijumima *D'Amico*-a i saradnika (114), a koje preporučuje Evropsko udruženje urologa (tabela 3.2). Za skoro 60% bolesnika sa KP procenjen je visok rizik za progresiju bolesti. Selekcija bolesnika u grupe na osnovu rizika za progresiju KP vršena je i prema preporukama *Medeiros*-a i saradnika (115) (tabela 4.2). Kada je primenjen ovaj kriterijum selekcije, za 56.9% bolesnika sa KP ustanovljen je visok rizik za progresiju bolesti.

Tabela 4.2. Selekcija bolesnika sa KP u grupe prema riziku za progresiju bolesti.

	Rizik za progresiju KP	Broj bolesnika (%)
D'Amico et al.	Nizak rizik	22 (6.6)
	Srednji rizik	115 (34.3)
	Visok rizik	198 (59.1)
Medeiros et al.	Nizak rizik	142 (43.1)
	Visok rizik	187 (56.9)

4.2. Rezultati provere količine i kvaliteta izolovane DNK elektroforezom u agaroznom gelu

Količina i kvalitet izolovane genomske DNK proveravani su elektroforezom u agaroznom gelu koncentracije 0.8% sa Et-Br. Prisustvo diskretnih traka na gelu ukazivalo je na nativnu genomsku DNK, a razmaz na degradovanu. Poređenjem intenziteta fluorescencije traka koje odgovaraju uzorcima i standarda za količinu DNK ustanovljeno je da je koncentracija svih izolovanih molekula DNK bila veća od 1 ng/ μ l (slika 4.1).



Slika 4.1. Provera količine i kvaliteta genomske DNK, izolovane iz pune periferne krvi bolesnika sa KP i BHP, elektroforezom u 0,8% agaroznom gelu bojenom Et-Br. (K562 – standard za količinu DNK 1 ng/ μ l; brojevima od 449 do 467 obeleženi su uzorci izolovane genomske DNK bolesnika sa KP i BPH).

4.3. Rezultati odabira genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa

Na osnovu kriterijuma datih u poglavlju Materijal i metode (vidi poglavlje 3.2.3.) odabrano je devet genetičkih varijanti za analizu u okviru ove teze. Izabrane genetičke varijante u genima za mikroRNK prikazane na slici 4.2, dok su varijante u genima za komponente utišavajućeg kompleksa prikazane u tabeli 4.3. Varijante u genima za miR-146a, miR-196a2 i mir-499 koje su rezultat odabira nalaze se u regionima koji kodiraju zrele prateće lance mikroRNK, dok se izabrana varijanta u genu za miR-27a nalazi u regionu koji kodira terminalnu petlju pre-mikroRNK. Kada je reč o genima za proteine utišavajućeg kompleksa, *AGO2* je izabran za predstavnika familije proteina Argonaut, na osnovu rezultata koji pokazuju njegovu izmenjenu ekspresiju u KP u odnosu na neizmenjeno tkivo prostate.

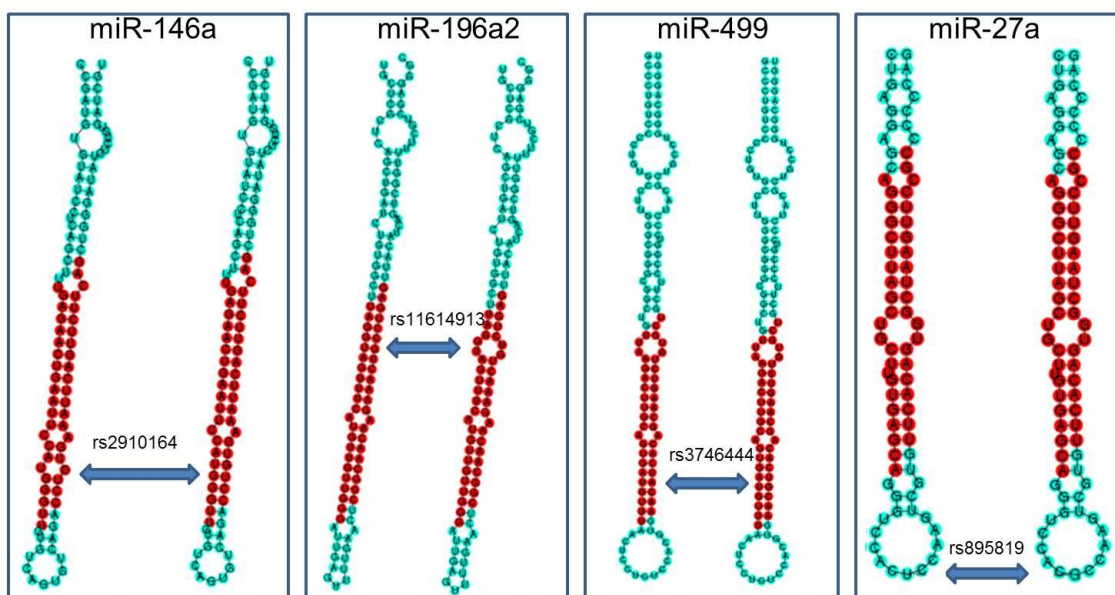


Tabela 4.3. Varijante u genima za proteine utišavajućeg kompleksa izabrane za analizu.

Gen	Genetička varijanta	Pozicija
<i>DICER1</i>	rs3742330	3' UTR
<i>TARBP2</i>	rs784567	promotor
<i>AGO2</i>	rs4961280	promotor
<i>GEMIN3</i>	rs197414	egzon (p.R693S)
<i>GEMIN4</i>	rs7813	egzon (p.R1033C)

4.4. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs7813

Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs7813 pomoću TaqMan[®] eseja za genotipizaciju polimorfizama (*Applied Biosystems*, SAD) prikazivani su tabelarno (slika 4.3), kao i u vidu grafikona (slika 4.4). U tabelarnom prikazu navedene su normalizovane vrednosti intenziteta fluorescencije obe boje koje odgovaraju pojedinačnim alelima ispitivanih genetičkih varijanti, kao i genotip uzorka određen automatski ili manuelno, pregledom krivih amplifikacije i poređenjem sa kontrolnim uzorcima (slika 4.3).

Na grafikonu (slika 4.4) predstavljeni su analizirani uzorci sa dodeljenim genotipovima. Plavim rombom predstavljeni su homozigoti za alel kojim je obeležena Y osa, crvenim krugom homozigoti za alel kojim je obeležena X osa i zelenim trouglom heterozigotni uzorci. Uzorci za koje nije uspešno utvrđen genotip predstavljeni su crnim znakom „X“ i za njih je genotipizacija ponavljana. Uzorcima su genotipovi dodeljivani automatski ili manuelno, kada automatsko dodeljivanje nije bilo uspešno.

U prvoj fazi, za potrebe testiranja asocijacije genetičke varijante rs2910164 sa rizikom za razvoj i progresiju KP, genotipizovano je 286 uzoraka bolesnika sa KP, 271 bolesnika sa BHP i 199 kontrolnih uzoraka. U narednoj fazi, za potrebe analize asocijacije potencijalnih epistatičkih interakcija između ispitivanih genetičkih varijanti i rizika za razvoj i progresiju KP, sprovedena je genotipizacija za još 69 bolesnika sa KP, 89 bolesnika sa BHP i 119 zdravih muškaraca iz kontrolne grupe. Rezultati

genotipizacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs7813 za kompletnu kolekciju uzoraka prikazani su u tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs7813.

Genotip	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BHP (%)
rs2910164			
GG	184 (64.3)	129 (64.8)	158 (58.3)
GC	90 (31.5)	63 (31.7)	95 (35.1)
CC	12 (4.2)	7 (3.5)	18 (6.6)
rs7813			
TT	151 (42.8)	152 (49.4)	181 (51.4)
TC	172 (48.7)	137 (44.5)	142 (40.3)
CC	30 (8.5)	19 (6.2)	29 (8.2)

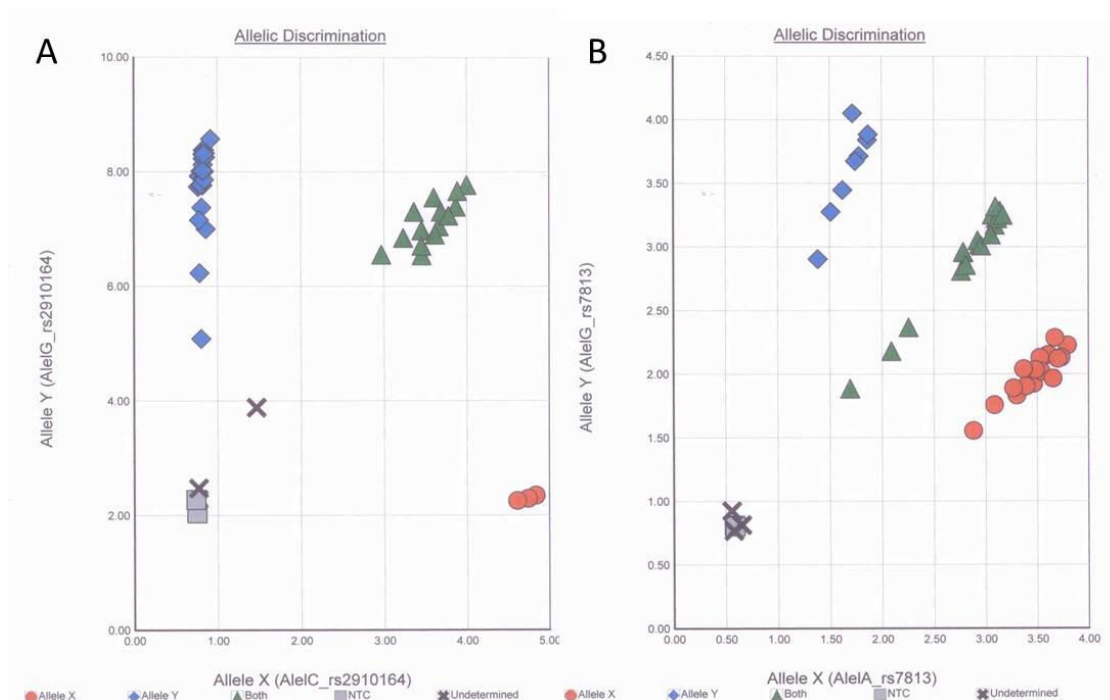
A

Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality	Method
A7	NTC	miR-146a_rs2910164	NTC	117465.180	0.735	1.986	NTC		
B7	NTC	miR-146a_rs2910164	NTC	129344.875	0.731	1.779	NTC		
C7	PCa223	miR-146a_rs2910164	Unknown	125046.445	0.821	2.151	Undetermined	4.37	Auto Call
D7	PCa224	miR-146a_rs2910164	Unknown	134984.719	0.745	5.843	AlelG_rs2910164	99.03	Auto Call
E7	PCa225	miR-146a_rs2910164	Unknown	119633.250	4.126	2.088	AlelC_rs2910164	99.90	Auto Call
F7	PCa226	miR-146a_rs2910164	Unknown	113877.992	2.459	5.573	Both	99.37	Auto Call
G7	PCa227	miR-146a_rs2910164	Unknown	104904.828	0.746	7.179	AlelG_rs2910164	99.98	Auto Call
H7	PCa228	miR-146a_rs2910164	Unknown	118465.219	0.680	6.742	AlelG_rs2910164	99.74	Auto Call
A8	PCa229	miR-146a_rs2910164	Unknown	104883.414	3.894	2.064	AlelC_rs2910164	100.00	Auto Call
B8	PCa230	miR-146a_rs2910164	Unknown	98193.781	2.237	4.677	Both	98.93	Auto Call
C8	PCa231	miR-146a_rs2910164	Unknown	125770.961	0.756	4.129	AlelG_rs2910164	100.00	Manual Call
D8	PCa232	miR-146a_rs2910164	Unknown	123515.398	2.807	6.181	Both	99.83	Auto Call

B

Well	Sample Name	Marker	Task	Pass.Ref	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality	Method
A1	NTC	Gemin4_rs7813	NTC	125647.352	0.598	0.833	NTC		
B1	NTC	Gemin4_rs7813	NTC	136508.938	0.585	0.792	NTC		
C1	PCa131	Gemin4_rs7813	Unknown	107912.672	2.121	2.348	Both	99.56	Auto Call
D1	PCa132	Gemin4_rs7813	Unknown	140504.750	3.838	2.290	AlelA_rs7813	99.68	Auto Call
E1	PCa133	Gemin4_rs7813	Unknown	124993.523	1.451	3.055	AlelG_rs7813	99.47	Auto Call
F1	PCa134	Gemin4_rs7813	Unknown	116543.219	3.303	3.547	Both	99.51	Auto Call
G1	PCa135	Gemin4_rs7813	Unknown	99733.984	3.161	3.435	Both	99.64	Auto Call
H1	PCa136	Gemin4_rs7813	Unknown	55089.039	1.821	1.737	Both	96.78	Auto Call
A2	PCa137	Gemin4_rs7813	Unknown	115563.883	2.621	2.683	Both	99.90	Auto Call
B2	PCa138	Gemin4_rs7813	Unknown	121598.336	2.354	1.371	AlelA_rs7813	97.08	Auto Call
C2	PCa139	Gemin4_rs7813	Unknown	122478.891	2.606	2.847	Both	99.94	Auto Call

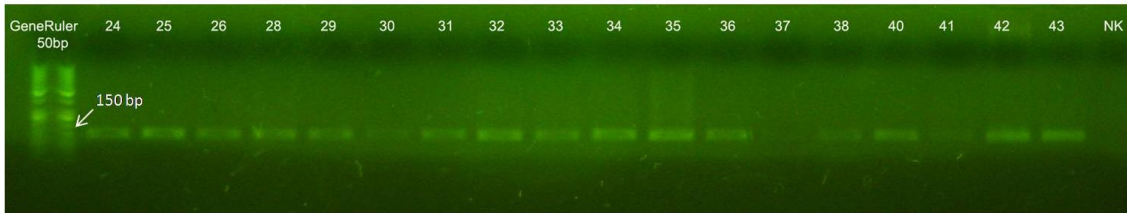
Slika 4.3. Tabela prikaz rezultata genotipizacije genetičkih varijanti: A) rs2910164 i B) rs7813, konstruisan pomoću 7500 Fast System SDS Software (Applied Biosystems, SAD). Označeni su normalizovani intenziteti fluorescencije pojedinačnih fluorescentnih boja (kolone „Allele X Rn“ i „Allele Y Rn“) i genotipovi (kolona „Call“).



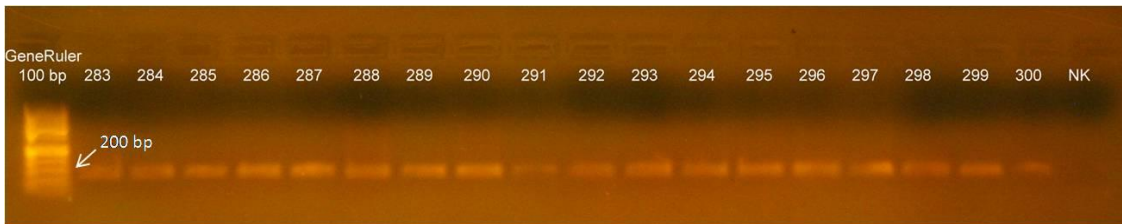
Slika 4.4. Grafički prikaz rezultata genotipizacije genetičkih varijanti: A) rs2910164 i B) rs7813, konstruisan pomoću 7500 Fast System SDS Software (Applied Biosystems, SAD). Homozigoti za alel kojem odgovara Y osa prikazani su pomoću plavih rombova, homozigoti za alel kojem odgovara X osa pomoću crvenih krugova, a heterozigoti zelenim trouglovima. Negativne kontrole predstavljene su sivim kvadratićima, a neuspješno genotipizovani uzorci znakom „X“.

4.5. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs3746444 i rs197414

Specifičnost PCR amplifikacije fragmenata molekula DNK koji okružuju ispitivane genetičke varijante rs3746444 (slika 4.5) i rs197414 (slika 4.6) proveravana je elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Prisustvo jedne diskretne trake očekivane dužine ukazivalo je na specifičnu amplifikaciju DNK fragmenta od interesa.

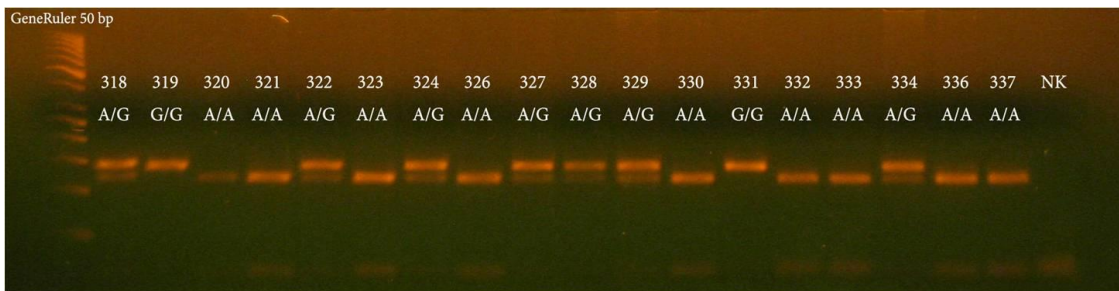


Slika 4.5. Provera uspešnosti i specifičnosti PCR amplifikacije fragmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs3746444 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu sa bojom Midori Green. (GeneRuler 50bp - standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50bp; brojevima od 24 do 43 obeleženi su amplifikovani fragmenati DNK uzoraka bolesnika sa KP i BPH; NK – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata DNK iznosila je 146 bp.

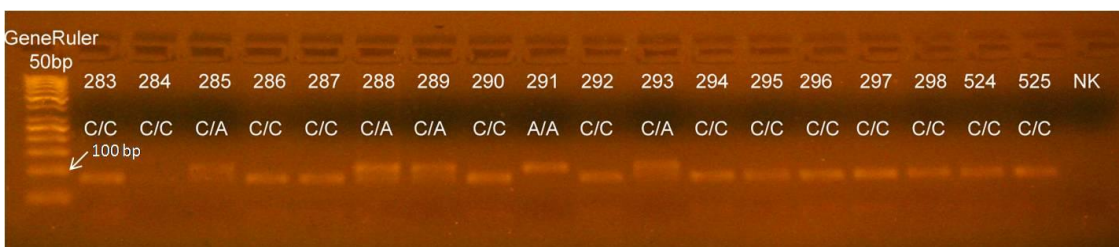


Slika 4.6. Provera uspešnosti i specifičnosti PCR amplifikacije fragmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs197414 elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu sa Et-Br. (GeneRuler 100 bp - standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 100bp; brojevima od 283 do 300 obeleženi su amplifikovani fragmenati DNK uzoraka bolesnika sa KP i BPH; NK – negativna kontrola). Očekivana dužina umnoženih fragmenata DNK iznosila je 111 bp.

Genotipizacija genetičkih varijanti rs3746444 (slika 4.7) i rs197414 (slika 4.8), vršena je pomoću PCR-RFLP metode. Fragmenti dobijeni restrikcijom digestijom produkata PCR amplifikacije segmenata DNK koji okružuju navedene genetičke varijante analizirani su elektroforezom u 3% agaroznom gelu. Kratki fragmenti veličina 26 i 27 bp bili su slabo uočljivi usled male količine vezanog Et-Br. Rezultati genotipizacije prikazani su u tabeli 4.5.



Slika 4.7. **Rezultati genotipizacije rs3746444 metodom PCR-RFLP.** Genotip GG predstavljen je prisustvom traka veličine 120 i 26 bp (uzorci 320, 321, 323, 326, 330, 332, 333, 336 i 337), genotip GA sa tri trake veličine 146, 120 i 26 bp (uzorci 318, 322, 324, 327, 328, 329 i 334), a genotip AA samo jedne trake veličine 146 bp (uzorci 319 i 331). (GeneRuler 50 bp - standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp; brojevima od 318 do 337 označeni su uzorci bolesnika sa KP i BHP; NK – negativna kontrola).



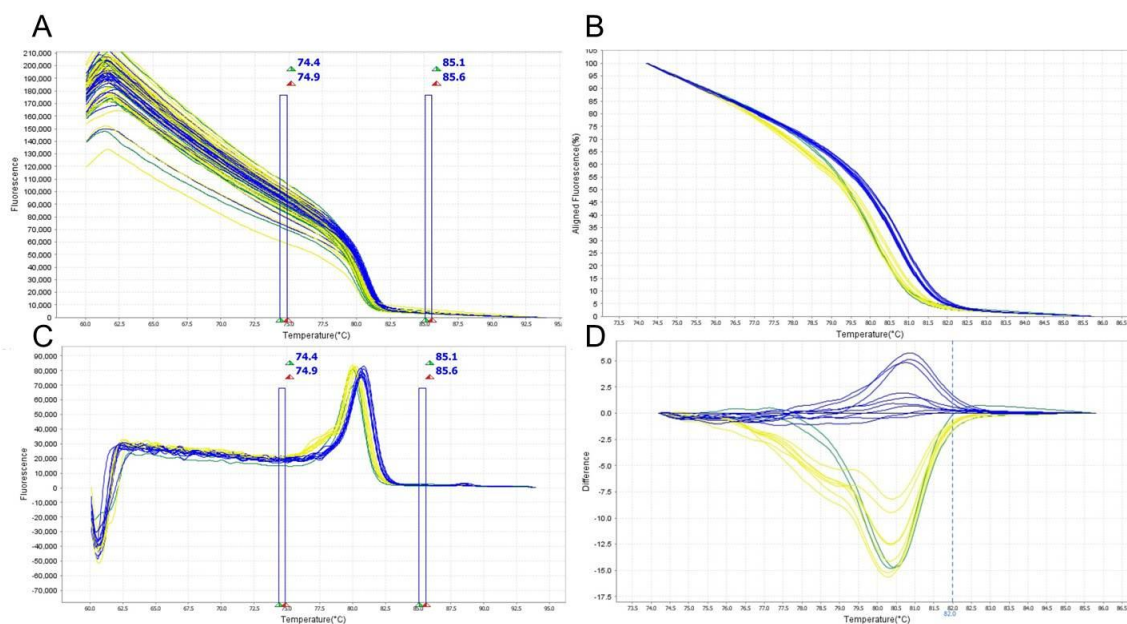
Slika 4.8. **Rezultati genotipizacije rs197414 metodom PCR-RFLP.** Genotip CC predstavljen je prisustvom traka veličine 84 i 27 bp (uzorci 283, 284, 286, 287, 290, 292, 294, 295, 296, 297, 298, 524 i 525), genotip CA sa tri trake veličine 111, 84 i 27 bp (uzorci 285, 288, 289 i 293), a genotip AA samo jedne trake veličine 111 bp (uzorak 291). (GeneRuler 50 bp - standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50 bp; brojevima od 283 do 525 označeni su uzorci bolesnika sa KP i BHP; NK – negativna kontrola).

Tabela 4.5. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs3746444 i rs197414.

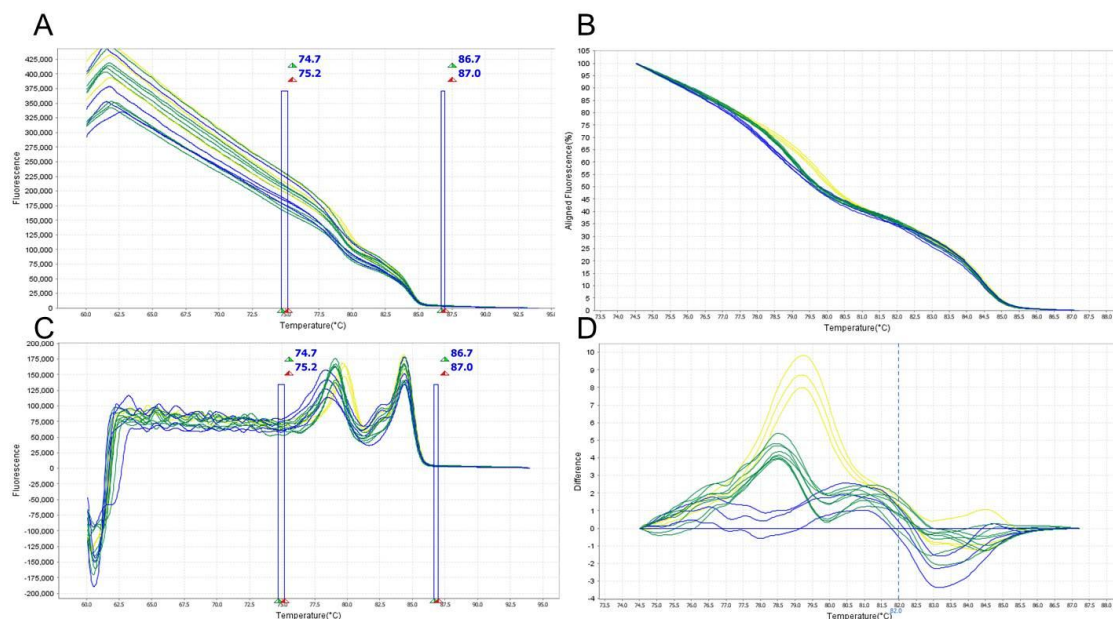
Genotip	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BHP (%)
rs3746444			
AA	190 (53.5)	180 (58.6)	196 (55.5)
AG	147 (41.4)	110 (35.8)	135 (38.2)
GG	18 (5.1)	17 (5.5)	22 (6.2)
rs197414			
CC	268 (75.9)	233 (73)	264 (73.5)
CA	75 (21.2)	75 (23.5)	81 (22.6)
AA	10 (2.8)	11 (3.5)	14 (3.9)

4.6. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs11614913, rs3742330 i rs784567

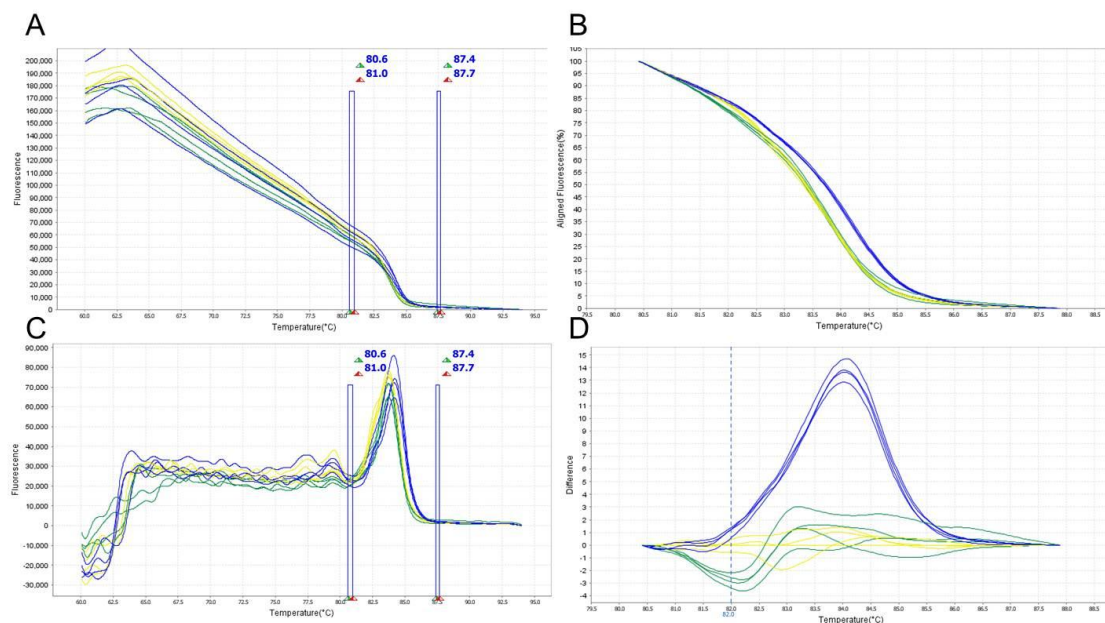
Genotipizacija genetičkih varijanti rs11614913 (slika 4.9), rs3742330 (slika 4.10) i rs784567 (slika 4.11) vršena je pomoću HRMA metode. Genotipovi su određivani na osnovu grafikona konstruisanih pomoću odgovarajućeg softvera i poređenjem sa krivama koje odgovaraju referentnim uzorcima. Rezultati genotipizacije navedenih genetičkih varijanti prikazani su u tabeli 4.6.



Slika 4.9. Rezultati genotipizacija genetičke varijante rs11614913 metodom HRMA. A) neobrađene krive topljenja; B) poravnate krive topljenja; C) dijagram brzine promene fluorescencije u zavisnosti od temperature; D) dijagram razlika u odnosu na krivu topljenja izabranog referentnog uzorka (Plavom bojom označeni su uzorci homozigotni za alel C, zelenom homozigotni za alel T, a žutom heterozigotni. Uspravnim stubićima obeležene su granice regiona topljenja koje služe za normalizaciju rezultata).



Slika 4.10. Rezultati genotipizacija genetičke varijante rs3742330 metodom HRMA. A) neobrađene krive topljenja; B) poravnate krive topljenja; C) dijagram brzine promene fluorescencije u zavisnosti od temperature; D) dijagram razlika u odnosu na krivu topljenja izabranog referentnog uzorka (Zelenom bojom označeni su uzorci homozigotni za alel A, žutom homozigoti za alel G, a plavom heterozigoti. Uspravnim stubićima obeležene su granice regiona topljenja koje služe za normalizaciju rezultata).



Slika 4.11. Rezultati genotipizacija genetičke varijante rs784567 metodom HRMA. Uspravnim stubićima obeležene su granice regiona topljenja koje služe za normalizaciju rezultata. A) neobrađene krive topljenja; B) poravnate krive topljenja; C) dijagram brzine promene fluorescencije u zavisnosti od temperature; D) dijagram razlika u odnosu na krivu topljenja izabranog referentnog uzorka (Plavom bojom označeni su uzorci homozigotni za alel G, žutom homozigoti za alel A, a zelenom heterozigoti).

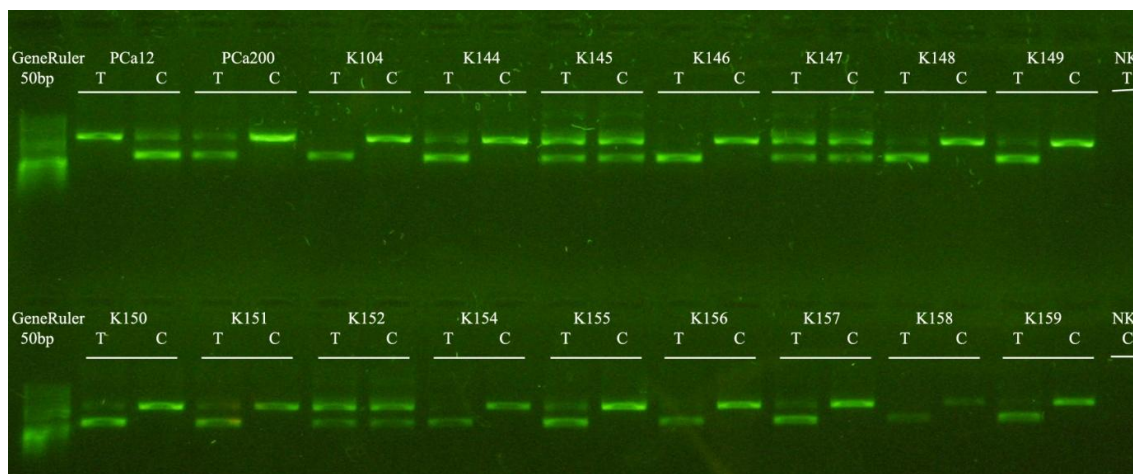
Tabela 4.6. Rezultati genotipizacije genetičkih varijanti rs11614913, rs3742330 i rs784567.

Genotip	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BHP (%)
rs11614913			
CC	150 (42.7)	121 (39.2)	145 (41.2)
CT	161 (45.9)	147 (47.6)	156 (44.3)
TT	40 (11.4)	41 (13.3)	51 (14.5)
rs3742330			
AA	285 (80.7)	259 (81.5)	276 (76.9)
AG	62 (17.6)	53 (16.7)	76 (21.2)
GG	6 (1.7)	6 (1.9)	7 (2)
rs784567			
GG	100 (28.2)	111 (34.9)	94 (26.1)
GA	169 (47.6)	139 (43.7)	190 (52.8)
AA	86 (24.2)	68 (21.4)	76 (21.1)

4.7. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs895819

Genotipizacija genetičke varijante rs895819 vršena je pomoću metode PCR-a specifičnog za alel. Fragmenti dobijeni PCR amplifikacijom segmenata molekula DNK koji okružuju navedenu genetičku varijantu analizirani su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu (slika 4.12).

Genotipovi su određivani kombinacijom rezultata elektroforeze za dve različite reakcione smeše koje odgovaraju istom uzorku (smeše T i C). Ukoliko uzorak nije posedovao alel kojem odgovara reakciona smeša, rezultat elektroforeze bila je jedna traka veličine koja odgovara produktu PCR reakcije od 547 bp, dok je u suprotnom detektovana i traka koja odgovara veličini PCR produkta od 337 bp. U nekim slučajevima, ukoliko je bila prisutna traka koja odgovara produktu PCR amplifikacije specifičnom za alel (337 bp), nije istovremeno bila uočljiva traka koja odgovara produktu od 547 bp usled preferencijalne amplifikacije kraćeg DNK fragmenta. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs895819 prikazani su u tabeli 4.7.



Slika 4.12. Fragmenti dobijeni PCR amplifikacijom segmenta DNK koji okružuje genetičku varijantu rs895819 i PCR reakcijom specifičnom za alel. Genotip CC predstavljen je prisustvom trake veličine 337 bp (ili još i trake veličine 547 bp) koja odgovara smeši C i jedne trake veličine 547 bp koja odgovara smeši T (uzorak PCa12). Genotip TT predstavljen je prisustvom trake veličine 337 bp (ili još i trake veličine 547 bp) koja odgovara smeši T i jedne trake veličine 547 bp koja odgovara smeši C (uzorci PCa200, K104, K144, K146, K148, K149, K150, K151, K154, K155, K156, K157, K158 i K159). Genotip TC predstavljen je sa po dve trake veličine 337 bp i 547 bp koje odgovaraju obema smešama (uzorci K145, K147 i K152) (GeneRuler 50bp - standard za dužinu fragmenata DNK *GeneRuler* 50bp; oznakama PCa12 i PCa200 predstavljeni su uzorci bolesnika sa KP, a sa K104 do K159 uzorci zdravih muškaraca iz kontrolne grupe; NK – negativna kontrola).

Tabela 4.7. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs895819.

Genotip	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BHP (%)
TT	151 (42.8)	152 (49.4)	181 (51.4)
TC	172 (48.7)	137 (44.5)	142 (40.3)
CC	30 (8.5)	19 (6.2)	29 (8.2)

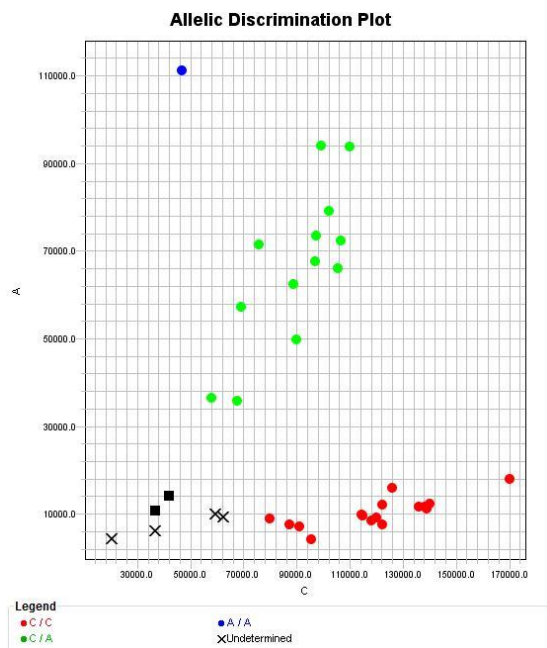
4.8. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs4961280

Genetička varijanta rs4961280 genotipizovana je pomoću eseja baziranog na PCR-u u realnom vremenu uz upotrebu specifičnih proba. Kao i prilikom genotipizacije genetičkih varijanti korišćenjem TaqMan[®] eseja za genotipizaciju polimorfizama (*Applied Biosystems, SAD*), rezultati su prikazivani tabelarno (slika 4.13), kao i u vidu grafikona (slika 4.14).

U tabelarnom prikazu navedene su normalizovane vrednosti intenziteta fluorescencije boja koje odgovaraju pojedinačnim alelima ispitivane genetičke varijante, kao i genotip uzorka (slika 4.13). Na grafikonu su predstavljeni analizirani uzorci sa dodeljenim genotipovima. Plavim krugovima predstavljeni su homozigoti za alel A, crvenim homozigoti za alel C, a zelenim heterozigotni uzorci. Uzorci za koje nije uspešno utvrđen genotip predstavljeni su crnim znakom „X“ (slika 4.14) i za njih je genotipizacija ponavljana. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs4961280 prikazani su u tabeli 4.8.

#	Well	Sample Name	SNP Assay ...	Allele 1	Allele 2	Allele 1 Δ...	Allele 2 Δ...	Pass.Ref	Call	Quality(%)	Method	Allele 1 Cr	Allele 2 Cr
Heterozygous 1/2													
1	A12	PCa573	AG02	C	A	74,002.812	72,572.326	0	Heteroz...	99.313	Auto	24.446	23.126
2	B10	PCa72	AG02	C	A	56,165.408	37,571.781	0	Heteroz...	97.367	Auto	9.277	29.698
3	B12	PCa574	AG02	C	A	106,022.625	84,877.047	0	Heteroz...	99.424	Auto	22.325	20.69
4	C1	PCa1	AG02	C	A	95,325.25	74,827.281	0	Heteroz...	99.954	Auto	24.281	6.666
5	C2	PCa9	AG02	C	A	104,833.291	73,397.422	0	Heteroz...	99.76	Auto	8.25	22.981
6	C10	PCa73	AG02	C	A	103,552.469	67,081.484	0	Heteroz...	99.626	Auto	9.781	5.954
7	C11	PCa567	AG02	C	A	87,002.408	63,552.164	0	Heteroz...	99.982	Auto	7.767	5.717
8	D11	PCa568	AG02	C	A	85,653.094	36,822.227	0	Heteroz...	99.02	Auto	8.085	27.209
9	D12	PCa576	AG02	C	A	100,372.812	80,280.023	0	Heteroz...	99.857	Auto	21.4	18.117
10	E10	PCa560	AG02	C	A	94,917.719	66,777.459	0	Heteroz...	99.946	Auto	9.659	6.735
11	G1	PCa5	AG02	C	A	87,913.453	50,988.469	0	Heteroz...	99.312	Auto	22.292	Undetermi...
12	G12	PCa579	AG02	C	A	87,309.031	58,403.953	0	Heteroz...	99.338	Auto	25.393	23.393
13	H12	PCa580	AG02	C	A	87,485.688	85,214.281	0	Heteroz...	99.336	Auto	24.359	21.258
Homozygous 1/1													
14	A2	PCa7	AG02	C	A	77,990.422	10,014.328	0	Homezy...	99.028	Auto	17.488	32.223
15	A11	PCa564	AG02	C	A	124,189.219	16,995.18	0	Homezy...	99.411	Auto	25.152	33.174
16	B11	PCa565	AG02	C	A	133,971.906	12,852.219	0	Homezy...	99.786	Auto	Undetermi...	Undetermi...
17	C12	PCa575	AG02	C	A	120,205.719	13,136.758	0	Homezy...	99.893	Auto	15.551	Undetermi...
18	D1	PCa2	AG02	C	A	168,253.219	19,087.156	0	Homezy...	98.186	Auto	19.568	6.881
19	D2	PCa10	AG02	C	A	136,933.125	12,188.727	0	Homezy...	99.77	Auto	8.488	Undetermi...
20	E2	PCa11	AG02	C	A	112,731.531	10,864.188	0	Homezy...	99.987	Auto	25.514	4.654
21	E11	PCa569	AG02	C	A	113,067.094	10,828.781	0	Homezy...	99.989	Auto	24.806	5.239
22	E12	PCa577	AG02	C	A	120,197.438	6,546.984	0	Homezy...	99.957	Auto	22.008	24.328
23	F1	PCa4	AG02	C	A	136,415.438	12,737.952	0	Homezy...	99.751	Auto	22.929	20.951
24	F2	PCa12	AG02	C	A	116,250.5	9,809.43	0	Homezy...	99.987	Auto	24.783	6.685
25	F12	PCa578	AG02	C	A	118,150.281	10,128.484	0	Homezy...	99.989	Auto	24.083	27.027
26	G2	PCa13	AG02	C	A	89,037.453	6,241.227	0	Homezy...	99.231	Auto	24.439	31.333
27	G11	PCa571	AG02	C	A	93,669.344	5,237.711	0	Homezy...	98.661	Auto	24.707	29.708
28	H1	PCa6	AG02	C	A	138,166.781	13,390.875	0	Homezy...	99.677	Auto	23.973	Undetermi...
29	H11	PCa572	AG02	C	A	85,324.25	6,672.125	0	Homezy...	99.135	Auto	25.391	30.468
Homozygous 2/2													
30	A10	PCa71	AG02	C	A	44,982.875	112,367.688	0	Homezy...	100	Auto	9.855	26.538
Negative Control (NC)													
31	A1		AG02	C	A	39,955.672	15,231.984	0	Negativ...	100	Auto	Undetermi...	Undetermi...
32	B1		AG02	C	A	34,755	11,919.891	0	Negativ...	100	Auto	7.907	Undetermi...
Undetermined													

Slika 4.13. Tabelarni prikaz rezultata genotipizacije genetičke varijante rs4961280, konstruisan pomoću HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 (Applied Biosystems, SAD).



Slika 4.14. Grafički prikaz rezultata genotipizacije genetičke varijante rs4961280, konstruisan pomoću HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 (Applied Biosystems, SAD). Homozigoti za alel kojem odgovara Y osa (alel A) prikazani su pomoću plavih krugova, homozigoti za alel kojem odgovara X osa (alel C) pomoću crvenih, a heterozigoti zelenim krugovima. Negativne kontrole predstavljene su crnim kvadratićima, a neuspešno genotipizovani uzorci znakom „X“.

Tabela 4.8. Rezultati genotipizacije genetičke varijante rs4961280.

Genotip	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BHP (%)
CC	230 (64.8)	194 (61)	243 (67.5)
CA	112 (31.6)	108 (34)	109 (30.3)
AA	13 (3.7)	16 (5)	8 (2.2)

4.9. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK sa rizikom za razvoj KP

Za potrebe testiranja asocijacije genetičke varijante rs2910164 sa rizikom za razvoj i progresiju KP, genotipizacija je sprovedena za 286 bolesnika sa KP, 271 bolesnika sa BHP i 199 kontrola. Za genetičke varijante rs3746444, rs11614913 i rs895819 genotipizovan je kompletan set uzoraka. Distribucije genotipova u grupama bolesnika sa KP i BHP, kao i u kontrolnoj grupi, prikazane su u tabeli 4.9. U kontrolnoj grupi nije uočeno odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže ni za jednu od testiranih genetičkih varijanti (prilog 1).

Tabela 4.9. Rezultati testova asocijacije varijanti u genima za mikroRNK sa rizikom za razvoj KP.

Genetička varijanta	Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BHP (%)	KP vs. kontrole			KP vs. BHP		
					OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC
rs2910164	Kodominantni									
	GG	184 (64.3)	129 (64.8)	158 (58.3)	1.00			1.00		
	GC	90 (31.5)	63 (31.7)	95 (35.1)	1.01 (0.68-1.49)	0.89	662.7	0.80 (0.56-1.15)	0.23	773.5
	CC	12 (4.2)	7 (3.5)	18 (6.6)	1.27 (0.48-3.33)			0.58 (0.27-1.25)		
	Dominantni									
	GG	184 (64.3)	129 (64.8)	158 (58.3)	1.00			1.00		
	GC+CC	102 (35.7)	70 (35.2)	113 (41.7)	1.03 (0.71-1.51)	0.87	660.9	0.77 (0.54-1.08)	0.13	772.1
	Recesivni									
	GG+GC	174 (95.8)	192 (96.5)	252 (92.4)	1.00			1.00		
	CC	12 (4.2)	7 (3.5)	18 (6.6)	1.26 (0.49-3.29)	0.63	660.7	0.63 (0.30-1.33)	0.22	772.9
	Overdominantni									
	GG + CC	196 (68.5)	136 (68.3)	176 (64.9)	1.00			1.00		
	GC	90 (31.5)	63 (31.7)	95 (35.1)	0.99 (0.67-1.47)	0.98	660.9	0.84 (0.59-1.19)	0.33	773.5
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	1.05 (0.76-1.45)	0.76	660.8	0.78 (0.59-1.04)	0.088 ^b	771.5
rs3746444	Kodominantni									
	AA	190 (53.5)	180 (58.6)	196 (55.5)	1.00			1.00		
	AG	147 (41.4)	110 (35.8)	135 (38.2)	1.26 (0.92-1.75)	0.35	912.5	1.10 (0.80-1.49)	0.74	979.5
	GG	18 (5.1)	17 (5.5)	22 (6.2)	1.03 (0.51-2.06)			0.87 (0.45-1.69)		
	Dominantni									
	AA	190 (53.5)	180 (58.6)	196 (55.5)	1.00			1.00		
	AG+GG	165 (46.5)	127 (41.4)	157 (44.5)	1.23 (0.90-1.68)	0.19	910.9	1.06 (0.79-1.43)	0.68	977.9
	Recesivni									
	AA+AG	337 (94.9)	290 (94.5)	331 (93.8)	1.00			1.00		
	GG	18 (5.1)	17 (5.5)	22 (6.2)	0.93 (0.47-1.85)	0.84	912.6	0.84 (0.44-1.61)	0.6	977.8
	Overdominantni									
	AA + GG	208 (58.6)	197 (64.2)	218 (61.8)	1.00			1.00		
	AG	147 (41.4)	110 (35.8)	135 (38.2)	1.26 (0.92-1.73)	0.15	910.6	1.11 (0.82-1.50)	0.5	977.7
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	1.15 (0.88-1.48)	0.3	911.6	1.02 (0.80-1.30)	0.89	978.1

rs11614913

Kodominantni										
CC	150 (42.7)	121 (39.2)	145 (41.2)	1.00				1.00		
CT	161 (45.9)	147 (47.6)	156 (44.3)	0.90 (0.65-1.25)	0.63	912.4	1.00 (0.73-1.38)	0.38	971.4	
TT	40 (11.4)	41 (13.3)	51 (14.5)	0.79 (0.48-1.31)			0.73 (0.45-1.17)			
Dominantni										
CC	150 (42.7)	121 (39.2)	145 (41.2)	1.00			1.00			
CT+TT	201 (57.3)	188 (60.8)	207 (58.8)	0.88 (0.64-1.20)	0.41	910.7	0.93 (0.69-1.26)	0.65	971.1	
Recesivni										
CC+CT	311 (88.6)	268 (86.7)	301 (85.5)	1.00			1.00			
TT	40 (11.4)	41 (13.3)	51 (14.5)	0.84 (0.53-1.34)	0.47	910.8	0.73 (0.47-1.14)	0.16	969.4	
Overdominantni										
CC + TT	190 (54.1)	162 (52.4)	196 (55.7)	1.00			1.00			
CT	161 (45.9)	147 (47.6)	156 (44.3)	0.95 (0.70-1.29)	0.74	911.2	1.08 (0.80-1.45)	0.63	971.1	
Log-aditivni										
-	-	-	-	0.89 (0.71-1.12)	0.34	910.4	0.89 (0.72-1.11)	0.31	970.3	

rs895819

Kodominantni										
TT	151 (42.8)	152 (49.4)	181 (51.4)	1.00			1.00			
TC	172 (48.7)	137 (44.5)	142 (40.3)	1.25 (0.91-1.73)	0.22	911.4	1.41 (1.03-1.93)*	0.094 ^b	971.4	
CC	30 (8.5)	19 (6.2)	29 (8.2)	1.54 (0.83-2.87)			1.22 (0.70-2.13)			
Dominantni										
TT	151 (42.8)	152 (49.4)	181 (51.4)	1.00			1.00			
TC+CC	202 (57.2)	156 (50.6)	171 (48.6)	1.29 (0.95-1.76)	0.11	909.8	1.38 (1.02-1.86)	0.035	969.7	
Recesivni										
TT+TC	323 (91.5)	289 (93.8)	323 (91.8)	1.00			1.00			
CC	30 (8.5)	19 (6.2)	29 (8.2)	1.37 (0.76-2.50)	0.29	911.3	1.03 (0.60-1.77)	0.91	974.1	
Overdominantni										
TT + CC	181 (51.3)	171 (55.5)	210 (59.7)	1.00			1.00			
TC	172 (48.7)	137 (44.5)	142 (40.3)	1.18 (0.87-1.61)	0.29	911.3	1.37 (1.01-1.85)	0.04	969.9	
Log-aditivni										
-	-	-	-	1.25 (0.97-1.60)	0.082 ^b	909.4	1.23 (0.97-1.55)	0.088 ^b	971.2	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano.

U poređenjima distribucija genotipova genetičkih varijanti rs2910164, rs3746444 i rs11614913 u grupi bolesnika sa KP i kontrolnoj grupi, kao i u grupama bolesnika sa KP i BHP, nije ustanovljena njihova asocijacija sa rizikom za razvoj KP (tabela 4.9).

S druge strane, za varijantu rs895819 u genu za miR-27a, poređenjem distribucije genotipova u grupama bolesnika sa KP i BHP pokazana je asocijacija manje učestalog alela C sa povećanim rizikom za razvoj KP. Testovi genetičkih asocijacija dali su statistički značajne rezultate za dva genetička modela, dominantni ($P=0.035$; OR=1.38, 95%CI 1.02-1.86) i overdominantni ($P=0.04$; OR=1.37, 95%CI 1.01-1.85), dok je za kodominantni i log-aditivni genetički model dobijen statistički trend značajnosti ($0.05 \leq P < 0.1$). Takođe, statistički trend značajnosti dobijen je u testu asocijacije varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* sa rizikom za razvoj KP po log-aditivnom genetičkom modelu u poređenju distribucija genotipova u grupama bolesnika sa KP i BHP (tabela 4.9).

4.10. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj KP

Distribucije genotipova ispitivanih genetičkih varijanti u grupama bolesnika sa KP i BHP, kao i u kontrolnoj grupi, prikazane su u tabeli 4.10. U kontrolnoj grupi nije uočeno odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže (prilog 1).

Ni za jednu ispitivanu genetičku varijantu u genima za proteine utišavajućeg kompleksa nije dobijena statistička značajnost u testovima asocijacije sa rizikom za razvoj KP. Međutim, za genetičku varijantu rs784567 u genu *TARBP2* dostignut je statistički trend značajnosti u poređenju distribucije genotipova u grupi bolesnika sa KP i kontrolnoj grupi. Za recesivni genetički model, koji prema AIC skorom najbolje opisuje uočene razlike, dobijena je P vrednost od 0.055 uz OR=1.38 i 95%CI 0.99-1.92. Drugi genetički model za koji je dobijen statistički trend značajnosti je log-aditivni sa $P=0.078$.

Tabela 4.10. Rezultati testova asocijacije varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj KP.

Genetička varijanta	Genetički model	Broj bolesnika sa KP (%)	Broj kontrola (%)	Broj bolesnika sa BHP (%)	KP vs. kontrole			KP vs. BHP		
					OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3742330										
	Kodominantni									
	AA	285 (80.7)	259 (81.5)	276 (76.9)	1.00			1.00		
	AG	62 (17.6)	53 (16.7)	76 (21.2)	1.09 (0.73-1.64)	0.91	928.7	0.80 (0.55-1.16)	0.49	984.2
	GG	6 (1.7)	6 (1.9)	7 (2)	0.92 (0.29-2.92)			0.88 (0.29-2.71)		
	Dominantni									
	AA	285 (80.7)	259 (81.5)	276 (76.9)	1.00			1.00		
	AG+GG	68 (19.3)	59 (18.6)	83 (23.1)	1.07 (0.73-1.58)	0.73	926.8	0.80 (0.56-1.16)	0.24	982.3
	Recesivni									
	AA+AG	347 (98.3)	312 (98.1)	352 (98)	1.00			1.00		
	GG	6 (1.7)	6 (1.9)	7 (2)	0.91 (0.29-2.87)	0.87	926.9	0.93 (0.30-2.83)	0.89	983.7
	Overdominantni									
	AA + GG	291 (82.4)	265 (83.3)	283 (78.8)	1.00			1.00		
	AG	62 (17.6)	53 (16.7)	76 (21.2)	1.09 (0.73-1.64)	0.67	926.7	0.80 (0.55-1.16)	0.24	982.3
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	1.05 (0.74-1.47)	0.8	926.9	0.84 (0.61-1.15)	0.28	982.5
rs4961280										
	Kodominantni									
	CC	230 (64.8)	194 (61)	243 (67.5)	1.00			1.00		
	CA	112 (31.6)	108 (34)	109 (30.3)	0.88 (0.63-1.22)	0.51	930.3	1.09 (0.79-1.50)	0.54	988.5
	AA	13 (3.7)	16 (5)	8 (2.2)	0.68 (0.32-1.46)			1.61 (0.65-3.98)		
	Dominantni									
	CC	230 (64.8)	194 (61)	243 (67.5)	1.00			1.00		
	CA+AA	125 (35.2)	124 (39)	117 (32.5)	0.85 (0.62-1.17)	0.33	928.7	1.12 (0.82-1.53)	0.47	987.2
	Recesivni									
	CC+CA	342 (96.3)	302 (95)	352 (97.8)	1.00			1.00		
	AA	13 (3.7)	16 (5)	8 (2.2)	0.71 (0.33-1.51)	0.38	928.9	1.56 (0.64-3.85)	0.32	986.8
	Overdominantni									
	CC + AA	243 (68.5)	210 (66)	251 (69.7)	1.00			1.00		
	CA	112 (31.6)	108 (34)	109 (30.3)	0.90 (0.65-1.25)	0.53	929.3	1.06 (0.77-1.46)	0.7	987.6
	Log-aditivni									
	-	-	-	-	0.86 (0.66-1.12)	0.26	928.4	1.14 (0.87-1.50)	0.35	986.9

rs784567										
Kodominantni										
GG	100 (28.2)	111 (34.9)	94 (26.1)	1.00			1.00			
GA	169 (47.6)	139 (43.7)	190 (52.8)	1.36 (0.95-1.93)	0.15	927.8	0.84 (0.59-1.19)	0.33	987.5	
AA	86 (24.2)	68 (21.4)	76 (21.1)	1.43 (0.94-2.17)			1.10 (0.72-1.67)			
Dominantni										
GG	100 (28.2)	111 (34.9)	94 (26.1)	1.00			1.00			
GA+AA	255 (71.8)	207 (65.1)	266 (73.9)	1.38 (0.99-1.92)	0.055 ^b	925.9	0.91 (0.65-1.27)	0.59	987.5	
Recesivni										
GG+GA	269 (75.8)	250 (78.6)	284 (78.9)	1.00			1.00			
AA	86 (24.2)	68 (21.4)	76 (21.1)	1.19 (0.83-1.72)	0.34	928.7	1.23 (0.86-1.75)	0.25	986.4	
Overdominantni										
GG + AA	186 (52.4)	179 (56.3)	170 (47.2)	1.00			1.00			
GA	169 (47.6)	139 (43.7)	190 (52.8)	1.17 (0.86-1.58)	0.32	928.6	0.81 (0.60-1.08)	0.15	985.7	
Log-aditivni										
-	-	-	-	1.21 (0.98-1.49)	0.078 ^b	926.5	1.04 (0.84-1.28)	0.74	987.6	
rs7813										
Kodominantni										
AA	114 (32.1)	101 (31.7)	122 (33.9)	1.00			1.00			
AG	181 (51)	169 (53)	176 (48.9)	0.96 (0.68-1.36)	0.79	933.2	1.09 (0.79-1.52)	0.86	989.4	
GG	60 (16.9)	49 (15.4)	62 (17.2)	1.12 (0.70-1.78)			1.03 (0.66-1.60)			
Dominantni										
AA	114 (32.1)	101 (31.7)	122 (33.9)	1.00			1.00			
AG+GG	241 (67.9)	218 (68.3)	238 (66.1)	1.00 (0.72-1.38)	0.99	931.7	1.08 (0.79-1.47)	0.65	987.5	
Recesivni										
AA+AG	295 (83.1)	270 (84.6)	298 (82.8)	1.00			1.00			
GG	60 (16.9)	49 (15.4)	62 (17.2)	1.15 (0.76-1.74)	0.52	931.2	0.97 (0.66-1.44)	0.89	987.7	
Overdominantni										
AA + GG	174 (49)	150 (47)	184 (51.1)	1.00			1.00			
AG	181 (51)	169 (53)	176 (48.9)	0.93 (0.68-1.26)	0.62	931.4	1.08 (0.81-1.46)	0.59	987.5	
Log-aditivni										
-	-	-	-	1.04 (0.83-1.30)	0.73	931.5	1.03 (0.83-1.27)	0.81	987.7	

rs197414

Kodominantni										
CC	268 (75.9)	233 (73)	264 (73.5)	1.00				1.00		
CA	75 (21.2)	75 (23.5)	81 (22.6)	0.88 (0.61-1.27)	0.75	930.3	0.90 (0.63-1.29)	0.68	985.1	
AA	10 (2.8)	11 (3.5)	14 (3.9)	0.83 (0.34-2.00)			0.74 (0.32-1.70)			
Dominantni										
CC	268 (75.9)	233 (73)	264 (73.5)	1.00			1.00			
CA+AA	85 (24.1)	86 (27)	95 (26.5)	0.87 (0.62-1.24)	0.45	928.3	0.88 (0.62-1.23)	0.45	983.3	
Recesivni										
CC+CA	343 (97.2)	308 (96.5)	345 (96.1)	1.00			1.00			
AA	10 (2.8)	11 (3.5)	14 (3.9)	0.85 (0.35-2.05)	0.72	928.8	0.76 (0.33-1.73)	0.51	983.5	
Overdominantni										
CC + AA	278 (78.8)	244 (76.5)	278 (77.4)	1.00			1.00			
CA	75 (21.2)	75 (23.5)	81 (22.6)	0.89 (0.62-1.28)	0.52	928.5	0.91 (0.64-1.31)	0.62	983.7	
Log-aditivni										
-	-	-	-	0.89 (0.66-1.20)	0.45	928.3	0.88 (0.66-1.17)	0.39	983.2	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

4.11. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP

Za potencijalnu asocijaciju varijanti u genima za mikroRNK sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA nije pokazana statistička značajnost (prilog 2). S druge strane, poređenjem učestalosti genotipova rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* u grupama bolesnika sa KP kod kojih je utvrđen $GS \geq 7$ i $GS < 7$ dobijena je statistička značajnost za kodominantni ($P=0.0096$; $OR_{GC}=1.57$, 95%CI 0.93-2.66; $OR_{CC}=0.15$, 95%CI 0.02-1.17), overdominantni ($P=0.045$; $OR=1.70$, 95%CI 1.01-2.87) (tabela 4.11) i recesivni genetički model ($P=0.011$; $OR=0.13$, 95%CI 0.02-1.00). Ni za jednu drugu analiziranu varijantu u genima za mikroRNK nije pokazana asocijacija sa navedenim standardnim prognostičkim parametrom (prilog 3).

Tabela 4.11. Rezultati testova asocijacije genetičke varijante rs2910164 sa Glison skorom kod bolesnika sa KP.

Genetički model	Glison skor ($GS \geq 7$ vs. $GS < 7$)			P vrednost ^a	AIC
	$GS < 7$ (%)	$GS \geq 7$ (%)	OR (95% CI) ^a		
Kodominantni					
GG	107 (66.9)	69 (61.1)	1	0.0096*	366.7
GC	42 (26.2)	43 (38)	1.57 (0.93-2.66)		
CC	11 (6.9)	1 (0.9)	0.15 (0.02-1.17)		
Dominantni					
GG	107 (66.9)	69 (61.1)	1	0.33	373
GC+CC	53 (33.1)	44 (38.9)	1.29 (0.78-2.13)		
Recesivni					
GG+GC	149 (93.1)	112 (99.1)	1	0.011	367.6
CC	11 (6.9)	1 (0.9)	0.13 (0.02-1.00)		
Overdominantni					
GG + CC	118 (73.8)	70 (62)	1	0.045	370
GC	42 (26.2)	43 (38)	1.70 (1.01-2.87)		
Log-aditivni					
-	-	-	1.00 (0.66-1.53)	0.99	374

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano.

U analizama asocijacije navedenih genetičkih varijanti sa kliničkim stadijumom primarnog KP (prilog 4), statistička značajnost dobijena je samo u testovima koji su uključivali varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* i rs895819 u genu za miR-27a

(tabela 4.12). Za manje učestali alel C genetičke varijante rs2910164 pokazana je asocijacija sa višim stadijumom primarnog tumora za više različitih genetičkih modela (tabela 4.12).

Tabela 4.12. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa kliničkim stadijumom primarnog KP.

Genetički model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T3/4 vs. T1			T3/T4 vs. T2			T2 vs. T1		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC
rs2910164												
Kodominantni												
GG	37 (84.1)	78 (63.9)	49 (63.6)	1.00			1.00			1.00		
GC	7 (15.9)	37 (30.3)	27 (35.1)	3.12 (1.21-8.03)	0.03	157.8	1.17 (0.64-2.16)	0.19	270	2.51 (1.02-6.17)	0.014	190.2
CC	0 (0)	7 (5.7)	1 (1.3)	NA (0.00-NA)			0.21 (0.03-1.81)			NA (0.00-NA)		
Dominantni												
GG	37 (84.1)	78 (63.9)	49 (63.6)	1.00			1.00			1.00		
GC+CC	7 (15.9)	44 (36.1)	28 (36.4)	3.22 (1.25-8.27)	0.01	156.2	1.01 (0.56-1.84)	0.96	271.3	2.94 (1.21-7.17)	0.011	190.2
Recesivni												
GG+GC	44 (100)	115 (94.3)	76 (98.7)	1.00			1.00			1.00		
CC	0 (0)	7 (5.7)	1 (1.3)	NA (0.00-NA)	0.37	162	0.20 (0.02-1.70)	0.081 ^b	268.3	NA (0.00-NA)	0.045	192.7
Overdominantni												
GG + CC	37 (84.1)	85 (69.7)	50 (64.9)	1.00			1.00			1.00		
GC	7 (15.9)	37 (30.3)	27 (35.1)	3.07 (1.19-7.90)	0.014	156.8	1.25 (0.68-2.30)	0.47	270.8	2.32 (0.95-5.70)	0.052 ^b	193
Log-aditivni	-	-	-	3.20 (1.26-8.12)	0.0087	155.9	0.87 (0.52-1.45)	0.6	271.1	2.88 (1.25-6.64)	0.0054	189
rs895819												
Kodominantni												
TT	15 (30.6)	79 (46.8)	40 (43)	1.00			1.00			1.00		
TC	29 (59.2)	75 (44.4)	47 (50.5)	0.49 (0.24-0.99)	0.13	233.7	0.62 (0.29-1.33)	0.36	187.2	1.24 (0.73-2.10)	0.57	347.7
CC	5 (10.2)	15 (8.9)	6 (6.5)	0.60 (0.19-1.90)			0.48 (0.13-1.82)			0.79 (0.28-2.19)		
Dominantni												
TT	15 (30.6)	79 (46.8)	40 (43)	1.00			1.00			1.00		
TC+CC	34 (69.4)	90 (53.2)	53 (57)	0.51 (0.26-1.00)	0.046*	231.8	0.60 (0.29-1.26)	0.17	185.3	1.16 (0.70-1.94)	0.56	346.5
Recesivni												
TT+TC	44 (89.8)	154 (91.1)	87 (93.5)	1.00			1.00			1.00		
CC	5 (10.2)	15 (8.9)	6 (6.5)	0.90 (0.31-2.62)	0.84	235.7	0.64 (0.18-2.23)	0.49	186.7	0.70 (0.26-1.89)	0.48	346.3
Overdominantni												
TT + CC	20 (40.8)	94 (55.6)	46 (49.5)	1.00			1.00			1.00		
TC	29 (59.2)	75 (44.4)	47 (50.5)	0.55 (0.29-1.05)	0.066 ^b	232.4	0.71 (0.35-1.44)	0.35	186.3	1.28 (0.77-2.13)	0.34	345.9
Log-aditivni	-	-	-	0.67 (0.41-1.09)	0.11	233.2	0.66 (0.37-1.18)	0.16	185.2	1.03 (0.69-1.55)	0.88	346.8

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

*statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Za varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* i rs895819 u genu za miR-27a ustanovljena je i asocijacija sa razvojem udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP (tabela 4.13). Rezultati analize za rs3746444 u genu *hsa-miR-499* i rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2* prikazani su u prilogu 5. Za heterozigotni genotip rs2910164 pokazano je da povećava rizik za razvoj udaljenih metastaza uz marginalnu statističku značajnost ($P=0.05$; OR=1.95, 95%CI 1.01-3.79), dok je u slučaju rs895819 statistička značajnost dobijena za više testiranih genetičkim modela, pri čemu je najmanja vrednost AIC pokazana za dominantni model ($P=0.0015$; OR=2.86, 95%CI 1.44-5.71).

Tabela 4.13. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs2910164 i rs895819 sa prisustvom udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP.

Genetička varijanta	Genetički model	Prisustvo udaljenih metastaza			P vrednost ^a	AIC
		prisutne (%)	odsutne (%)	OR (95% CI) ^a		
rs2910164	Kodominantni					
	GG	157 (68.3)	24 (53.3)	1		
	GC	64 (27.8)	19 (42.2)	1.99 (1.02-3.89)	0.14	248.4
	CC	9 (3.9)	2 (4.4)	1.31 (0.26-6.54)		
	Dominantni					
	GG	157 (68.3)	24 (53.3)	1.00		
	GC+CC	73 (31.7)	21 (46.7)	1.89 (0.99-3.63)	0.056 ^b	246.6
	Recesivni					
	GG+GC	221 (96.1)	43 (95.6)	1.00	0.97	250.3
	CC	9 (3.9)	2 (4.4)	1.03 (0.21-5.06)		
	Overdominantni					
	GG + CC	166 (72.2)	26 (57.8)	1	0.05*	246.5
	GC	64 (27.8)	19 (42.2)	1.95 (1.01-3.79)		
Log-aditivni						
-	-	-	1.55 (0.91-2.63)	0.11	247.7	
rs895819	Kodominantni					
	TT	125 (46)	12 (23.1)	1.00		
	TC	124 (45.6)	36 (69.2)	3.05 (1.51-6.13)	0.0042	282.4
	CC	23 (8.5)	4 (7.7)	1.85 (0.55-6.28)		
	Dominantni					
	TT	125 (46)	12 (23.1)	1.00	0.0015	281.2
	TC+CC	147 (54)	40 (76.9)	2.86 (1.44-5.71)		
	Recesivni					
	TT+TC	249 (91.5)	48 (92.3)	1.00	0.87	291.3
	CC	23 (8.5)	4 (7.7)	0.92 (0.30-2.77)		
	Overdominantni					
	TT + CC	148 (54.4)	16 (30.8)	1.00	0.0016	281.3
	TC	124 (45.6)	36 (69.2)	2.69 (1.43-5.09)		
Log-aditivni						
-	-	-	1.76 (1.10-2.81)	0.019	285.7	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

*statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Za heterozigotni genotip GC varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* pokazana je asocijacija sa povećanim rizikom za progresiju KP po kodominantnom ($P=0.0067$; $OR_{GC}=2.22$, 95%CI 1.24-3.97), dominantnom ($P=0.032$; $OR=1.79$, 95%CI 1.04-3.06) i overdominantnom genetičkom modelu ($P=0.0033$; $OR=2.32$, 95%CI 1.30-4.13). S druge strane, za homozigotni genotip CC varijante rs895819 u genu za miR-27a pokazana je asocijacija sa smanjenim rizikom za progresiju KP ($P=0.04$; $OR=0.44$, 95%CI 0.20-0.97). U navedenom testu, rizik za progresiju bolesti određen je prema kriterijumima Medeiros-a i saradnika (tabela 4.14). U testovima koji su uključivali preostale genetičke varijante nisu dobijeni statistički značajni rezultati (prilog 6).

Tabela 4.14. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs2910164 i 895819 sa rizikom za progresiju KP.

Genetička varijanta	Genetički model	Rizik za progresiju KP (Medeiros et al.)				AIC
		Nizak (%)	Visok (%)	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	
rs2910164						
	Kodominantni					
	GG	75 (72.8)	96 (60)	1		
	GC	21 (20.4)	60 (37.5)	2.22 (1.24-3.97)	0.0067*	348.9
	CC	7 (6.8)	4 (2.5)	0.47 (0.13-1.68)		
	Dominantni					
	GG	75 (72.8)	96 (60)	1.00	0.032	352.4
	GC+CC	28 (27.2)	64 (40)	1.79 (1.04-3.06)		
	Recesivni					
	GG+GC	96 (93.2)	156 (97.5)	1.00	0.12	354.5
	CC	7 (6.8)	4 (2.5)	0.37 (0.11-1.32)		
	Overdominantni					
	GG + CC	82 (79.6)	100 (62.5)	1	0.0033	348.3
	GC	21 (20.4)	60 (37.5)	2.32 (1.30-4.13)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.32 (0.85-2.07)	0.22	355.4
rs895819						
	Kodominantni					
	TT	59 (42.1)	79 (42.7)	1.00		
	TC	64 (45.7)	95 (51.4)	1.09 (0.68-1.73)	0.11	445.3
	CC	17 (12.1)	11 (6)	0.46 (0.20-1.06)		
	Dominantni					
	TT	59 (42.1)	79 (42.7)	1.00	0.84	447.6
	TC+CC	81 (57.9)	106 (57.3)	0.96 (0.61-1.49)		
	Recesivni					
	TT+TC	123 (87.9)	174 (94)	1.00	0.04	443.5
	CC	17 (12.1)	11 (6)	0.44 (0.20-0.97)		
	Overdominantni					
	TT + CC	76 (54.3)	90 (48.6)	1.00	0.34	446.8
	TC	64 (45.7)	95 (51.4)	1.24 (0.80-1.93)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.82 (0.58-1.17)	0.28	446.5

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

* Statistički značajni rezultati su prikazani podebljano.

U testovima asocijacije genetičkih varijanti u genima za mikroRNK sa rizikom za progresiju KP određenim prema kriterijumima D'Amico-a i saradnika (prilog 7) statistička značajnost dobijena je u analizi koja je uključivala rs3746444 u genu *hsa-miR-499*. U poređenjima distribucije genotipova u grupama bolesnika sa KP sa srednjim i niskim, kao i sa visokim i niskim rizikom za progresiju bolesti, pokazana je asocijacija manje učestalog alela G sa smanjenim rizikom za progresiju KP (tabela 4.15). U navedenim poređenjima, za recesivni genetički model dobijen je najmanji AIC skor koji upućuje na to da ovaj model najbolje odgovara uočenim razlikama. Statistička značajnost dobijena je u navedenim poređenjima i za kodominantni genetički model ($P=0.01$ i $P=0.035$).

Tabela 4.15. Rezultati testova asocijacije genetičke varijante rs3746444 sa rizikom za progresiju KP.

Genetički model	Nizak (%)	Srednji (%)	Visok (%)	Srednji vs. nizak rizik			Visok vs. nizak rizik			Visok vs. srednji rizik		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
Kodominantni												
AA	13 (59.1)	62 (53.5)	108 (54.5)	1.00			1.00			1.00		
AG	5 (22.7)	51 (44)	81 (40.9)	2.14 (0.71-6.40)	0.013*	120.4	1.91 (0.65-5.60)	0.05 ^b	143.6	0.88 (0.55-1.42)	0.5	413.1
GG	4 (18.2)	3 (2.6)	9 (4.5)	0.16 (0.03-0.79)			0.28 (0.07-1.04)			1.89 (0.49-7.32)		
Dominantni												
AA	13 (59.1)	62 (53.5)	108 (54.5)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	9 (40.9)	54 (46.5)	90 (45.5)	1.26 (0.50-3.18)	0.62	126.8	1.19 (0.48-2.91)	0.71	147.5	0.94 (0.59-1.49)	0.79	412.4
Recesivni												
AA+AG	18 (81.8)	113 (97.4)	189 (95.5)	1.00			1.00			1.00		
GG	4 (18.2)	3 (2.6)	9 (4.5)	0.12 (0.02-0.58)	0.01	120.4	0.22 (0.06-0.80)	0.035	143.2	2.00 (0.53-7.60)	0.29	411.3
Overdominantni												
AA + GG	17 (77.3)	65 (56)	117 (59.1)	1.00			1.00			1.00		
AG	5 (22.7)	51 (44)	81 (40.9)	2.67 (0.92-7.72)	0.055 ^b	123.4	2.30 (0.81-6.51)	0.096 ^b	144.8	0.85 (0.53-1.36)	0.5	412
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.76 (0.36-1.61)	0.48	126.6	0.79 (0.39-1.58)	0.51	147.2	1.02 (0.68-1.53)	0.91	412.4

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

*statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

4.12. Rezultati analiza asocijacije genetičkih varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP

Za potencijalnu asocijaciju varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA statistička (prilog 8) značajnost je dobijena u analizi koja je uključivala varijantu rs784567 u genu *TARBP2*. Manje učestali alel A navedene genetičke varijante asociiran je sa smanjenim inicijalnim serumskim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP, prema rezultatima testova sprovedenim za log-aditivni genetički model, kao i za dominantni za koji je dobijena marginalna statistička značajnost (tabela 4.16).

Tabela 4.16. Rezultati testova asocijacije genetičke varijante rs784567 sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP.

Genetički model	n	Srednja vrednost (standardna greška)	Serumska vrednost PSA		
			Razlika (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
Kodominantni					
GG	100	186.01 (70.22)	0.00		
GA	168	95.29 (27.1)	-91.95 (-203.55 - 19.65)	0.12	5306.5
AA	84	57.3 (13.32)	-131.09 (-262.03 - -0.14)		
Dominantni					
GG	100	186.01 (70.22)	0.00		
GA+AA	252	82.63 (18.62)	-104.93 (-209.35 - -0.51)	0.05*	5304.9
Recesivni					
GG+GA	268	57.3 (13.32)	0.00		
AA	84	127.25 (38.85)	-73.26 (-184.06 - 37.54)	0.2	5307.1
Overdominantni					
GG+AA	184	127.25 (38.85)	0.00		
GA	168	95.29 (27.1)	-32.07 (-126.67 - 62.53)	0.51	5308.4
Log-aditivni					
-	-	-	-66.64 (-131.93 - -1.35)	0.046	5304.8

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

*statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Za genetičke varijante rs3742330 i rs4961280 pokazana je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova između grupa bolesnika sa različitim GS (tabela 4.17). Poređenjem učestalosti genotipova rs3742330 u grupama bolesnika sa KP kod kojih je utvrđen GS>7 i GS<7 dobijena je statistička značajnost za dominantni ($P=0.045$;

OR=0.39, 95%CI 0.14-1.06) i log-aditivni genetički model ($P=0.027$; OR=0.40, 95%CI 0.16-1.00). U slučaju rs4961280, statistička značajnost dobijena je kako proredjenjem distribucija genotipova između bolesnika sa GS=7 i GS<7 ($P=0.045$, za overdominantni model), tako i između bolesnika sa GS>7 i GS=7 ($P=0.033$, za log-aditivni model; $P=0.042$, za dominantni model).

Za obe navedene genetičke varijante ustanovljena je i statistički značajna asocijacija sa kliničkim stadijumom primarnog tumora (tabela 4.18). Za manje učestali alel A genetičke varijante rs4961280 pokazana je asocijacija sa nižim kliničkim stadijumom (T1) KP za više različitih genetičkih modela. Takođe, za genetičku varijantu rs7813 pokazana je statistički značajna razlika u distribuciji genotipova u grupama bolesnika sa kliničkim stadijumom primarnog tumora T1 i T2 ($P=0.035$, OR=0.46 95%CI 0.22-0.97, za dominantni model) (tabela 4.18).

Osim asocijacije sa GS i kliničkim stadijumom primarnog KP, za rs3742330 ustanovljena je statistički značajna asocijacija sa rizikom za progresiju bolesti prema kriterijumima Medeiros-a i saradnika (tabela 3.19). Za homozigot manje učestalog alela G pokazana je asocijacija sa smanjenim rizikom za progresiju KP u odnosu na genotipove AA i AG prema recesivnom genetičkom modelu ($P=0.036$, OR=0.14 95%CI 0.02-1.22).

Ni za jednu od ispitivanih genetičkih varijanti nije ustanovljena asocijacija sa razvojem udaljenih metastaza KP (prilog 11). Rezultati testova asocijacije varijanti u genima za mikroRNK sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara (prilozi 8-10) i rizikom za progresiju KP (prilozi 12 i 13) koji nisu pokazali statističku značajnost prikazani su u prilogu.

Tabela 4.17. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs3742330 i rs4961280 sa Glison skorom kod bolesnika sa KP.

Genetički model	GS<7 (%)	GS=7 (%)	GS>7 (%)	GS>7 vs. GS<7			GS>7 vs. GS=7			GS=7 vs. GS<7		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3742330												
Kodominantni												
AA	166 (79.8)	63 (78.8)	47 (90.4)	1.00			1.00			1.00		
AG	37 (17.8)	16 (20)	5 (9.6)	0.46 (0.17-1.26)	0.06 ^b	251.7	0.40 (0.13-1.18)	0.16	175.9	1.12 (0.58-2.17)	0.75	347.5
GG	5 (2.4)	1 (1.2)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)			0.00 (0.00-NA)			0.52 (0.06-4.51)		
Dominantni												
AA	166 (79.8)	63 (78.8)	47 (90.4)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	42 (20.2)	17 (21.2)	5 (9.6)	0.39 (0.14-1.06)	0.045*	251.2	0.38 (0.13-1.13)	0.066 ^b	174.3	1.05 (0.56-1.99)	0.88	346.1
Recesivni												
AA+AG	203 (97.6)	79 (98.8)	52 (100)	1.00			1.00			1.00		
GG	5 (2.4)	1 (1.2)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)	0.083 ^b	252.3	0.00 (0.00-NA)	0.42	177	0.50 (0.06-4.39)	0.5	345.7
Overdominantni												
AA+GG	171 (82.2)	64 (80)	47 (90.4)	1.00			1.00			1.00		
AG	37 (17.8)	16 (20)	5 (9.6)	0.48 (0.18-1.31)	0.13	252.9	0.40 (0.14-1.19)	0.084	174.7	1.14 (0.59-2.20)	0.69	345.9
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.40 (0.16-1.00)	0.027	250.4	0.38 (0.13-1.11)	0.059 ^b	174.1	0.98 (0.56-1.72)	0.95	346.1
rs4961280												
Kodominantni												
CC	140 (67.3)	44 (54.3)	37 (69.8)	1.00			1.00			1.00		
CA	63 (30.3)	33 (40.7)	12 (22.6)	0.72 (0.35-1.48)	0.29	258.2	0.45 (0.20-1.02)	0.13	178.5	1.66 (0.97-2.85)	0.1	346.1
AA	5 (2.4)	4 (4.9)	4 (7.5)	2.39 (0.57-10.07)			1.07 (0.24-4.78)			2.58 (0.66-10.05)		
Dominantni												
CC	140 (67.3)	44 (54.3)	37 (69.8)	1.00			1.00			1.00		
CA+AA	68 (32.7)	37 (45.7)	16 (30.2)	0.85 (0.44-1.67)	0.64	258.5	0.53 (0.25-1.11)	0.087 ^b	177.6	1.73 (1.02-2.92)	0.042	344.5
Recesivni												
CC+CA	203 (97.6)	77 (95.1)	49 (92.4)	1.00			1.00			1.00		
AA	5 (2.4)	4 (4.9)	4 (7.5)	2.62 (0.63-10.91)	0.2	257.1	1.38 (0.31-6.06)	0.67	180.3	2.14 (0.56-8.21)	0.28	347.5
Overdominantni												
CC + AA	145 (69.7)	48 (59.3)	41 (77.4)	1.00			1.00			1.00		
CA	63 (30.3)	33 (40.7)	12 (22.6)	0.68 (0.33-1.40)	0.28	257.6	0.45 (0.20-1.00)	0.045	176.5	1.58 (0.93-2.69)	0.096 ^b	345.9
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.02 (0.59-1.78)	0.94	258.7	0.69 (0.38-1.26)	0.23	179.1	1.64 (1.04-2.58)	0.033	344.1

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

*statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Tabela 4.18. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs3742330, rs4961280 i rs7813 sa kliničkim stadijumom primarnog KP.

Genetički model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 vs. T1			T3/T4 vs. T1			T3/T4 vs. T2		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3742330												
Kodominantni												
AA	37 (75.5)	136 (80.5)	77 (85.6)	1.00			1.00			1.00		
AG	12 (24.5)	27 (16)	13 (14.4)	0.62 (0.28-1.34)	0.091 ^b	232.9	1.42 (0.57-3.56)	0.67	185.7	0.85 (0.41-1.74)	0.067 ^b	337.2
GG	0 (0)	6 (3.5)	0 (0)	NA (0.00-NA)			1.79 (0.18-18.14)			0.00 (0.00-NA)		
Dominantni												
AA	37 (75.5)	136 (80.5)	77 (85.6)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	12 (24.5)	33 (19.5)	13 (14.4)	0.76 (0.36-1.63)	0.49	235.2	1.46 (0.61-3.50)	0.39	183.7	0.69 (0.34-1.40)	0.3	339.5
Recesivni												
AA+AG	49 (100)	163 (96.5)	90 (100)	1.00			1.00			1.00		
GG	0 (0)	6 (3.5)	0 (0)	NA (0.00-NA)	0.066 ^b	232.3	1.67 (0.17-16.88)	0.65	184.3	0.00 (0.00-NA)	0.022*	335.4
Overdominantni												
AA+GG	37 (75.5)	142 (84)	77 (85.6)	1.00			1.00			1.00		
AG	12 (24.5)	27 (16)	13 (14.4)	0.59 (0.27-1.28)	0.19	234	1.40 (0.56-3.48)	0.47	183.9	0.89 (0.43-1.82)	0.74	340.5
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.97 (0.50-1.86)	0.92	235.7	1.39 (0.66-2.94)	0.38	183.7	0.63 (0.34-1.18)	0.13	338.3
rs4961280												
Kodominantni												
CC	22 (44.9)	119 (70)	57 (63.3)	1.00			1.00			1.00		
CA	25 (51)	46 (27.1)	29 (32.2)	0.33 (0.17-0.65)	0.0053	227.7	0.44 (0.21-0.92)	0.086 ^b	181.5	1.32 (0.75-2.31)	0.52	342.1
AA	2 (4.1)	5 (2.9)	4 (4.4)	0.46 (0.08-2.57)			0.87 (0.15-5.16)			1.67 (0.43-6.46)		
Dominantni												
CC	22 (44.9)	119 (70)	57 (63.3)	1.00			1.00			1.00		
CA+AA	27 (55.1)	51 (30)	33 (36.7)	0.34 (0.18-0.66)	0.0013	225.8	0.47 (0.23-0.96)	0.037	180.1	1.35 (0.79-2.32)	0.28	340.2
Recesivni												
CC+CA	27 (95.9)	165 (97.1)	86 (95.5)	1.00			1.00			1.00		
AA	2 (4.1)	5 (2.9)	4 (4.4)	0.72 (0.13-3.87)	0.71	236	1.23 (0.21-7.07)	0.82	184.4	1.53 (0.40-5.86)	0.54	341
Overdominantni												
CC + AA	24 (49)	124 (72.9)	61 (67.8)	1.00			1.00			1.00		
CA	25 (51)	46 (27.1)	29 (32.2)	0.35 (0.18-0.67)	0.0018	226.4	0.45 (0.22-0.92)	0.027	179.6	1.28 (0.73-2.24)	0.38	340.7
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.44 (0.25-0.77)	0.0039	227.8	0.60 (0.33-1.09)	0.092 ^b	181.6	1.31 (0.83-2.07)	0.26	340.1

rs7813

Kodominantni												
AA	11 (22.4)	64 (37.6)	27 (30)	1.00			1.00			1.00		
AG	31 (63.3)	81 (47.6)	43 (47.8)	0.44 (0.20-0.94)	0.09 ^b	233.3	0.57 (0.25-1.34)	0.22	183.5	1.26 (0.70-2.26)	0.24	340.5
GG	7 (14.3)	25 (14.7)	20 (22.2)	0.58 (0.20-1.67)			1.17 (0.38-3.58)			1.90 (0.91-4.00)		
Dominantni												
AA	11 (22.4)	64 (37.6)	27 (30)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	38 (77.5)	106 (62.4)	63 (70)	0.46 (0.22-0.97)	0.035	231.7	0.69 (0.30-1.55)	0.36	183.6	1.41 (0.82-2.45)	0.21	339.9
Recesivni												
AA+AG	42 (85.7)	145 (85.2)	70 (7.8)	1.00	0.99	236.2	1.00	0.26	183.2	1.00	0.13	339.2
GG	7 (14.3)	25 (14.7)	20 (22.2)	0.99 (0.40-2.47)			1.71 (0.66-4.40)			1.66 (0.86-3.19)		
Overdominantni												
AA + GG	18 (36.7)	89 (52.4)	47 (52.2)	1.00			1.00			1.00		
AG	31 (63.3)	81 (47.6)	43 (47.8)	0.52 (0.27-1.01)	0.051 ^b	232.3	0.54 (0.26-1.10)	0.088 ^b	181.5	1.01 (0.60-1.68)	0.98	341.4
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.70 (0.43-1.13)	0.14	234	1.01 (0.60-1.70)	0.96	184.4	1.36 (0.95-1.97)	0.096 ^b	338.6

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

*statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

Tabela 4.19. Rezultati testova asocijacije genetičke varijante rs3742330 sa rizikom za progresiju KP.

Genetički model	Nizak rizik	Visok rizik	Rizik za progresiju KP		
			OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3742330					
Kodominantni					
AA	111 (78.2)	155 (83.8)	1.00		
AG	26 (18.3)	29 (15.7)	0.78 (0.43-1.39)	0.077 ^b	447.6
GG	5 (3.5)	1 (0.5)	0.13 (0.02-1.17)		
Dominantni					
AA	111 (78.2)	155 (83.8)	1.00		
AG+GG	31 (21.8)	30 (16.2)	0.67 (0.38-1.18)	0.16	448.8
Recesivni					
AA+AG	137 (96.5)	184 (99.5)	1.00		
GG	5 (3.5)	1 (0.5)	0.14 (0.02-1.22)	0.036*	446.3
Overdominantni					
AA+GG	116 (81.7)	156 (84.3)	1.00		
AG	26 (18.3)	29 (15.7)	0.81 (0.45-1.45)	0.48	450.2
Log-aditivni					
-	-	-	0.63 (0.39-1.04)	0.068 ^b	447.3

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

*Statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

4.13. Rezultati analize potencijalne asocijacije epistatičkih interakcija između ispitivanih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i progresiju KP

Rezultati genotipizacije za 344 bolesnika sa KP i 293 muškaraca bez znakova bolesti prostate bilo je uključeno u analizu efekta epistatičkih interakcija genetičkih varijanti na rizik za razvoj KP. Za sve navedene genetičke varijante ponovno testiranje pokazalo je odsustvo odstupanja od HWE u kontrolnoj grupi (prilog 14). Klasifikacija bolesnika sa KP na osnovu rizika za progresiju bolesti prema kriterijumima *Medeioros-* a i saradnika, pokazala je da 139 bolesnika pripada grupi sa niskim a 178 grupi sa visokim rizikom.

Rezultati MDR analize kojom su testirane kombinacije genetičkih varijanti u četiri gena za mikroRNK (za miR-146a, miR-499, miR-196a2 i miR-27a) sa varijantama u genima za proteine RISC prikazani su u tabelama 3.20 i 3.21. MDR testovi koji su se odnosili na rizik za razvoj KP nisu dali P vrednosti iz permutacionog testa koje ukazuju na statističku značajnost asocijacije epistatičkih interakcija između ispitivanih varijanti sa navedenim rizikom (tabela 4.20).

U MDR analizi koja je uključivala varijante u genima za proteine RISC kompleksa i rs2910164 u genu za miR-146a najbolji model je bio model epistatičkih interakcija između 4 lokusa (rs2910164, rs7813, rs4961280 i rs784567) sa TBA od 0.5419 i CVC od 10/10, ali uz odsustvo statističke značajnosti ($P=0.238$). Ista vrednost CVC dobijena je za model jednog lokusa (rs784567) i za model od 5 lokusa koji je predstavljao potencijalnu epistatičku interakciju svih genetičkih varijanti uključenih u test (tabela 4.20).

Kada je u analizu uključena genetička varijanta rs3746444 u genu za miR-499 umesto rs2910164, najbolji model bio je model koji je uključivao pet lokusa u interakciji sa TBA od 0.5222 i P vrednošću iz permutacionog testa od 0.852. CVC koja je dobijena sa ovaj model bila je 10/10. Analiza interakcije rs11614913 sa varijantama u genima za proteine RISC kao najbolji model identifikovala je onaj koji je uključivao samo rs784567, odnosno ukazivala je na nezavisan efekat ove genetičke varijante. TBA koja je dobijena za ovaj model bila je 0.5396, sa P vrednošću iz permutacionog testa od 0.928 i CVC od 10/10. Rezultati dobijeni u analizi koje je uključivala rs895819 pokazali su da je najbolji model interakcije između rs895819, rs4961280 i rs784567, sa $P = 0.383$, TBA= 0.5413 CVC od 10/10 (tabela 4.20).

Rezultati MDR testova kojima je analiziran potencijalni efekat epistatičkih interakcija između genetičkih varijanti u genima za mikroRNK i u genima za proteine RISC na rizik za progresiju KP bili su statistički značajni samo za analizu koja je uključivala rs11614913 u genu za miR-196a2 (tabela 4.21). Grafički prikaz ovog modela predstavljen je na slici 4.15. Fruchterman-Rheingold dijagram baziran na entropiji prikazan je na slici 4.16. Ovi rezultati ukazuju na to da je najbolji model bio

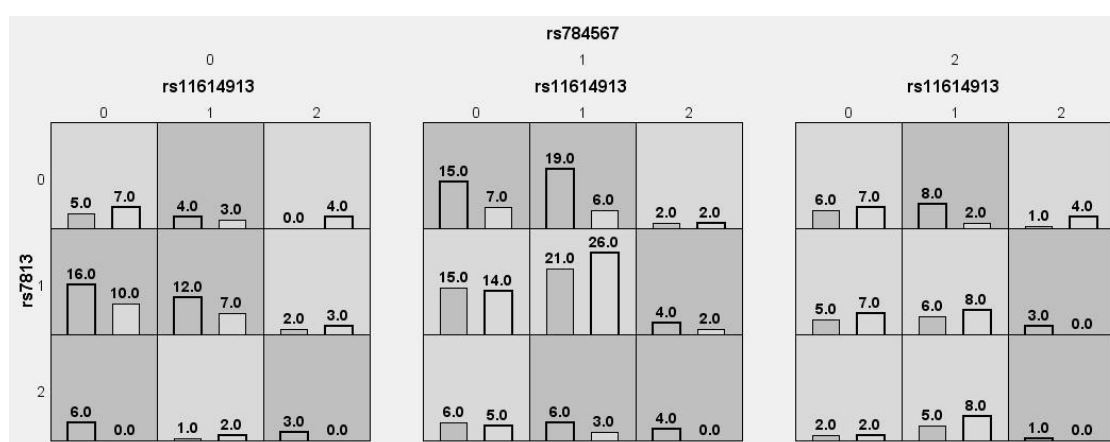
onaj koji opisuje interakciju tri genetičke varijante: rs11614913, rs7813 i rs784567. Dobijena je TBA od 0.6054 sa $P=0.026-0.027$ iz permutacionog testa i CVC od 10/10. Drugi model sa istom CVC i nižom TBA (0.5387) bio je model koji je uključivao svih pet analiziranih varijanti. Ovi rezultati dodatno su potvrđeni MDR analizama koje su uključivale samo varijante u genima za proteine RISC, a koje su pokazale marginalnu statističku značajnost za model koji je uključivao rs7813 i rs784567. TBA za ovaj model bila je 0.5914, sa P vrednošću od 0.046 i CVC 10/10.

Tabela 4.20. Rezultati MDR analize asocijacije potencijalnih epistatičkih interakcija između varijanti u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj KP.

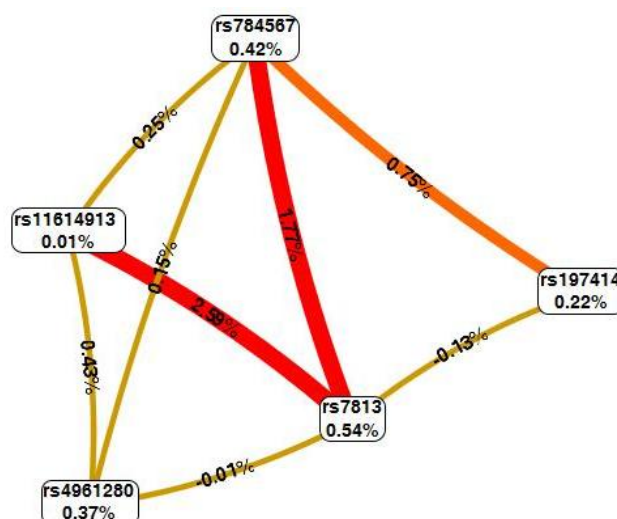
Varijante u genima za MikroRNK	Model	Uravnotežena tačnost treninga	Uravnotežena tačnost testiranja	CVC	P vrednost
rs2910164	rs784567	0.5396	0.5396	10/10	0.97
	rs4961280, rs784567	0.5647	0.4864	6/10	0.99-1.00
	rs2910164, rs4961280, rs784567	0.5962	0.5248	9/10	0.977-0.978
	rs2910164, rs7813, rs4961280, rs784567	0.6331	0.5419	10/10	0.238
	rs2910164, rs7813, rs197414, rs4961280, rs784567	0.6761	0.5368	10/10	0.972-0.973
rs3746444	rs784567	0.5403	0.5205	9/10	0.880-0.881
	rs4961280, rs784567	0.5625	0.5097	7/10	0.969
	rs7813, rs3746444, rs784567	0.5839	0.4841	6/10	0.99-1.00
	rs7813, rs197414, rs4961280, rs784567	0.6191	0.4864	5/10	0.99-1.00
	rs7813, rs3746444, rs197414, rs4961280, rs784567	0.6656	0.5222	10/10	0.852
rs11614913	rs784567	0.5396	0.5396	10/10	0.928
	rs4961280, rs784567	0.5613	0.5364	10/10	0.928-0.929
	rs11614913, rs4961280, rs784567	0.5859	0.5298	10/10	0.94
	rs7813, rs197414, rs4961280, rs784567	0.6156	0.4814	6/10	0.99-1.00
	rs7813, rs11614913, rs197414, rs4961280, rs784567	0.663	0.4811	10/10	0.99-1.00
rs895819	rs895819	0.546	0.5108	7/10	0.919
	rs895819, rs784567	0.5639	0.5284	5/10	0.625-0.626
	rs895819, rs4961280, rs784567	0.5936	0.5413	10/10	0.383
	rs7813, rs895819, rs4961280, rs784567	0.6233	0.4673	5/10	0.99-1.00
	rs7813, rs895819, rs197414, rs4961280, rs784567	0.664	0.4621	9/10	0.99-1.00

Tabela 4.21. Rezultati MDR analize asocijacije potencijalnih epistatičkih interakcija između rs11614913 i varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za progresiju KP.

Model	Uravnotežena tačnost treninga	Uravnotežena tačnost testiranja	CVC	P vrednost
rs7813	0.5445	0.4737	7/10	0.953-0.954
rs7813, rs784567	0.5986	0.54	6/10	0.362
rs11614913, rs7813, rs784567	0.6419	0.6054	10/10	0.026-0.027
rs11614913, rs7813, rs197414, rs784567	0.6808	0.5417	9/10	0.376-0.377
rs11614913, rs7813, rs197414, rs4961280, rs784567	0.7206	0.5387	10/10	0.413



Slika 4.15. Grafički prikaz interakcije između genetičkih varijanti rs11614913, rs7813 i rs784567 na osnovu kombinacija genotipova iz poredenja bolesnika sa KP sa različitim rizikom za progresiju bolesti.



Slika 4.16. Fruchterman-Rheingold dijagram interakcije između rs11614913, rs7813 i rs784567 dobijene u poredenju kombinacija genotipova između bolesnika sa KP sa različitim rizikom za progresiju bolesti. Vrednosti u čvorištima (sa nazivima genetičkih varijanti) predstavljaju glavne nezavisne efekte genetičkih varijanti (eng. *main effects*), dok vrednosti na granama između čvorišta označavaju efekte interakcija (pozitivne sinergizam, a negativne redundantnost). Sinergističke interakcije naznačene su crvenom odnosno narandžastom bojom, a redundantnost maslinastom bojom.

4.14. Rezultati meta-analize utvrđenih asocijacija analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj karcinoma prostate i rezultata prethodnih studija

4.14.1. Rezultati pretraživanja baze naučnih publikacija *PubMed*

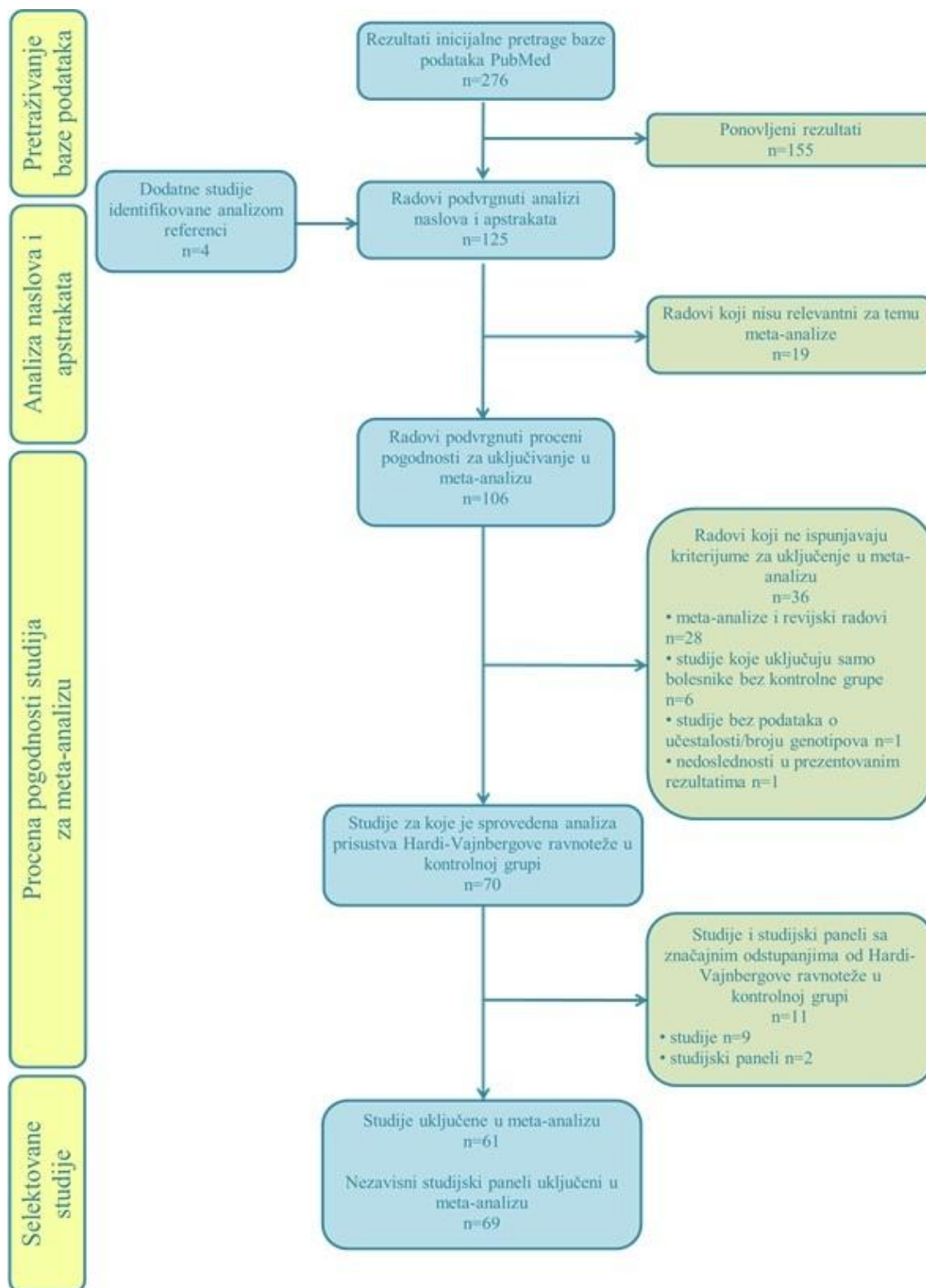
Prilikom procesa pretrage baze naučnih publikacija vezanih za ispitivane genetičke varijante i KP, samo za genetičku varijantu rs2910164 u genu za miR-146a pronađen je dovoljan broj studija za sprovođenje meta-analize prema prethodno zadatom kriterijumu od najmanje 3 studije (uključujući i rezultate ove studije). Proces dalje selekcije radova je stoga uključivao samo navedenu genetičku varijantu.

Dijagram procesa selekcije studija za meta-analizu prikazan je na slici 4.17. Pretraživanjem baze naučnih publikacija *PubMed* različitim kombinacijama ključnih reči dobijeno je ukupno 276 rezultata, od kojih je 155 isključeno iz daljeg razmatranja, jer su predstavljali ponovljene rezultate prethodnih pretraga. Dodatne četiri studije izabrane su kao potencijalno pogodne za meta-analizu proverom referenci publikacija koje su predstavljale rezultate pretrage baze *PubMed*. Ukupan broj radova koji su podvrgnuti analizi naslova i apstrakata u cilju procene relevantnosti za temu meta-analize iznosio je 125. Od navedenih radova, 19 je isključeno iz dalje procedure jer nisu bili relevantni za temu meta-analize.

4.14.2. Rezultati procene pogodnosti studija za meta-analizu

Ukupno 106 studija koje su procenjene kao relevantne za meta-analizu nakon iščitavanja naslova i apstrakata detaljno je analizirano u cilju procene pogodnosti za uključanje u analizu. Među ovim studijama, 28 je predstavljalo meta-analize i revijske radove, zbog čega su isključene iz dalje analize. Takođe, šest studija koje su uključivale samo grupe bolesnika bez kontrolne grupe muškaraca bez malignih tumora nisu ispunjavale kriterijume za uključivanje u meta-analizu. Dodatne dve studije, kao i jedan studijski panel, isključeni su zbog nedostatka podataka o rezultatima genotipizacije, odnosno zbog očiglednih grešaka u predstavljenim rezultatima usled nepoklapanja

podataka u tabelama i tekstu (129-131). Od preostalih 70 studija podvrgnutih analizi prisustva HWE u kontrolnoj grupi 9 je isključeno na osnovu ovog kriterijuma, kao i dva studijska panela (101, 120, 132-149, 141). Karakteristike navedenih isključenih studija prikazane su u prilogu 15. Ukupno 61 rad, odnosno 69 nezavisnih studijskih panela, predstavlja finalni rezultat procesa selekcije studija za meta-analizu (slika 4.17 i tabela 4.22). Ove studije uključivale su ukupno 28359 bolesnika sa KP i 41678 kontrola.



Slika 4.17. Dijagram procesa selekcije studija za meta-analizu.

4.14.3. Rezultati ekstrakcije podataka iz selektovanih studija

Relevantni podaci ekstrahovani iz selektovanih studija predstavljeni su u tabeli 4.22. Za tri studije formirani su studijski paneli na osnovu dostupnih podataka o rezultatima genotipizacije za dve ili više grupa bolesnika/kontrola iz različitih država ili različitih regiona iste države (132, 139, 142). Takođe, dve studije su analizirale potencijalnu asocijaciju rs2910164 sa različitim tipovima ili podtipovima malignih bolesti (131, 135), dok su druge dve studije uključivale veći broj kontrolnih grupa (143, 144).

Nakon klasifikacije studija i studijskih panela na osnovu tipa malignog tumora koji izučavaju, podgrupne meta-analize bilo je moguće sprovesti za karcinome bubrega, štitne žlezde, jetre, bešike, dojke, pluća, jednjaka, glave i vrata, želuca, prostate, grlića materice i debelog creva. Među selektovanim studijama nije bilo onih koje su uključivale grupe bolesnika i kontrola afričkog porekla, dok je za dve studije poreklo ispitanika nije bilo definisano, ili je označeno kao iz više različitih etničkih grupa. Stoga, podgrupna analiza bazirana na ovom kriterijumu urađena je za rezultate studija sprovedenih u populacijama evropskog i azijskog porekla.

U prilogu 16 predstavljen je rezultat procene metodološkog kvaliteta studija uključenih u meta-analizu pomoću Njukasl-Otava skale. Prema navedenim rezultatima, najveći broj uključenih studija imao je ukupan skor od 8, koji upućuje na dovoljno visok metodološki kvalitet i mali rizik za dobijanje rezultata koji su posledica manjkavosti u dizajnu studije.

Table 4.22. Karakteristike studija uključenih u meta-analizu.

Autori [ref]	Godina	Država	Etničko poreklo	Tip karcinoma	Tip kontrolne grupe	Metod genotipizacije	Broj bolesnika/ broj kontrola	Distribucija genotipova rs2910164 kod bolesnika			Distribucija genotipova rs2910164 kod kontrola			Učestalost alela C u kontrolnoj grupi	P_{HWE} u kontrolnoj grupi
								GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Horikawa et al. [145]	2008	SAD	Evropsko	bubrega	zdravi	SNPlex esej	261/235	144	103	14	126	94	15	0.264	0.648
Jazdzewski et al. (Finska) [142]	2008	Finska	Evropsko	štitne žlezde	zdravi	sekvenciranje, SNUPE esej	206/274	99	104	3	150	105	19	0.261	0.915
Jazdzewski et al. (Poljska) [142]	2008	Poljska	Evropsko	štitne žlezde	zdravi	sekvenciranje, SNUPE esej	201/475	115	82	4	286	163	26	0.226	0.661
Jazdzewski et al. (SAD) [142]	2008	SAD (Ohajo)	Evropsko	štitne žlezde	zdravi	sekvenciranje, SNUPE esej	201/152	91	101	9	90	52	10	0.237	0.508
Xu et al. [146]	2008	Kina	Azijsko	jetre	zdravi	PCR-RFLP	479/504	80	241	158	58	249	197	0.638	0.119
Yang et al. [147]	2008	SAD	Evropsko	bešike	zdravi	SNPlex esej	691/674	414	242	35	385	258	31	0.237	0.137
Hoffman et al. [148]	2009	SAD	iz više etničkih grupa	dojke	zdravi	MassARRAY	439/478	234	176	29	273	178	27	0.243	0.775
Hu et al. [149]	2009	Kina	Azijsko	dojke	zdravi	PCR-RFLP	1009/1093	165	515	329	180	551	362	0.583	0.221
Tian et al. [150]	2009	Kina	Azijsko	pluća	zdravi	PCR-RFLP	1058/1035	360	510	188	364	502	169	0.406	0.853
Catucci et al. (Nemačka) [132]	2010	Nemačka	Evropsko	dojke, familijarni	zdravi	sekvenciranje	805/904	451	304	50	536	318	50	0.231	0.753
Guo et al. [151]	2010	Kina	Azijsko	jednjaka, skvamoznih ćelija	zdravi	SNaPshot esej	444/468	234	190	20	206	220	42	0.325	0.120
Liu et al. [152]	2010	SAD	Evropsko	glave i vrata, skvamoznih ćelija	zdravi	PCR-RFLP	1109/1130	630	411	68	655	405	70	0.241	0.486
Okubo et al. [143] (kontrola sa čišćenjem želuca)	2010	Japan	Azijsko	želuca	sa čišćenjem želuca	PCR-RFLP	552/214	73	243	236	32	109	73	0.596	0.400
Okubo et al. [143] (zdrave kontrole)	2010	Japan	Azijsko	želuca	zdravi	PCR-RFLP	552/483	73	243	236	89	213	181	0.595	0.062
Pastrello et al. [153]	2010	Italija	Evropsko	dojke i jajnika, familijarni	zdravi	sekvenciranje	101/155	60	36	5	90	59	6	0.229	0.332
Srivastava et al. [154]	2010	Indija	Azijsko	žučne kese	zdravi	PCR-RFLP	230/224	129	90	11	138	81	5	0.203	0.080
Xu et al. [100]	2010	Kina	Azijsko	prostate	zdravi	PCR-RFLP	251/280	68	135	48	54	150	76	0.539	0.191
Zeng et al. [155]	2010	Kina	Azijsko	želuca	zdravi	PCR-RFLP	304/304	62	153	89	53	132	119	0.609	0.122
Akkiz et al. [156]	2011	Turska	Evropsko	hepatocelularni	zdravi	PCR-RFLP	222/222	137	75	10	144	67	11	0.200	0.384
Garcia et al. [157]	2011	Francuska i SAD	nije definisano	dojke (sa BRCA1 i BRCA2 mutacijama)	sa BRCA1 i BRCA2 mutacijama, bez znakova maligne bolesti	TaqMan esej	1130/596	676	388	66	352	220	24	0.225	0.150

Hishida et al. [158]	2011	Japan	Azijsko	želuca	zdravi	PCR-CTPP	583/1637	82	271	230	229	775	633	0.623	0.738
Permeth-Wey et al. [159]	2011	SAD	Evropsko	gliom kod odraslih	zdravi	Illumina's GoldenGate esej	593/614	345	198	50	375	214	25	0.215	0.419
Vinci et al. [160]	2011	Italija	Evropsko	pluća, nesitnoćelijski	zdravi	HRMA	101/129	44	48	9	73	45	11	0.260	0.292
Yue et al. [161]	2011	Kina	Azijsko	grliča materice	zdravi	PCR-RFLP	447/443	118	224	105	87	206	150	0.571	0.285
Zhou et al. [162]	2011	Kina	Azijsko	grliča materice, skvamoznih ćelija	zdravi	PCR-RFLP	226/309	43	113	70	34	159	116	0.633	0.060
Chu et al. [163]	2012	Tajvan	Azijsko	grla	zdravi	PCR-RFLP	470/425	54	242	174	54	196	175	0.642	0.939
Hezova et al. [164]	2012	Češka	Evropsko	kolorektalni	zdravi	TaqMan esej	197/212	115	70	12	124	79	9	0.229	0.415
Jones et al. [165]	2012	Velika Britanija	Evropsko	štitne žlezde	zdravi	KASPar esej, Illumina's Hap1.2M and Hap550 arrays	748/6058	436	271	41	3540	2179	339	0.236	0.878
Kim et al. [166]	2012	Južna Koreja	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	PCR-RFLP	159/201	14	88	57	24	103	74	0.624	0.190
Mihalache et al. [167]	2012	Nemačka i Rumunija	Evropsko	holangiokarcinom	zdravi	TaqMan esej	182/350	118	53	11	211	122	17	0.223	0.906
Min et al. [168]	2012	Južna Koreja	Azijsko	kolorektalni	zdravi	PCR-RFLP	446/502	62	233	151	69	245	188	0.619	0.443
Wang et al. [169]	2012	Kina	Azijsko	bešike	zdravi	TaqMan esej	1017/1179	369	456	192	340	571	268	0.469	0.341
Xiang et al. [170]	2012	Kina	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	PCR-RFLP	100/100	27	45	28	21	46	33	0.560	0.506
Zhou et al. [171]	2012	Kina	Azijsko	jetre	zdravi	PCR-RFLP	186/483	33	86	67	71	254	158	0.590	0.056
Zhou et al. [172]	2012	Kina	Azijsko	želuca	zdravi	TaqMan esej	1686/1895	578	822	286	551	951	393	0.458	0.641
Ahn et al. [173]	2013	Južna Koreja	Azijsko	želuca	zdravi	PCR-RFLP	461/447	71	231	159	62	221	164	0.614	0.362
Chae et al. [174]	2013	Južna Koreja	Azijsko	kolorektalni	zdravi	PCR-RFLP	399/568	61	182	156	121	282	165	0.539	0.980
Lung et al. [144]	2013	Kina	Azijsko	nazofaringealni	zdravi	esej promene u temperature topljenja	229/163	24	88	117	18	86	59	0.626	0.106
Lung et al. [144] (starije kontrole)	2013	Kina	Azijsko	nazofaringealni	zdravi, stariji	esej promene u temperature topljenja	229/3613	24	88	117	479	1721	1413	0.629	0.209
Lv et al. [175]	2013	Kina	Azijsko	kolorektalni	zdravi	PCR-RFLP	331/513	54	230	47	96	274	143	0.546	0.080
Ma et al. [176]	2013	Kina	Azijsko	kolorektalni	zdravi	TaqMan esej	1147/1203	444	534	169	397	614	192	0.415	0.075
Marino et al. [177]	2013	Italija	Evropsko	štitne žlezde, papilarni	zdravi	sekvenciranje	307/206	180	105	22	105	84	17	0.286	0.972
Orsos et al. [178]	2013	Mađarska	Evropsko	glave i vrata, skvamoznih ćelija	zdravi	PCR-CTPP	468/468	284	168	16	323	136	9	0.165	0.217
Pavlakis et al. [179]	2013	Grčka	Evropsko	pankreas	zdravi	PCR-RFLP	93/122	4	38	51	4	39	79	0.807	0.759
Song et al. [180] ^a	2013	SAD	Evropsko	grla, skvamoznih ćelija	zdravi	PCR-RFLP	325/335	184	?	?	203	?	?	?	0.535

Vinci et al. [181]	2013	Italija	Evropsko	kolorektalni	zdravi	HRMA	160/178	86	57	17	100	65	13	0.256	0.590
Wei et al. [182]	2013	Kina	Azijsko	štitne žlezde, papilarni	zdravi	MassARRAY	753/760	136	323	294	138	345	277	0.591	0.094
Wei et al. [183]	2013	Kina	Azijsko	jednjaka	zdravi	SNPscan sistem	368/370	67	184	117	67	181	122	0.574	0.993
Zhang et al. [184]	2013	Kina	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	MassARRAY	997/998	163	503	331	156	475	367	0.606	0.911
Chu et al. [185]	2014	Tajvan	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	PCR-RFLP	188/337	22	82	84	50	146	141	0.635	0.230
Cong et al. [186]	2014	Kina	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	PCR-RFLP	206/218	27	85	94	17	84	117	0.729	0.723
Dikeakos et al. [187]	2014	Grčka	Evropsko	želuca	zdravi	PCR-RFLP	163/480	13	45	105	24	149	307	0.795	0.289
Du et al. [188]	2014	Kina	Azijsko	bubrega	zdravi	TaqMan esej	353/362	68	167	118	57	190	115	0.580	0.141
Hu et al. [189]	2014	Kina	Azijsko	kolorektalni	zdravi	PCR-RFLP	200/373	34	82	84	44	187	142	0.631	0.137
Huang et al. [190]	2014	Kina	Azijsko	nazofaringealni	zdravi	PCR-RFLP	160/200	23	73	64	36	110	54	0.545	0.123
Jeon et al. [191]	2014	Južna Koreja	Azijsko	pluća	zdravi	PCR-RFLP	1091/1096	223	500	368	244	540	312	0.531	0.721
Jia et al. [192]	2014	Kina	Azijsko	pluća, nesitnoćelijski	zdravi	PCR-RFLP	400/400	64	182	154	76	200	124	0.560	0.770
Kupcinskas et al. [193]	2014	Nemačka, Litvanija, Letonija	Evropsko	želuca	zdravi	TaqMan esej	362/347	252	94	16	223	108	16	0.202	0.531
Kupcinskas et al. [194]	2014	Litvanija, Letonija	Evropsko	kolorektalni	zdravi	TaqMan esej	192/424	140	50	2	275	134	15	0.193	0.789
Mao et al. [195]	2014	Kina	Azijsko	kolorektalni	zdravi	SNPscan sistem	547/561	70	291	186	85	271	205	0.607	0.768
Nikolic et al. [196]	2014	Srbija	Evropsko	prostate	zdravi	TaqMan esej	286/199	184	90	12	129	63	7	0.193	0.839
Palmieri et al. [139] (kontrola iz Toskane, HapMap)	2014	Italija (Toskana, HapMap)	Evropsko	grla, skvamoznih čelija	zdravi	TaqMan esej	337/88	197	121	19	50	31	7	0.256	0.485
Palmieri et al. [139] (kontrola iz Marino et al. [177])	2014	Italija (Marino et al.)	Evropsko	grla, skvamoznih čelija	zdravi	TaqMan esej	337/206	197	121	19	105	84	17	0.286	0.972
Palmieri et al. [139] (kontrola iz Manna et al. [197])	2014	Italija (Manna et al.)	Evropsko	grla, skvamoznih čelija	zdravi	TaqMan esej	337/543	197	121	19	297	206	40	0.263	0.605
Parlayan et al. [131] (karcinom želuca)	2014	Japan	Azijsko	želuca	zdravi	TaqMan esej	160/524	20	79	61	71	237	216	0.638	0.640
Parlayan et al. [131] (karcinom pluća)	2014	Japan	Azijsko	pluća	zdravi	TaqMan esej	148/524	25	67	56	71	237	216	0.638	0.640
Parlayan et al. [131] (karcinom prostate)	2014	Japan	Azijsko	prostate	zdravi	TaqMan esej	89/524	11	41	37	71	237	216	0.638	0.640
Pu et al. [198]	2014	Kina	Azijsko	želuca	zdravi	PCR-RFLP	197/513	36	96	65	96	274	143	0.546	0.080
Qu et al. [199]	2014	Kina	Azijsko	jednjaka, skvamoznih čelija	zdravi	alel-specifični PCR	381/426	62	203	116	75	228	123	0.556	0.082

^a Studija uključena u meta-analizu za dominantni genetički model asocijacije.

4.14.4. Rezultati kvantitativne sinteze podataka

Rezultati meta-analize potencijalne asocijacije rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora prikazani su u tabeli 4.23. Takođe, Forest dijagram navedene asocijacije prikazan je na slici 4.18. Ni za jedan testirani genetički model nije pokazana statistička značajnost za asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora ($P_{\text{alelski}} = 0.499$, $OR_{\text{alelski}} = 0.985$, 95% CI 0.944-1.029; $P_{\text{dom}} = 0.411$, $OR_{\text{dom}} = 0.944$, 95% CI 0.823-1.083; $P_{\text{rec}} = 0.607$, $OR_{\text{rec}} = 0.982$, 95% CI 0.915-1.054; $P_{\text{overdom}} = 0.597$, $OR_{\text{overdom}} = 0.987$, 95% CI 0.942-1.035). Ni za poređenja heterozigota i homozigota alela C sa GG genotipom nisu dobijeni statistički značajni rezultati ($P_{\text{GC}} = 0.293$, $OR_{\text{GC}} = 0.972$, 95% CI 0.921-1.025; $P_{\text{CC}} = 0.315$, $OR_{\text{CC}} = 0.954$, 95% CI 0.870-1.046). Za navedene meta-analize korišćen je model neuređenih efekata usled značajne heterogenosti između rezultata uključenih studija i panela ($P_{\text{heterogenost}} < 0.001$).

U podgrupnoj analizi baziranoj na tipu malignog tumora pokazana je asocijacija alela C sa smanjenim rizikom za razvoj karcinoma bešike (tabela 4.23 i slika 4.18). Statistička značajnost dobijena je za alelski, dominantni i overdominantni genetički model asocijacije ($P_{\text{alelski}} = 0.046$, $OR_{\text{alelski}} = 0.851$, 95% CI 0.726-0.997; $P_{\text{dom}} = 0.036$, $OR_{\text{dom}} = 0.790$, 95% CI 0.634-0.984; $P_{\text{overdom}} = 0.036$, $OR_{\text{overdom}} = 0.867$, 95% CI 0.758-0.991). Takođe, za genotip GC ustanovljena je asocijacija sa smanjenim rizikom za razvoj karcinoma bešike, u poređenju sa homozigotnim genotipom GG ($P_{\text{GC}} = 0.002$, $OR_{\text{GC}} = 0.791$, 95% CI 0.684-0.915).

Slični rezultati dobijeni su u podgrupnoj meta-analizi kojom je testirana asocijacija rs2910164 sa rizikom za razvoj karcinoma grlića materice (tabela 4.23). Za manje učestali alel C ustanovljena je asocijacija sa smanjenim rizikom za razvoj ovog tipa malignog tumora za više različitih genetičkih modela ($P_{\text{alelski}} < 0.001$, $OR_{\text{alelski}} = 0.719$, 95% CI 0.620-0.835; $P_{\text{GC}} = 0.022$, $OR_{\text{GC}} = 0.721$, 95% CI 0.545-0.953; $P_{\text{CC}} < 0.001$, $OR_{\text{CC}} = 0.503$, 95% CI 0.370-0.684; $P_{\text{dom}} < 0.001$, $OR_{\text{dom}} = 0.632$, 95% CI 0.485-0.823; $P_{\text{rec}} < 0.001$, $OR_{\text{rec}} = 0.654$, 95% CI 0.520-0.822). Jedini test u kojem nije dostignuta statistička značajnost je poređenje u kojem je analizirana potencijalna asocijacija po overdominantnom genetičkom modelu ($P_{\text{overdom}} = 0.514$, $OR_{\text{overdom}} =$

1.072, 95% CI 0.870-1.321). S obzirom na to da nije ustanovljena statistički značajna heterogenost rezultata studija, u navedenim testovima korišćen je model fiksiranog efekta.

Koristeći model fiksiranog efekta za meta-analizu pokazana je asocijacija rs2910164 sa rizikom za razvoj karcinoma jetre ($P_{\text{alelski}} = 0.024$) (tabela 4.23). Međutim, smanjenje rizika za razvoj ovog tipa karcinoma koje je asociirano sa alelom C navedene genetičke varijante pokazalo se kao neznatno ($OR_{\text{alelski}} = 0.914$, 95% CI 0.845-0.988). Takođe, za genotip CC pokazan je protektivni efekat u poređenju sa homozigotom GG ($P_{\text{CC}} = 0.024$, $OR_{\text{CC}} = 0.823$, 95% CI 0.696-0.974).

S druge strane, za alel C rs2910164 pokazana je asocijacija sa smanjenim rizikom za razvoj karcinoma pluća ($P_{\text{alelski}} = 0.006$, $OR_{\text{alelski}} = 1.110$, 95% CI 1.031-1.196) (tabela 4.23). Statistička značajnost pokazana je i za asocijaciju genotipa CC sa rizikom za razvoj navedenog karcinoma, u poređenju sa genotipom GG, kao i za recesivni genetički model ($P_{\text{CC}} = 0.017$, $OR_{\text{CC}} = 1.201$, 95% CI 1.033-1.397; $P_{\text{rec}} = 0.004$, $OR_{\text{rec}} = 1.194$, 95% CI 1.059-1.346).

Kada je u pitanju karcinom želuca, za genotip GC pokazana je asocijacija sa neznatno smanjenim rizikom za njegov razvoj u poređenju sa genotipom GG ($P_{\text{GC}} = 0.043$, $OR_{\text{GC}} = 0.902$, 95% CI 0.817-0.997) (tabela 4.23). Statistička značajnost nije dobijena ni za jedan drugi genetički model u testovima koji su se odnosili na karcinom želuca.

Iako za rs2910164 nije ustanovljena asocijacija sa rizikom za razvoj karcinoma glave i vrata, kada je izvršena podela na tip i mesto nastanka tumora, za alel C je pokazana asocijacija sa smanjenjem rizika za razvoj karcinoma skvamoznih ćelija grla ($P_{\text{alelski}} = 0.028$, $OR_{\text{alelski}} = 0.838$, 95% CI 0.715-0.982), dok je u slučaju nazofaringealnog karcinoma dostignuta statistička značajnost za recesivni i overdominantni genetički model ($P_{\text{rec}} < 0.001$, $OR_{\text{rec}} = 1.711$, 95% CI 1.401-2.091; $P_{\text{overdom}} < 0.001$, $OR_{\text{overdom}} = 0.654$, 95% CI 0.535-0.798) (prilog 15).

Kada je izvršena podgrupna meta-analiza bazirana na etničkom poreklu učesnika u studijama nije dobijena statistička značajnost za asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora u populacijama poreklom iz Azije ($P_{\text{alelski}} = 0.415$; $P_{\text{GC}} = 0.078$; $P_{\text{CC}} = 0.253$; $P_{\text{dom}} = 0.112$; $P_{\text{rec}} = 0.425$; $P_{\text{overdom}} = 0.300$) kao ni kod populacija evropskog porekla ($P_{\text{alelski}} = 0.967$; $P_{\text{GC}} = 0.778$; $P_{\text{CC}} = 0.753$; $P_{\text{dom}} = 0.166$; $P_{\text{rec}} = 0.995$; $P_{\text{overdom}} = 0.577$) (tabela 4.23). S obzirom na to da nisu pronađene studije koje su uključivale zasebne grupe ispitanika afričkog porekla nije sprovedena podgrupna meta-analiza za navedenu etničku grupu. Takođe, kada su podgrupne analize bazirane na specifičnom tipu karcinoma dodatno stratifikovane na osnovu etničkog porekla učesnika, nisu ustanovljene značajne razlike između rezultata koji su dobijeni u studijama sprovedenim kod populacija azijskog i evropskog porekla (prilog 17). Ovaj tip analize bio je moguć za nekoliko tipova malignih tumora: dojke, želuca, glave i vrata, pluća, štitne žlezde, prostate, jetre i debelog creva.

U podgrupnoj meta-analizi baziranoj na veličini studija nije dobijena statistička značajnost, dok je u podgrupnoj meta-analizi baziranoj na načinu regrutovanja kontrola u grupi studija u kojima su kontrole regrutovane iz bolnica za rs2910164 pokazana asocijacija sa rizikom za razvoj malignih tumora (tabela 4.23).

4.14.5. Rezultati procene prisustva greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije

Rezultati Egerovog testa nisu ukazivali na prisustvo greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije (tabela 4.24). Takođe, Pregledom Funel dijagrama nije ustanovljena asimetrija koja bi ukazivala na prisustvo ovog tipa greške ni za jedan od testiranih genetičkih modela. (slika 4.19).

Tabela 4.23. Meta-analiza potencijalne asocijacije genetičke varijante rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora.

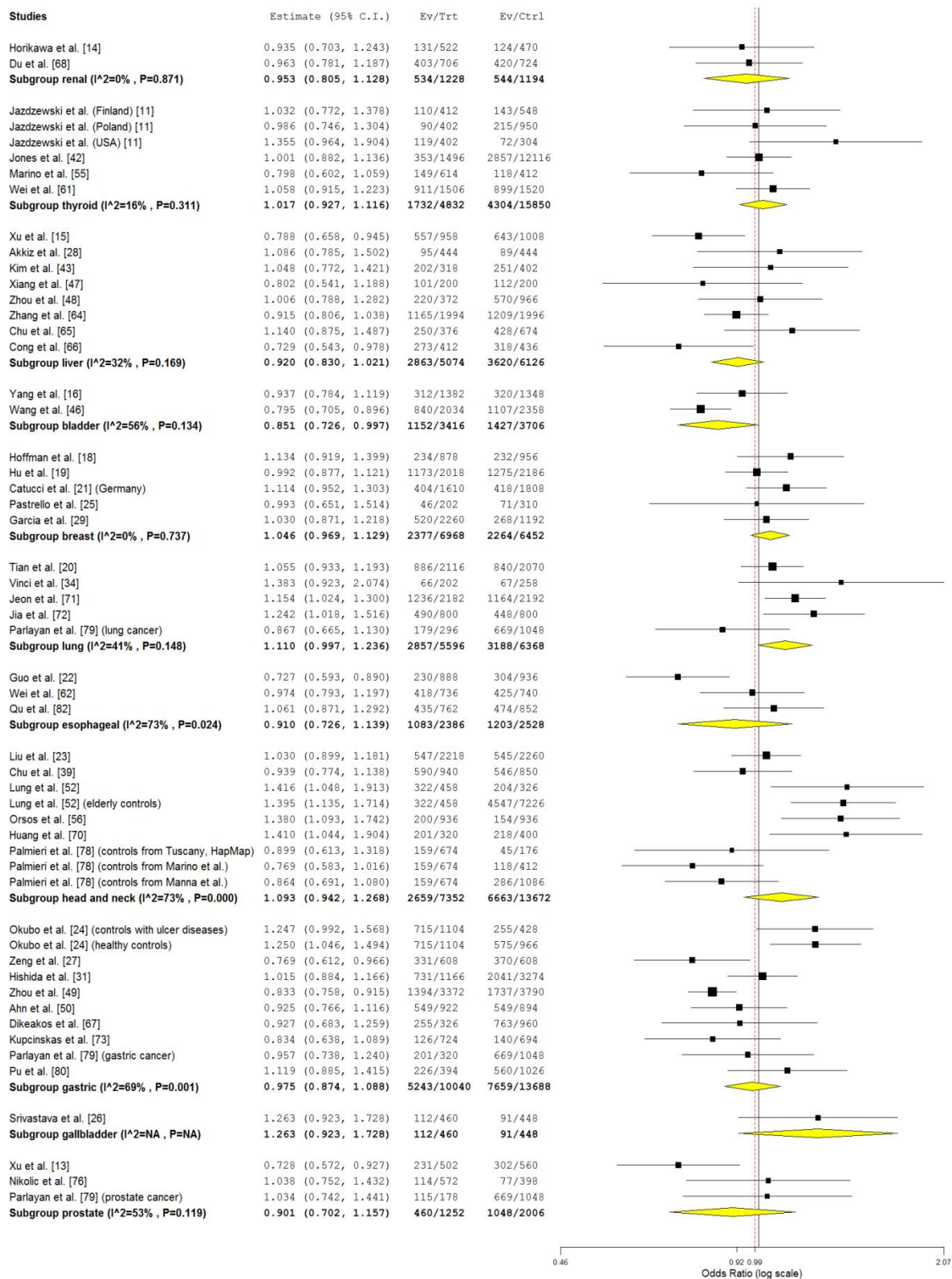
n	GC vs. GG			CC vs. GG			Alelski (C vs. G)			Dominantni (GC+CC vs. GG)			Recesivni (CC vs. GG+GC)			Overdominantni (GC vs. GG+CC)			
	OR (95% CI)	P	P_{het}^a	OR (95% CI)	P	P_{het}	OR (95% CI)	P	P_{het}	OR (95% CI)	P	P_{het}	OR (95% CI)	P	P_{het}	OR (95% CI)	P	P_{het}	
Svi tipovi malignih tumora	68	0.972 (0.921-1.025)	0.293	< 0.001	0.954 (0.870-1.046)	0.315	< 0.001	0.985 (0.944-1.029)	0.499	< 0.001	0.944 (0.823-1.083)	0.411	< 0.001	0.982 (0.915-1.054)	0.607	< 0.001	0.987 (0.942-1.035)	0.597	< 0.001
Tip malignog tumora																			
Bubrega	2	0.852 (0.648-1.120)	0.251	0.348	0.849 (0.581-1.240)	0.398	0.908	0.953 (0.805-1.128)	0.575	0.871	0.231 (0.015-3.621)	0.296	< 0.001	1.038 (0.778-1.385)	0.802	0.530	0.875 (0.697-1.099)	0.250	0.436
Štitne žlezde	6	1.135 (0.907-1.420)	0.269	0.007	0.910 (0.748-1.107)	0.346	0.123	1.018 (0.940-1.103)	0.665	0.311	1.087 (0.910-1.299)	0.357	0.044	0.789 (0.552-1.128)	0.193	0.030	1.155 (0.914-1.458)	0.227	< 0.001
Jetre	8	0.940 (0.807-1.096)	0.431	0.249	0.823 (0.696-0.974)	0.024*	0.178	0.914 (0.845-0.988)	0.024	0.169	0.802 (0.277-2.324)	0.685	< 0.001	0.930 (0.829-1.043)	0.214	0.243	1.057 (0.949-1.176)	0.315	0.724
Bešike	2	0.791 (0.684-0.915)	0.002	0.258	0.788 (0.506-1.225)	0.290	0.102	0.851 (0.726-0.997)	0.046	0.134	0.790 (0.634-0.984)	0.036	0.116	0.832 (0.687-1.007)	0.059	0.221	0.867 (0.758-0.991)	0.036	0.977
Dojke	5	1.040 (0.931-1.161)	0.491	0.574	1.123 (0.933-1.351)	0.219	0.716	1.046 (0.969-1.129)	0.249	0.737	1.059 (0.952-1.177)	0.293	0.691	1.060 (0.913-1.230)	0.442	0.560	1.024 (0.927-1.131)	0.636	0.530
Pluća	5	1.044 (0.919-1.185)	0.509	0.334	1.201 (1.033-1.397)	0.017	0.311	1.110 (1.031-1.196)	0.006	0.148	0.655 (0.285-1.504)	0.319	< 0.001	1.194 (1.059-1.346)	0.004	0.298	0.940 (0.848-1.043)	0.243	0.159
Jednjaka	3	0.889 (0.733-1.078)	0.231	0.262	0.795 (0.461-1.370)	0.409	0.017	0.910 (0.726-1.139)	0.410	0.024	0.893 (0.670-1.189)	0.438	0.106	0.841 (0.572-1.237)	0.378	0.038	0.948 (0.809-1.111)	0.512	0.523
Glave i vrata ^b	9	1.043 (0.935-1.162)	0.452	0.275	1.122 (0.863-1.458)	0.390	0.058	1.093 (0.942-1.268)	0.242	< 0.001	1.069 (0.969-1.179)	0.185	0.137	1.002 (0.827-1.215)	0.980	0.094	0.913 (0.759-1.099)	0.337	< 0.001
Želuca	10	0.902 (0.817-0.997)	0.043	0.280	0.954 (0.766-1.188)	0.673	0.003	0.975 (0.874-1.088)	0.655	< 0.001	1.259 (0.876-1.812)	0.214	< 0.001	0.974 (0.834-1.138)	0.740	0.003	0.955 (0.884-1.031)	0.238	0.314
Prostate	3	0.890 (0.682-1.162)	0.393	0.417	0.803 (0.458-1.474)	0.480	0.111	0.901 (0.702-1.157)	0.414	0.119	0.861 (0.668-1.110)	0.248	0.192	0.814 (0.610-1.087)	0.163	0.228	1.009 (0.807-1.261)	0.937	0.990
Grljica materice	2	0.721 (0.545-0.953)	0.022	0.254	0.503 (0.370-0.684)	< 0.001	0.814	0.719 (0.620-0.835)	< 0.001	0.796	0.632 (0.485-0.823)	< 0.001	0.382	0.654 (0.520-0.822)	< 0.001	0.359	1.072 (0.870-1.321)	0.514	0.358
Kolorektalni	9	0.986 (0.809-1.202)	0.889	0.005	0.966 (0.725-1.288)	0.814	0.001	0.965 (0.847-1.100)	0.596	< 0.001	1.083 (0.881-1.332)	0.450	< 0.001	0.944 (0.719-1.239)	0.677	< 0.001	1.000 (0.814-1.228)	0.999	< 0.001
Etničko poreklo																			
Evropsko ^b	25	1.013 (0.926-1.108)	0.778	0.011	0.973 (0.824-1.151)	0.753	0.092	0.999 (0.936-1.066)	0.967	0.033	1.104 (0.960-1.270)	0.166	< 0.001	1.000 (0.856-1.170)	0.995	0.081	1.025 (0.939-1.119)	0.577	0.008
Azijsko	41	0.941 (0.879-1.007)	0.078	0.025	0.937 (0.837-1.048)	0.253	< 0.001	0.977 (0.923-1.034)	0.415	< 0.001	0.839 (0.676-1.041)	0.112	< 0.001	0.968 (0.892-1.049)	0.425	< 0.001	0.970 (0.914-1.028)	0.300	< 0.001
Veličina studije																			
<1000 ^b	50	0.864 (0.700-1.064)	0.175	< 0.001	0.892 (0.787-1.010)	0.072	< 0.001	1.043 (0.946-1.149)	0.398	< 0.001	0.964 (0.893-1.042)	0.359	< 0.001	0.951 (0.859-1.052)	0.327	< 0.001	1.007 (0.940-1.080)	0.836	< 0.001
>1000	18	1.045 (0.756-1.444)	0.790	< 0.001	1.058 (0.923-1.212)	0.420	< 0.001	0.972 (0.918-1.030)	0.336	< 0.001	1.258 (0.720-2.200)	0.420	< 0.001	1.022 (0.931-1.121)	0.646	< 0.001	0.958 (0.909-1.010)	0.113	0.107

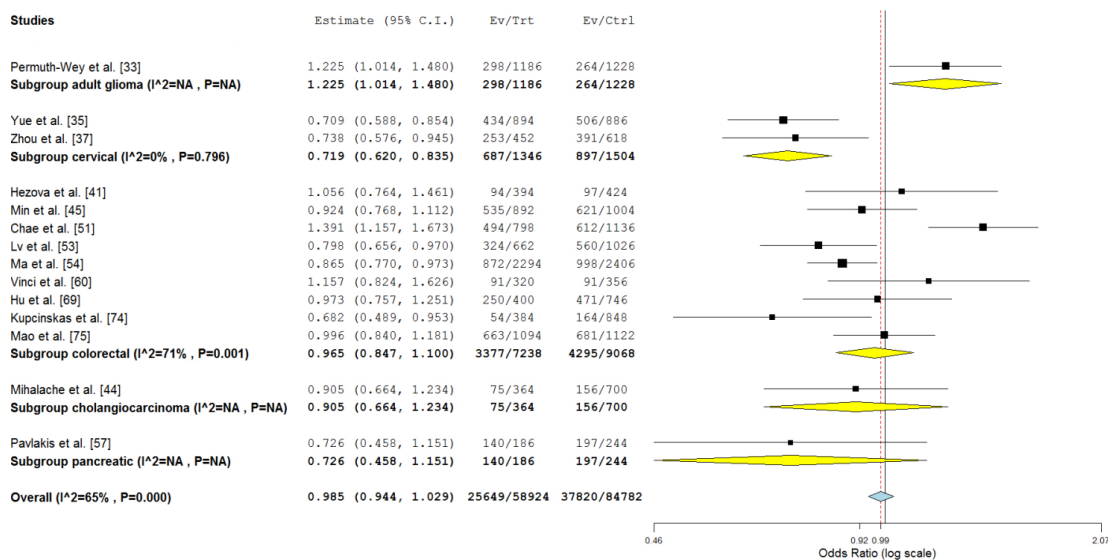
Način regrutovanja kontrolne grupe																			
iz populacije	21	1.055 (0.983-1.133)	0.138	0.305	0.962 (0.830-1.115)	0.606	0.004	1.051 (0.998-1.106)	0.059	< 0.001	0.966 (0.761-1.227)	0.778	< 0.001	1.072 (0.941-1.222)	0.295	< 0.001	1.021 (0.937-1.114)	0.630	0.002
iz bolnica ^b	44	0.912 (0.854-0.975)	0.007	0.011	0.935 (0.826-1.059)	0.290	< 0.001	0.941 (0.889-0.997)	0.038	< 0.001	1.058 (0.863-1.298)	0.586	< 0.001	0.941 (0.857-1.034)	0.205	< 0.001	0.963 (0.909-1.019)	0.190	0.001

^a *P* vrednost dobijena u testu heterogenosti rezultata studija uključenih u meta-analizu.

^b Za dominantni model u meta-analizu bila je uključena i dodatna studija Song et al. (180).

*Statistički značajni rezultati prikazani su podebljano.

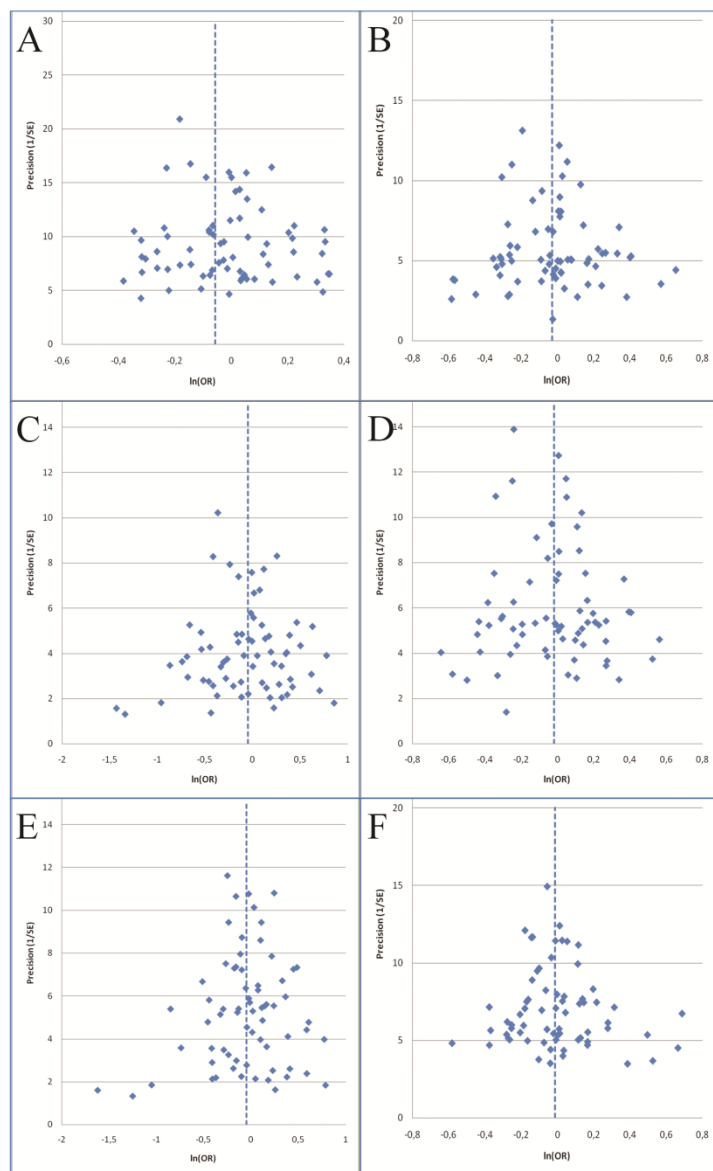




Slika 4.18. Rezultati meta-analize asocijacije genetičke varijante rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora za alelski genetički model. Za meta-analizu korišćen je model neuređenih efekata. Predstavljene *P* vrednosti su iz testova heterogenosti rezultata studija (slika preuzeta iz Nikolić i sar., 2015) (200).

Tabela 4.24. Rezultati Egerovog testa za procenu prisustva greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora.

Genetički model	<i>P</i> vrednost
GC vs. GG	0.780
CC vs. GG	0.960
Alelski (C vs. G)	0.564
Dominantni (GC+CC vs. GG)	0.844
Recesivni (CC vs. GC+GG)	0.750
Overdominantni (GC vs. GG+CC)	0.668



Slika 4.19. Funel dijagrami kojima je procenjivano prisustvo greške uzrokovane selektivnim publikovanjem rezultata studija genetičke asocijacije rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora. A) C vs. G poređenje; B) GC vs. GG poređenje; C) CC vs. GG poređenje; D) dominantni genetički model; E) recesivni genetički model; F) overdominantni genetički model.

5. Diskusija

Visoka incidenca i smrtnost od karcinoma prostate predstavljaju alarmantne statističke podatke koji kvalifikuju ovu bolest kao jedan od zdravstvenih problema globalnih razmera (17, 201). Stoga, brojni naučnici su svoja eksperimentalna istraživanja usmerili ka razrešenju molekularne osnove KP. Iako su otkrivene brojne somatske mutacije koje se povezuju sa različitim fazama u razvoju i progresiji ove bolesti, nije identifikovan gen u kojem bi promene direktno izazivale neoplastičnu transformaciju u velikom procentu slučajeva KP. Zbog toga se KP opisuje kao multifaktorijalna bolest sa velikim brojem genetičkih faktora učestvuju u genetičkoj predispoziciji za njen razvoj i invazivnost, kojima doprinose i epigenetički i sredinski faktori, kao i njihove međusobne interakcije (202). Identifikacija genetičkih varijanti kao nestandardnih prognostičkih parametara KP ima potencijalni klinički značaj i to pre svega u dizajniranju preciznih algoritama koji bi se koristili za procenu rizika za razvoj i progresiju KP (51, 202).

Među do sada identifikovanim genetičkim varijantama asociranim sa KP najveći broj potiče iz GWAS. U ovim studijama ujedno su identifikovani i najznačajniji lokusi asocirani sa rizikom za razvoj KP validirani u brojnim kasnijim studijama slučajeva i kontrola (60, 61). Sprovođenje GWAS bilo je uslovljeno sekvenciranjem genoma čoveka, kao i razvojem savremenih bioinformatičkih alata i molekularno-bioloških metoda za analizu velike količine genetičkih informacija (58, 59). Međutim, još u periodu koji je prethodio prvim GWA studijama, asocijacije genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP analizirane su u studijama baziranim na genima kandidatima. Iako su rezultati ovih studija diskutabilni, usled čestog izostanka reproducibilnosti, one se sprovode i danas (69, 71).

Poslednje decenije, rezultati brojnih istraživanja podstaknutih novim podacima o regulatornim mehanizmima molekula mikroRNK ukazali su na ulogu procesa RNK interferencije u razvoju i progresiji malignih tumora, uključujući i KP (203). Poremećaji u aktivnostima ovih molekula u neoplastičnoj transformaciji žlezdanog tkiva prostate praćeni su ekspresionim analizama, a takođe analizirane su promene u neizmenjenim

tkivima i ćelijskim linijama KP indukovane stimulacijom ili supresijom ekspresije pojedinih mikroRNK (95, 204, 205). Ustanovljene promene odnose se ne samo na molekule mikroRNK, već i proteine koji učestvuju u njihovoj biogenezi, transportu i ostvarivanju efektorskih funkcija utišavajućeg kompleksa (86, 92). Stoga, genetičke varijante u genima uključenim u regulatorne mehanizme mikroRNK postale su kandidati za studije genetičkih asocijacija sa KP (100, 101, 110, 131).

Iako su GWA studije do sada pružile najveći doprinos identifikaciji genetičkih varijanti asociраниh sa KP, studije bazirane na genima kandidatima, uključujući i one vezane za aktivnosti molekula mikroRNK, mogle bi dovesti do otkrića novih genetičkih varijanti koje su asociране sa KP. Osim toga, među najznačajnijim lokusima koji su u GWA studijama prethodno asociрани sa KP nalaze se i oni locirani u regionima siromašnim genima koji kodiraju proteine, odnosno tzv. „genskim pustinjama genoma“, a u kojima se otkriva sve više gena za mikroRNK (67).

Potencijalno funkcionalne genetičke varijante u genima za ove molekule mogu uticati na ekspresiju zrelih mikroRNK putem promena u nivou transkripcije, ali i na posttranskripcionom nivou, putem efekata na obradu njihovih prekursora (99). Takođe, genetičke varijante u sekvenci zrelih mikroRNK, pogotovo regiona „semena“, svoj funkcionalni značaj mogu ispoljavati putem uticaja na efikasnost interakcije sa ciljnim iRNK, kao i na izbor ciljnih molekula iRNK. Dakle, promene pojedinačnih nukleotida u regionu „semena“ mogu imati značajan efekat na mehanizme regulacije ekspresije gena posredovane molekulima mikroRNK (99, 101).

Na osnovu navedenih potencijalnih efekata genetičkih varijanti, geni za mikroRNK *hsa-miR-146a*, *hsa-miR-499* i *hsa-miR-196a2* birani su za kandidate u studijama slučajeva i kontrola vezanim za različite maligne tumore sprovedenim u brojnim populacijama. Među ovim studijama su i tri koje su analizirale potencijalnu asocijaciju navedenih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP u populacijama azijskog porekla (100, 101, 131).

U okviru ove doktorske disertacije, ispitivan je efekat ovih genetičkih varijanti na rizik za razvoj i/ili progresiju KP kod bolesnika iz Srbije, koja je ujedno i prva evropska populacija u kojoj je studija sa ovom temom istraživanja sprovedena. Naša studija uključivala je 355 bolesnika sa KP, 360 bolesnika sa BHP, kao i 318 muškaraca iz opšte populacije Srbije koji su činili kontrolnu grupu. Grupa bolesnika sa BHP, predstavljala je u ovoj studiji super-kontrolnu grupu sa manjom verovatnoćom dijagnostikovanja KP u odnosu na muškarce iz opšte populacije. Naime, BHP ne predstavlja premalignu leziju KP i obično se razvija u tranzicionoj zoni prostate dok se KP predominantno dijagnostikuje u perifernoj zoni prostate. U studijama gde BPH predstavlja super-kontrolu, bolesnici se podvrgavaju istom kliničkom pregledu kao i bolesnici sa KP (10).

U studiji *Xu*-a i saradnika, sprovedenoj u populaciji Han Kineza, pokazana je asocijacija alela C genetičke varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* sa povećanim rizikom za razvoj KP. Ovaj alel bio je manje učestali u grupi bolesnika sa KP, a OR dobijen za heterozigotni genotip iznosio je 0.71 u poređenju sa homozigotom GG, dok je za homozigot CC ova cifra iznosila 0.50. Takođe, pokazana je asocijacija rs2910164 sa nivoom ekspresije miR-146a u neoplastično transformisanom tkivu prostate (100). U kasnijoj studiji u kojoj je analizirana potencijalna asocijacija iste genetičke varijante sa KP u populaciji Severne Indije nisu dobijeni statistički značajni rezultati u navedenom testu (101). Rezultati dobijeni u okviru ove studije razlikuju se od rezultata *Xu*-a i saradnika (100), s obzirom na to nije pokazana asocijacija genetičke varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* sa rizikom za razvoj KP u populaciji Srbije. Iako pomenuti rezultati odgovaraju onima iz studije *George*-a i saradnika (101), podaci iz navedene studije moraju se razmatrati sa oprezom, s obzirom na to da je u kontrolnoj grupi postojalo značajno odstupanje od HWE. Takođe, rezultati dobijeni u okviru ove disertacije nisu uporedivi sa rezultatima studije *Paralayan*-a i saradnika, jer su u navedenoj studiji analizirani *post-mortem* uzorci starijih muškaraca iz Japana, pri čemu nije naveden uzrok smrti ispitanika, a KP je detektovan na osnovu histopatološkog nalaza (131). Ovakav dizajn studije upućuje na potencijalno značajan procenat detektovanih latentnih formi KP koji komplikuje tumačenje rezultata.

U studiji Xu-a i saradnika procenjavana je i potencijalna asocijacija rs2910164 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP, pri čemu ni u jednom testu nije dostignuta statistička značajnost (100). Takođe, rezultati George-a i saradnika nisu pokazali asocijaciju navedene genetičke varijante sa GS i razvojem metastaza u kostima (101). Za razliku od ovih rezultata, analize u okviru ove disertacije pokazale su asocijaciju rs2910164 kako sa GS, tako i sa prisustvom udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP. Takođe, naši rezultati pokazuju asocijaciju rs2910164 sa rizikom za progresiju KP procenjenim prema kriterijumima *Medeiros*-a i saradnika (115).

U testovima asocijacije rs2910164 sa rizikom za progresiju KP određenim prema kriterijumima *D'Amico*-a i saradnika nije dobijena statistička značajnost. Ukoliko se uzme u obzir to da su kriterijumi ovih autora bazirani na proceni rizika za biohemijsku progresiju bolesti (procenjivanu povišenim nivoom serumske vrednosti PSA) nakon radikalne prostatektomije, naši rezultati u skladu su sa rezultatima *Chen*-a i saradnika koji nisu pokazali asocijaciju rs2910164 sa navedenom karakteristikom (206). Međutim, pomenuta studija uključivala je relativno mali broj ispitanika, odnosno 72, od kojih je kod 24 došlo do biohemijske progresije bolesti tokom dvogodišnjeg perioda. Stoga, broj ispitanika sa određenim genotipom rs2910164 je relativno mali, pogotovo bolesnika homozigotnih za manje učestali alel navedene genetičke varijante. Među ograničenja studije ubrajaju se i relativno mali period praćenja bolesnika, kao i isključivanje mnogih bolesnika iz studije na osnovu nedostupnih kliničkih podataka ili primene dodatne terapije.

U većem broju testova sprovedenih u okviru naše studije dobijena je statistička značajnost za overdominantni genetički model. Objašnjenje ovakvog rezultata ponuđeno je u studiji koju su sproveli *Jazdzewski* i saradnici, a koja je analizirala efekat rs2910164 na rizik za razvoj papilarnog karcinoma štitne žlezde (142). Naime, ovi autori pripisuju značaj heterozigotnom genotipu kao jedinom koji je uzrok istovremenog prisustva u ćeliji tri različite mikroRNK sintetisane sa istog gena *hsa-miR-146a*, a koje se odlikuju različitim setom ciljnih iRNK. Kod heterozigota za rs2910164, prisustvo manje učestalog alela potencijalno bi uticalo istovremeno na biosintezu vodećeg lanca miR-146a-5p, kao i zaostajućeg lanca miR-146a-3p, koji bi bio prisutan i u formi sa

izmenjenim regionom semena usled prisustva manje učestalog alela (142). Međutim, efekat zaostajućeg lanca miR-146a na proces maligne transformacije ćelija žlezdanog epitela prostate nije u dovoljnoj meri ispitan, već su se dosadašnje studije vezane za patogenezu KP fokusirale na vodeći lanac za koji su ustanovljena tumor-supresorska svojstva (103-105).

Ova grupa autora takođe je pokazala značajnu zastupljenost zaostajućeg lanca miR-146a u malignom i neizmenjenom tkivu štitne žlezde, što dodatno podržava pretpostavljeni biološki mehanizam delovanja rs2910164 (142). Stoga, iako do sada nije analizirano prisustvo miR-146a-3p u tkivu prostate, rezultati koji se odnose na tkivo štitne žlezde upućuju na to da ovaj lanac zrele mikroRNK može biti selektovan za inserciju u RISC i da se ova pojava ne može isključiti u slučaju prostate i karcinoma koji potiče iz žlezdanog epitela ovog organa.

Osim na sekvencu zrelih mikroRNK, rs2910164 bi svoj efekat na rizik za progresiju KP mogla ostvarivati i putem efekta na ekspresiju molekula mikroRNK, kako vodećih, tako i zaostajućih lanaca. Naime, efekat genotipova rs2910164 na biogenezu miR-146a-5p pokazan je ekspresionim analizama u KP, ali u papilarnom karcinomu štitne žlezde, u *in vitro* sistemima, kao i u krvi i drugim tkivima bolesnika sa malignim i nemalnim bolestima (100, 142, 161, 207, 208).

U prilog mehanizmu baziranom na uticaju rs2910164 na ekspresiju miR-146a govore i rezultati koji se odnose na ulogu ove mikroRNK u molekularnoj osnovi KP. Naime, miR-146a, odnosno njen vodeći lanac, odlikuje se tumor-supresorskim svojstvima u tkivu prostate. Ovi rezultati potiču iz ekspresionih studija koje pokazuju njenu smanjenu ekspresiju u uznapredovalim fazama bolesti, kao i iz eksperimenata koji su podrazumevali indukovanu ili suprimiranu ekspresiju miR-146a u ćelijskim linijama KP (103-105). Stoga, očekuje se da ukoliko manje učestali alel genetičke varijante koji smanjuje nivo ekspresije ove mikroRNK ima efekat na rizik za progresiju bolesti, taj efekat se ispoljava u vidu povećanja rizika, kao što je slučaj sa rezultatima ove disertacije.

Uprkos potencijalnom funkcionalnom značaju, kao i velikom broju studija koje analiziraju njenu asocijaciju sa drugim malignim bolestima, genetička varijanta rs3746444 u *hsa-miR-499* analizirana je u samo jednoj ranijoj studiji koja se odnosi na KP. U studiji *George-a* i saradnika dobijena je statistička značajnost u testu asocijacije navedene genetičke varijante sa rizikom za razvoj KP. Istovremeno, nije pokazana asocijacija rs3746444 sa GS, kao ni sa prisustvom metastaza u kostima kod bolesnika sa KP (101).

U našoj studiji, dobijeni su suprotni rezultati koji se odnose na asocijaciju rs3746444 sa rizikom za razvoj bolesti. S druge strane, kao i u ranijoj studiji, nije pokazana asocijacija ove genetičke varijante sa GS i prisustvom metastaza u kostima, a takođe nije ustanovljena njena asocijacija sa serumskim vrednostima PSA, kao ni sa kliničkim stadijumom lokalizovanog KP. Iako nije ustanovljena asocijacija rs3746444 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP, statistička značajnost dobijena je u testu asocijacije navedene genetičke varijante sa rizikom za progresiju KP, koja nije analizirana u ranijoj studiji. Naime, homozigot manje učestalog alela G smanjuje rizik za progresiju KP, odnosno ima protektivni efekat.

Kada je reč o varijanti rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2*, njena potencijalna asocijacija sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP takođe je analizirana u studiji *George-a* i saradnika (101). Usled odstupanja raspodela genotipova u kontrolnoj grupi od HWE, utvrđenu asocijaciju navedene genetičke varijante sa rizikom za razvoj bolesti treba uzeti sa rezervom. Ujedno, navedeni rezultat može biti jedno od objašnjenja za razliku u odnosu na podatke iz naše studije, s obzirom na to da u navedenim testovima u populaciji Srbije nije pokazana asocijacija rs11614913 sa rizikom za razvoj KP ni za jedan testirani genetički model. Ovi rezultati odgovaraju rezultatima studije *Parlayan-a* i saradnika, uz opreznost u poređenju, s obzirom na značajne razlike u dizajnu studije (131).

U okviru ove disertacije procenjena je i potencijalna asocijacija rs11614913 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara i rizikom za progresiju KP, pri čemu nisu dobijeni statistički značajni rezultati. Slično, ranija studija *George-a* i saradnika

nije pokazala asocijaciju navedene genetičke varijante sa GS i razvojem udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP (101).

Osim navedenih varijanti u genima za mikroRNK koje su analizirane u ranijim studijama, varijanta rs895819 u genu za miR-27a izabrana je za analizu u okviru ove disertacije. Izbor rs895819 zasnivao se na prethodnim rezultatima koji su upućivali na njenu asocijaciju sa rizikom za razvoj drugih malignih tumora, kao i na potencijalnom efektu na biogenezu i/ili funkciju miR-27a (109). Naime, ova genetička varijanta nalazi se u regionu gena koji kodira segment terminalne petlje prekursora miR-27a, te potencijalno utiče na njegovu sekundarnu strukturu. Na taj način, rs895819 bi mogla da utiče na obradu prekursora mikroRNK.

Ranija istraživanja pokazala su promenu u nivou ekspresije miR-27a u maligno transformisanom u odnosu na neizmenjeno tkivo žlezdanog epitela prostate. Osim toga, njena ekspresija regulisana je androgenim hormonima, i to mehanizmom pozitivne povratne sprege koja stimuliše androgenu signalizaciju. Ovaj efekat miR-27a ostvaruje putem posttranskripcione regulacije ekspresije prohibitina (eng. *Prohibitin*, PHB), koji obavlja funkciju korepresora AR i karakteriše se tumor-supresornim svojstvima (108).

Androgeni hormoni stimulišu tranzijentno transkripciju gena za miR-24-1, miR-23b i miR-27a, a značajniji efekat na ekspresiju navedenih mikroRNK ostvaruju putem regulacije ekspresije njihovog zajedničkog prekursora (108, 209). Ekspresija miR-27a regulisana je androgenim hormonima na transkripcionom, ali i na postranskripcionom nivou nedovoljno poznatim mehanizmom. Zahvaljujući rezultatima dosadašnjih ekspresionih studija, kao i navedene studije koja je okarakterisala odnos između androgene signalizacije i miR-27a, ova mikroRNK označena je i kao onkogen a u slučaju KP (108, 209).

Rezultati dobijeni u našoj studiji pokazali su asocijaciju genetičke varijante rs895819 sa rizikom za razvoj KP. Statistička značajnost dobijena je poređenjem distribucija navedene genetičke varijante u grupama bolesnika sa KP i BHP. Odsustvo značajnosti u poređenjima u kojima su bile uključene grupa bolesnika sa KP i kontrolna

grupa zdravih muškaraca može se objasniti svojstvom grupe bolesnika sa BHP kao super-kontrolne grupe u ovom tipu istraživanja.

U testovima asocijacije rs895819 sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP statistička značajnost dobijena je samo za asocijaciju navedene genetičke varijante sa kliničkim stadijumom primarnog tumora. Takođe, za manje učestali alel C ove varijante pokazana je asocijacija sa prisustvom udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP, kao i sa povećanim rizikom za progresiju bolesti.

S obzirom na to da asocijacija rs895819 sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP nije analizirana u ranijim studijama nije bilo moguće uporediti naše rezultate sa rezultatima iz drugih populacija.

Nakon objavljivanja rezultata ove doktorske disertacije, a koji su se odnosili na potencijalnu asocijaciju varijanti u genima za mikroRNK sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP publikovana su dva rada sa sličnom tematikom. U radu *Chu*-a i saradnika (210) pokazana je asocijacija genetičke varijante rs4705342 locirane u računarski predikovanom regionu promotora gena za miR-143 sa rizikom za razvoj KP. Takođe, navedena genetička varijanta locirana je uzvodno i od gena za miR-145, koja se nalazi u okviru istog klastera gena za mikroRNK. U okviru istog rada, za rs4705342 pokazan je i efekat na aktivnost promotora, odnosno na nivo transkripcije miR-143 u *in vitro* sistemima, kao i korelacija nivoa ekspresije ove mikroRNK sa ćelijskom proliferacijom i sposobnošću migracije, ali i sa nivoom ekspresije ciljne iRNK transkribovane sa gena *KLK2* (eng. *Kallikrein Related Peptidase 2*, *KLK2*) (210). Navedeni rezultati podržavaju hipoteze o potencijalnom značaju genetičkih varijanti u genima za mikroRNK u molekularnoj patogenezi KP.

Studija *Hashemi*-a i saradnika, s druge strane, uključivala je genetičke varijante rs2910164 u genu *hsa-miR-146a*, rs3746444 u genu *hsa-miR-499* i rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2* koje su analizirane i u okviru ove disertacije, kao i rs2292832 u genu *hsa-miR-149* (211). Navedena studija sprovedena je u populaciji Irana i pokazala je asocijaciju rs3746444 sa rizikom za razvoj KP, što je u saglasnosti sa rezultatima studije

George-a i saradnika (101), a razlikuje se od rezultata ove doktorske disertacije. S druge strane, kao i u našoj studiji, nije pokazana asocijacija rs2910164 i rs11614913 sa rizikom za razvoj KP. Slično našim rezultatima, u studiji *Hashemi*-a i saradnika pokazana je asocijacija rs2910164 sa kliničkim stadijumom primarnog tumora, pri čemu je korišćena drugačija podela bolesnika sa KP na osnovu ovog kriterijuma, kao i različiti statistički test kojim je izvršeno poređenje distribucija genotipova. Ove razlike mogu biti i razlog za odsustvo statističke značajnosti u testovima asocijacije rs2910164, kao i drugih analiziranih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara u navedenoj studiji (211). Takođe, u studiji *Hashemi*-a i saradnika (211) u kontrolnoj grupi prisutno je značajno odstupanje distribucija genotipova sve četiri analizirane genetičke varijante od pretpostavki HWE.

Karakterisanje mikroRNK kao onkogenih ili tumor-supresorskih na osnovu ekspresionih analiza i eksperimenata u ćelijskim kulturama je uslovno, s obzirom na veliki broj gena čije su iRNK ciljne za istu mikroRNK. U setu ciljnih iRNK mogu istovremeno biti one transkribovane sa proto-onkogenima i sa tumor-supresornih gena, zbog čega krajnji efekat na patogenezu malignih bolesti može zavistiti od tipa tkiva, kao i od delovanja drugih regulatornih mehanizama (95, 212, 213). Ova karakteristika mikroRNK otežava određivanje potencijalnog biološkog mehanizma kojim varijante u genima za mikroRNK molekule mogu ostvarivati svoj efekat na rizik za razvoj i/ili progresiju KP, uključujući i one obuhvaćene ovom studijom. Osim toga, za genetičke varijante koje se nalaze u delovima gena koji kodiraju region „semena“ mikroRNK dodatnu otežavajuću okolnost u predviđanju efekata predstavlja promena seta ciljnih iRNK (214, 215). Takođe, zaostajući lanci mikroRNK tema su sve većeg broja studija, a njihova zastupljenost u okviru RISC može varirati između različitih tkiva (216, 217).

Pored varijanti u genima za mikroRNK, efekat u vidu promena u procesu RNK interferencije mogu ispoljavati varijante u genima čiji proteinski produkti učestvuju u biosintezi, unutarćelijskom transportu i posredovanju u regulatornim funkcijama mikroRNK (99). Za analizu u okviru ove doktorske disertacije izabrane su varijante u genima za proteine utišavajućeg kompleksa čija je asocijacija sa KP i/ili drugim malignim tumorima ispitivana u prethodnim studijama. Za svaki gen izabrana je po

jedna genetička varijanta na osnovu rezultata prethodnih studija, pogotovo onih koji su se odnosili na rizik za progresiju bolesti, usled potrebe za identifikacijom i/ili validacijom genetičkih varijanti sa ovim svojstvom.

Prethodno, u studiji *Liu*-a i saradnika sprovedenoj u populaciji Han Kineza analizirana je potencijalna asocijacija genetičkih varijanti u genu *GEMIN4* sa rizikom za razvoj i progresiju KP (110). U ovoj studiji, statistički značajni rezultati dobijeni su u testovima koji su uključivali dve potencijalno funkcionalne varijante u navedenom genu, rs7813 i rs2740348. Navedene genetičke varijante razmatrane su prilikom odabira za našu studiju kao potencijalno funkcionalne, na osnovu njihove lokalizacije u okviru gena *GEMIN4*. Naime, obe genetičke varijante nalaze se u okviru egzona i dovode do zamene aminokiselina u proteinu GEMIN4 (110). Pretpostavljeni biološki mehanizam putem kojeg bi ove varijante mogle da utiču na proces maligne transformacije je, stoga, promena u funkciji proteina koji je komponenta utišavajućeg kompleksa. U prilog potencijalnom efektu rs7813 na funkciju proteina GEMIN4 ukazuju i rezultati predikcije u okviru softvera PolyPhen-2 (218).

Za genetičku varijantu rs7813, koja je izabrana za analizu u okviru ove doktorske disertacije, *Liu* i saradnici ustanovili su asocijaciju homozigota za alel T (odnosno A) sa povećanim rizikom za razvoj KP, kao i sa povećanim rizikom za progresiju bolesti u viši klinički stadijum. Međutim, kao referentni genotip u testovima sprovedenim u studiji *Liu*-a i saradnika korišćen je homozigot za manje učestali alel, što znači da manje učestali alel C (odnosno G) ima suprotni efekat od navedenog za alel T (odnosno A) (110).

Za razliku od rezultata navedene studije, naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu asocijaciju rs7813 sa rizikom za razvoj KP. Međutim, pokazana je asocijacija ove genetičke varijante sa kliničkim stadijumom KP, pri čemu manje učestali alel G smanjuje rizik za progresiju KP u viši klinički stadijum. Iako su ovi rezultati slični rezultatima *Liu*-a i saradnika treba imati u vidu da je u ranijoj studiji korišćen drugačiji sistem klasifikacije za određivanje kliničkog stadijuma primarnog tumora. Naime,

stadijumi bolesti I, II, III i IV određeni su na osnovu kombinacije kliničkog stadijuma procenjenog na osnovu TNM sistema klasifikacije i GS (110).

Takođe, distribucije genotipova u grupama bolesnika sa različitim stadijumom KP poređene su sa distribucijom u kontrolnoj grupi. U našoj studiji vršena su međusobna poređenja koja su se odnosila na grupe bolesnika sa KP, dok su u studiji *Liu*-a i saradnika (110) međusobno upoređene samo distribucije genotipova rs7813 u grupama bolesnika sa stadijumom I/II i III/IV. Dakle, uočene razlike u distribucijama genotipova između kontrolne grupe i bolesnika sa KP sa stadijumima III i IV mogu biti odraz asocijacije rs7813 sa rizikom za razvoj bolesti.

U studiji *Liu*-a i saradnika (110) nisu analizirane asocijacije rs7813 sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA, kao ni sa GS i rizikom za progresiju KP, te naši rezultati nisu mogli biti upoređeni ni sa jednom prethodnom studijom.

Takođe, prethodno publikovane studije nisu analizirale potencijalnu asocijaciju varijanti u genima *DICER1*, *AGO2*, *TARBP2* i *GEMIN3* sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP.

Naši rezultati nisu pokazali statistički značajnu asocijaciju genetičke varijante rs3742330 locirane u 3'-UTR-u (eng. *3'-Untranslating Region*, 3'-UTR) gena *DICER1* sa rizikom za razvoj KP. Međutim, za navedenu genetičku varijantu ustanovljena je asocijacija kako sa GS i kliničkim stadijumom primarnog tumora, tako i sa rizikom za progresiju bolesti. U poređenjima za koje je dobijena statistička značajnost, za manje učestali alel G ustanovljen je protektivni efekat.

Navedena genetička varijanta svoj efekat na rizik za progresiju bolesti mogla bi ostvarivati putem uticaja na nivo ekspresije proteina Dicer. Kako se analizirana genetička varijanta nalazi u 3'-UTR-u gena, bez ekspresionih analiza, nije moguće proceniti da li je efekat prisustva određenog genotipa u pozitivnoj ili negativnoj korelaciji sa nivoom ekspresije proteina Dicer. Do sada su promene u ekspresiji ovog proteina ustanovljene na osnovu poređenja malignog i neizmenjenog žlezdanog tkiva

prostate (86, 88). Istovremeno, pokazana je korelacija nivoa ekspresije Dicer-a sa GS, kliničkim stadijumom primarnog tumora, kao i prisustvom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (86).

Informaciona RNK transkribovana sa gena *DICER1* predstavlja ciljnu iRNK za nekoliko mikroRNK sa značajno izmenjenom ekspresijom u malignom tumoru u odnosu na okružujuće neizmenjeno tkivo žlezdanog epitela prostate, kao i sa značajnim variranjem u nivou ekspresije između različitih faza u progresiji KP (219). Slično, za protein Dicer utvrđena je asocijacija povećane ekspresije sa lokalizovanom bolešću, dok smanjenje ekspresije vodi smanjenju proliferacije i stimulaciji apoptoze tumorskih ćelija, ali i povećanju njihove migracije (92, 220). Na osnovu dosadašnjih eksperimentalnih rezultata, ovom proteinu pripisuje se plejotropno dejstvo koje zavisi od nivoa ekspresije (220). Genetička varijanta rs3742330 mogla bi, stoga, da utiče na navedena svojstva proteina Dicer i njegovu ulogu u procesu maligne transformacije i progresije KP.

Za genetičku varijantu rs4961280 u promotoru gena *AGO2* nije pokazana asocijacija sa rizikom za razvoj KP. S druge strane, ustanovljena je asocijacija navedene genetičke varijante sa GS, kao i sa kliničkim stadijumom primarnog KP. U navedenim poređenjima, ustanovljeno je da manje učestali alel A smanjuje rizik za progresiju KP u viši klinički stadijum, dok su u slučaju GS u različitim poređenjima dobijeni suprotni rezultati. Jedno od objašnjenja za ova nepoklapanja je u relativno malom broju bolesnika u pojedinačnim grupama baziranim na vrednostima GS, kao i bolesnika sa homozigotnim genotipom za manje učestali alel A.

Ukoliko se uzme u obzir povećan nivo ekspresije proteina *AGO2* u maligno transformisanom u odnosu na neizmenjeno tkivo prostate (88, 92), kao i pozicija rs4961280 u promotoru gena, očekivani rezultat bio bi protektivni efekat alela A. Ova pretpostavka u skladu je sa rezultatima koji se odnose na utvrđenu asocijaciju rs4961280 sa kliničkim stadijumom primarnog KP. Smanjenje nivoa ekspresije proteina *AGO2* asocirano je sa represijom invazivnosti KP. Sličan efekat ispoljava i

povećanje nivoa ekspresije mikroRNK miR-100 čija je ciljna iRNK produkt gena *AGO2* (92, 221).

Kada je reč o proteinu TRBP, produktu gena *TARBP2*, pokazana je njegova povećana ekspresija u malignom tkivu prostate u odnosu na neizmenjeno tkivo (88). Promene u nivou ekspresije ovog proteina detektovane su i u drugim malignim tumorima, pri čemu su ustanovljene izmenjene ekspresije TRBP bile u nekim slučajevima po tipu povećanja, a u drugim po tipu smanjenja (222). U prilog potencijalnom značaju TRBP u molekularnoj osnovi malignih tumora zavisnih od steroidnih hormona govore i eksperimenti koji ukazuju na potencijalnu ulogu proteina TRBP kao koregulatora jedarnih receptora. Ovaj efekat verovatno ostvaruje putem asocijacije sa RNK aktivatorom steroidnih receptora (223).

Genetička varijanta rs784567 locirana je u promotoru gena *TARBP2*. Za ovu genetičku varijantu ustanovljena je asocijacija sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA, dok u drugim testovima asocijacije sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP nisu dobijeni statistički značajni rezultati. Takođe, za rs784567 nije ustanovljena asocijacija sa rizikom za progresiju bolesti. Dobijeni rezultat nije moguće diskutovati sa rezultatima sličnih studija jer ni u jednoj do sada objavljenoj studiji slučajeva i kontrola, uloga rs784567 u patogenezi KP nije bila tema.

Protein GEMIN3, označen i kao DDX20 (eng. *DEAD-box helicase 20*, DDX20), poseduje aktivnost RNK helikaze (83). Dosadašnji rezultati pokazali su značajno povećanu ekspresiju ovog proteina u KP u odnosu na okolno neizmenjeno tkivo žlezdanog epitela prostate. Takođe, pokazana je korelacija između nivoa ekspresije GEMIN3 i veličine tumora, stadijuma primarnog tumora određenog prema TNM sistemu klasifikacije, kao i procenjene prognoze ishoda bolesti. Eksperimenti sprovedeni u ćelijskim kulturama pokazali su da povećanje ekspresije ovog proteina dovodi do intenziviranja proliferacije malignih ćelija, kao i do povećanja metastatskog potencijala (224).

U našoj studiji, za egzonsku varijantu rs197414 u genu *GEMIN3* nije ustanovljena asocijacija sa rizikom za razvoj, kao ni sa rizikom za progresiju KP. Takođe, testovi asocijacije navedene genetičke varijante sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara nisu pokazali statističku značajnost.

Iako su u okviru ove disertacije ustanovljene brojne asocijacije analiziranih genetičkih varijanti sa vrednostima standardnih prognostičkih parametara KP i/ili rizikom za progresiju bolesti, značajno ograničenje studije je relativno mali broj ispitanika u okviru pojedinačnih grupa bolesnika sa KP formiranih upravo prema vrednostima standardnih prognostičkih parametara. Takođe, za pojedine genetičke varijante broj homozigota za manje učestali alel bio je relativno mali, pa se dobijene asocijacije moraju uzeti sa određenom rezervom. To je i jedan od razloga što se za studije slučajeva i kontrola preporučuje i sprovođenje replikativnih studija u okviru iste populacije. Svakako da i povećanje broja analiziranih bolesnika sa KP može imati efekat na rezultate studija asocijacija. Naravno da je jedno od glavnih ograničenja studija koje za cilj imaju ispitivanje asocijacija genetičkih varijanti sa rizikom za progresiju KP i vrednost GS. Naime, GS kao standardni prognostički parametar KP određuje se na osnovu subjektivne odluke lekara patologa.

U ranijim studijama asocijacije varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj i/ili progresiju KP analizirani su efekti pojedinačnih varijanti ili haplotipova (100, 101, 110). Ovakav tradicionalni pristup u analizi rezultata studija genetičkih asocijacija podrazumeva detekciju značajnih pojedinačnih efekata u smislu smanjenja ili povećanja rizika za razvoj, progresiju bolesti, ili za određeni ishod lečenja i preživljavanje bolesnika. Dakle, ovaj vid analize uslovljava izostanak detekcije neaditivnih efekata većeg broja genetičkih varijanti, kao i genetičkih i sredinskih činilaca (111, 112).

Iako za većinu analiziranih genetičkih varijanti nije ustanovljena asocijacija sa rizikom za razvoj KP, pretpostavljeno je da bi analiza potencijalnih epistatičkih interakcija varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa mogla da dovede do identifikacije novih asocijacija. Stoga, u cilju prevazilaženja ograničenja pristupa baziranog na analizi efekata pojedinačnih genetičkih varijanti, sprovedena je

analiza bazirana na ispitivanju potencijalnog efekta navedenih epistatičkih interakcija na rizik za razvoj i progresiju KP. Takođe, analiza bazirana na primeni metode MDR, koja je korišćena u okviru ove studije ne podrazumeva prethodno znanje o genetičkoj osnovi bolesti i uključenosti analiziranih genetičkih varijanti, odnosno ne zahteva predviđanje potencijalno adekvatnog genetičkog modela (111).

Dosadašnje studije koje su analizirale efekat statističkih epistatičkih interakcija između genetičkih varijanti i rizika za razvoj KP nisu uključivale genetičke varijante analizirane u okviru ove disertacije. Razlog za testiranje potencijalnih epistatičkih interakcija između izabranih genetičkih varijanti je prethodno znanje o funkcionalnoj interakciji između proteina u sastavu RISC, kao i prekursora i zrelih mikroRNK u čijim genima se nalaze genetičke varijante uključene u našu studiju. Takođe, za varijante u genima za mikroRNK koje su izabrane za analizu pretpostavljen je mehanizam efekta na ekspresiju i/ili funkciju zrelih mikroRNK, koji zavisi i od interakcije sa proteinima uključenim u biosintezu i ostvarivanje efektorskih funkcija mikroRNK, a među koje su uključene i proteinske komponente RISC. Stoga, eventualno ustanovljene statističke epistatičke interakcije mogu reflektovati realne biološke epistaze.

Ukupan broj bolesnika sa KP uključenih u analizu efekata epistatičkih interakcija iznosio je 344, dok su kontrolnu grupu činila 293 muškarca bez znakova bolesti prostate. Bolesnici sa KP podeljeni su u grupe od 178 bolesnika sa visokim rizikom i 139 bolesnika sa niskim rizikom za progresiju bolesti. Testirani su modeli interakcije od 2 do 5 lokusa uključenih u analizu, kao i efekat pojedinačnih lokusa, pri čemu je procenjivan najbolji model.

Razlog za testiranje pojedinačnih varijanti u genima za mikroRNK u kombinaciji sa varijantama u genima za proteine utišavajućeg kompleksa je u početnoj hipotezi funkcionalne povezanosti produkata navedenih gena u procesu biosinteze zrelih mikroRNK. Stoga, u navedenoj analizi nisu kombinovane varijante u različitim genima za mikroRNK.

Analiza koja se odnosila na potencijalni efekat statističkih epistatičkih interakcija na rizik za razvoj KP nije pokazala statističku značajnost. S druge strane, u analizi koja se odnosila na rizik za progresiju bolesti, pokazan je statistički značajan efekat interakcije između tri genetičke varijante. Navedeni model uključuje varijante rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2*, rs7813 u genu *GEMIN4*, kao i rs784567 u genu *TARBP2*. Takođe, izostavljanjem genetičke varijante rs11614913 iz analize i njenim ponavljanjem potvrđena je interakcija rs7813 i rs784567. Interpretacija rezultata ukazala je i na to da je reč o sinergističkoj interakciji.

Ni za jednu genetičku varijantu u sastavu najboljeg modela interakcije nije prethodno u okviru ove studije ustanovljen statistički značajan pojedinačni efekat na rizik za progresiju KP. Takođe, u okviru analize efekata epistatičkih interakcija nije dobijena dovoljna vrednost CVC, niti su rezultati bili konzistentni u većem broju ponavljanja, da bi ukazivali na značaj modela efekta jednog lokusa, uključujući tri navedene genetičke varijante. Dakle, mala je verovatnoća da je rezultat analize uslovljen uticajem značajnih pojedinačnih efekata genetičkih varijanti.

Biološko objašnjenje za ustanovljene statističke epistatičke interakcije i njihovu asocijaciju sa rizikom za progresiju KP je u potencijalnom reflektovanju realnih bioloških epistaza između gena *TARBP2* i *GEMIN4* čiji su proteinski produkti uključeni u biosintezu mikroRNK, uključujući i miR-196a2. Za genetičku varijantu rs11614913 pretpostavljen je mehanizam uticaja na funkciju miR-196a2 putem menjanja sekundarne strukture prekursora i efekta na biogenezu zrele mikroRNK, ali i mehanizam promena u interakciji miR-196a2 sa ciljnim iRNK (101). S obzirom da TRBP i GEMIN4 čine deo RISC, uključenog u biogenezu i ostvarivanje regulatornih aktivnosti mikroRNK, oba pretpostavljena mehanizma za efekat rs11614913 uklapaju se u hipotezu kojom se objašnjavaju detektovane statističke epistaze.

Među razloge za odstupanja rezultata naše studije od prethodno dobijenih u različitim azijskim populacijama ubrajaju se potencijalne međupopulacione genetičke razlike, kao i razlike u dizajnu studija i njegovom kvalitetu, veličini grupa ispitanika, ali i metodologiji i tumačenju rezultata genotipizacije, statističkoj obradi rezultata, kao i u

izboru kontrolne grupe i kriterijumima za uključivanje i isključivanje ispitanika u studiju (225-227). U cilju ispitivanja efekta navedenih razlika na rezultate studija i procenu asocijacije analiziranih genetičkih varijanti sa rizikom za razvoj KP sprovedena je meta-analiza rezultata dosadašnjih studija sa navedenom temom istraživanja.

Takođe, s obzirom na mali broj studija koje su uključivale bolesnike sa KP, u meta-analizu su uključeni rezultati studija koje su se odnosile i na druge maligne tumore, sa ciljem identifikovanja potencijalnog efekta međupopulacionih razlika, veličine studija i načina regrutovanja kontrolne grupe na rezultate studija. Takođe, za podgrupne analize bazirane na tipu malignog tumora očekivano je da ukažu na tkivno-specifične razlike u efektima genetičkih varijanti, a meta-analiza svih pogodnih studija potencijalno bi ukazala i na generalni efekat alela ispitivanih genetičkih varijanti na rizik za razvoj malignih tumora. Tkivno-specifični efekat, odnosno efekat specifičan za tip malignog tumora, očekivan je s obzirom na tkivno-specifične razlike u ekspresionim profilima mikroRNK, ciljnih iRNK i proteina koje kodiraju. Mogući efekat je složeniji ako se uzme u obzir i činjenica da pojedini proteinski produkti ciljnih iRNK imaju tumor-supresorska, a drugi onkogeno svojstva.

Meta-analize koje su sprovedene u okviru ove studije nisu se odnosile na rizik za progresiju bolesti zbog malog broja objavljenih studija, kao i zbog različitih kriterijuma za selekciju bolesnika sa KP u grupe sa različitim rizikom za progresiju bolesti. Dodatnu poteškoću činio je i nedostatak publikovanih podataka o kliničkim i histopatološkim karakteristikama udruženih sa genotipovima bolesnika koji bi mogli biti iskorišćeni za naknadnu uniformnu podelu bolesnika.

Jedina genetička varijanta za koju je u trenutku odabira za meta-analizu bilo publikovano tri ili više studija koje su se odnosile na potencijalnu asocijaciju sa rizikom za razvoj KP bila je rs2910164 locirana u genu *hsa-miR-146a*. Za navedenu genetičku varijantu identifikovano je ukupno 4 studije koje su podvrgnute proceni pogodnosti za uključivanje u meta-analizu, uključujući i našu studiju (100, 101, 131). Ukupno, 106 studija koje su se odnosile na asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih

tumora predstavljalo je rezultat pregleda literaturne baze podataka i referenci odabranih radova, kao i isključivanja studija koje nisu bile relevantne za temu istraživanja.

Pored očiglednih grešaka u prezentovanju rezultata, važan kriterijum za isključenje studija ili studijskih panela formiranih na osnovu različitih grupa bolesnika ili kontrola u okviru iste studije bio je i odstupanje distribucije genotipova rs2910164 od HWE. Odstupanja od HWE unosila su sumnju u kvalitet genotipizacije i tumačenja rezultata, kao i reprezentativnost kontrolne grupe što može biti posledica i načina njenog regrutovanja.

Među studijama i panelima isključenim iz meta-analize na osnovu ovog kriterijuma je i jedna studija koje su se odnosile na asocijaciju rs2910164 sa KP (101). Takođe, u jednoj studiji koja je uključivala bolesnike sa KP primećena su odstupanja u prezentaciji rezultata u tabelama i odeljku teksta koji se odnosio na rezultate, mada se navedena greška odnosila na grupu bolesnika sa drugim tipom malignog tumora (131).

Na značaj izračunavanja P vrednosti u testiranju odstupanja od HWE na osnovu rezultata genotipizacije ukazuje i odsustvo podataka o ovoj vrednosti u pojedinim studijama i panelima koji su isključeni iz meta-analize (101, 132, 133, 137-139). Za studije na osnovu kojih je formirano više studijskih panela sprovedeno je zasebno testiranje prisustva HWE u kontrolnoj grupi za svaki pojedinačni studijski panel koje je dovelo do isključenja pojedinih panela iz meta-analize na osnovu navedenog kriterijuma (132, 139). Takođe, primećeni su i pogrešni navodi o odsustvu statističke značajnosti u testu odstupanja od HWE koji su opovrgnuti naknadnim testiranjem, kao i navodi pogrešnih P vrednosti (101, 135, 136).

Od poslednje meta-analize sa istom temom istraživanja našu meta-analizu izdvaja i relativno veliki broj studija objavljenih u međuvremenu, a koje su smatrane adekvatnim za uključenje. Naime, nakon meta-analize *Ma-a* i saradnika (228) objavljene 2013. godine do otpočinjanja meta-analize u okviru ove doktorske disertacije publikovane su još 22 studije koje su se odnosile na potencijalnu asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj određenog tipa malignog tumora. Jedina meta-analiza koja se

odnosila na asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih tumora a koja je publikovana nakon studije *Ma*-a i saradnika (228) uključivala je samo rezultate iz velikih studija slučajeva i kontrola (229). Stoga rezultati navedene studije nisu uporedivi sa rezultatima *Ma*-a i saradnika (228), kao ni sa rezultatima meta-analize sprovedene u okviru ove disertacije.

Nakon isključivanja studija koje nisu ispunjavale sve kriterijume za uključivanje u meta-analizu, finalni rezultat procesa selekcije studija predstavljala je 61 studija sa 69 studijskih panela formiranih na osnovu prisustva više grupa bolesnika, više kontrolnih grupa, ili više grupa ispitanika različitog etničkog porekla ili iz različitog geografskog regiona. Razdvajanje rezultata studija na zasebne studijske panele predstavlja razliku u odnosu na prethodne meta-analize sa istom temom istraživanja. Ukupno 28359 bolesnika i 41678 kontrola uključeno je u meta-analizu u okviru ove disertacije.

Iako većina meta-analiza testira alelski model asocijacije, u okviru naše meta-analize testirano je više različitih genetičkih modela. Nije *a priori* izabran jedan genetički model asocijacije kako ne bi došlo do previda u smislu izostanka detektovanja asocijacije rs2910164 sa određenim tipom maligne bolesti usled ograničenja početne hipoteze na neadekvatni genetički model. Takođe, pretpostavljeno je da za različite tipove malignih tumora ne mora biti isti odgovarajući genetički model asocijacije rs2910164, s obzirom na razlike u molekularnim osnovama bolesti i velikom broju potencijalnih targeta miR-146a sa onkogenim ili tumor-supresorskim svojstvima.

U našoj meta-analizi nije pokazana asocijacija rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih bolesti. Međutim, u podgrupnim meta-analizama pokazana je asocijacija alela C sa smanjenim rizikom za razvoj karcinoma mokraćne bešike, grlića materice, jetre i skvamoznog karcinoma grla. S druge strane, za alel C ustanovljena je asocijacija sa povećanim rizikom za razvoj karcinoma pluća. Takođe, u testovima asocijacije navedene genetičke varijante sa nazofaringealnim karcinomom dobijena je statistička značajnost. Razlike u dobijenim rezultatima za različite tipove malignih bolesti, ne samo u smislu prisustva, odnosno odsustva statistički značajne asocijacije, već i u smislu alela koji povećava ili smanjuje rizik za razvoj bolesti mogu se objasniti

specifičnošću efekata analizirane genetičke varijante za tip malignog tumora. S druge strane, mali broj objavljenih studija sa relativno malim brojem učesnika koje su se odnosile na određene tipove malignih tumora može biti objašnjenje za odsustvo statistički značajne asocijacije rs2910164 sa rizikom za razvoj ovih malignih bolesti. Takođe, jedno od objašnjenja za izostanak statističke značajnosti u podgrupnoj meta-analizi može biti i različito etničko poreklo ispitanika.

U podgrupnim meta-analizama baziranim na etničkom poreklu učesnika u studijama nisu dobijene statističke značajnosti za asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih bolesti u azijskim i evropskim populacijama. S obzirom na to da studije slučajeva i kontrola koje su se odnosile na potencijalnu asocijaciju rs2910164 i rizik za razvoj malignih tumora nisu prethodno objavljene u populacijama afričkog porekla, za navedenu grupu nije mogla biti sprovedena podgrupna meta-analiza. Takođe, dalja podela studija i studijskih panela koje analiziraju određene tipove malignih tumora prema etničkom poreklu ispitanika nije pokazala značajne razlike u rezultatima koji odgovaraju evropskim i azijskim populacijama.

Iako ovi rezultati ne govore u prilog značaju razlika u etničkom poreklu na efekte rs2910164 u različitim populacijama, treba imati u vidu da stratifikacija na osnovu navedenog parametra nije bila moguća u grupama studija za sve analizirane maligne tumore. Naime, za asocijacije rs2910164 sa pojedinim malignim tumorima rezultati su dobijeni samo u azijskim populacijama. Takođe, broj studija i panela u svakoj od grupa dobijenih na osnovu navedene stratifikacije bio je mali, uobičajeno sa preovlađujućim rezultatima koje se odnose na populacije azijskog porekla. Ovakva geografska i etnička distribucija studija mogla bi imati uticaj i na rezultate sveukupne podgrupne meta-analize asocijacije rs2910164 sa malignim bolestima bazirane na etničkom poreklu ispitanika. Dakle, iako je ukupan broj studija i ispitanika uključenih u našu meta-analizu relativno veliki, podela u grupe na osnovu navedenog kriterijuma nije bila adekvatna za procenu značaja razlika u etničkom poreklu na rezultate studija asocijacije rs2910164 sa rizikom za razvoj specifičnih tipova malignih tumora, uključujući i KP.

Naime, u grupi studija koje analiziraju potencijalnu asocijaciju rs2910164 sa rizikom za razvoj KP samo su rezultati naše studije dobijeni u populaciji poreklom iz Evrope. Osim toga, u toku izrade meta-analize, izostavljena je studija *George-a* i saradnika zbog odstupanja od HWE u kontrolnoj grupi, dok preostale dve studije *Xu-a* i saradnika i *Parlayan-a* i saradnika nisu imale uniformni dizajn, usled različitog tipa i načina uključanja ispitanika u studiju, kao i različitog načina dijagnostikovanja KP (100, 101, 131).

Na genetičke razlike među populacijama upućuju i podaci o učestalostima alela rs2910164. Naime, u našoj studiji dobijeni su rezultati koji alel C karakterišu kao manje učestali alel navedene genetičke varijante. Ovi rezultati poklapaju se sa podacima iz baze *Ensembl* za evropske populacije. S druge strane, u većini studija u azijskim populacijama uključenih u našu meta-analizu alel C je učestaliji alel, što takođe odgovara podacima iz baze *Ensembl*. Na osnovu ovog podatka, rezultati analiza asocijacije tumačeni su prema različitim referentnim alelima i genotipovima, u zavisnosti od rezultata genotipizacije, što otežava njihovo međusobno poređenje. Osim toga, pojedine studije uključene u meta-analizu dale su rezultate suprotne od očekivanih distribucija alela i genotipova za populaciju u kojoj su sprovedene. Takođe, dve studije sa preklapajućom grupom autora koje su sprovedene u istom geografskom području, odnosno populaciji Severne Indije, u kojima su bolesnici regrutovani u istoj medicinskoj ustanovi, kao i sa sličnom brojnošću kontrolne grupe pokazale su sasvim suprotne učestalosti alela G i C (101, 133). Takođe, rezultati ove dve studije isključeni su iz meta-analize na osnovu odstupanja od HWE u kontrolnoj grupi. Iz prethodnih navoda proizilazi sumnja u tumačenje rezultata genotipizacije, usled karakteristične kombinacije alela G i C i mogućnost da je u pojedinim studijama navođen kao rezultat genotip ustanovljen na osnovu drugog lanca DNK, komplementarnog referentnom.

Podgrupna meta-analiza bazirana na veličini studijskih grupa nije pokazala statističku značajnost. S druge strane, kada su studije i studijski paneli grupisani na osnovu načina regrutovanja kontrolne grupe, u podgrupi studija za koje su kontrole regrutovane iz bolnica pokazana je asocijacija rs2910164 sa rizikom za razvoj malignih bolesti. Navedenih studija bilo je i više nego dvostruko u odnosu na broj studija sa

kontrolnom grupom regrutovanom iz opšte populacije, što može biti razlog za dostizanje praga statističke značajnosti povećanjem broja učesnika u navedenoj podgrupnoj meta-analizi. Međutim, detektovani efekti rs2910164 za koje je dobijena statistička značajnost bili su relativno mali.

Za grupu studija uključenu u meta-analizu procenjeno je prisustvo greške uzrokovane selektivnim publikovanjem pozitivnih rezultata. Testovi za procenu navedenog tipa greške sprovedeni su za sve analizirane genetičke modele i ni u jednom nije dobijena vizuelna niti statistička potvrda postojanja ovog tipa greške. Stoga, malo je verovatno da su statistički značajni rezultati proistekli iz meta-analize rezultat preferencijalnog publikovanja pozitivnih rezultata.

Svoj efekat na rezultate meta-analize mogu ispoljiti faktori koji potencijalno uslovljavaju i razlike između rezultata pojedinačnih studija koje se odnose na isti tip malignog tumora. Među ove faktore ubrajaju se razlike u načinu selekcije i regrutovanja bolesnika i kontrola (225). U pojedinim studijama bili su uključeni samo bolesnici i/ili kontrole određene starosti, bolesnici kod kojih je *post-mortem* detektovan određeni tip maligne bolesti, zatim bolesnici sa familijarnim tipom maligniteta, kao i ispitanici sa mutacijama u genima *BRCA1* (eng. *Breast Cancer Gene 1*, BRCA1) ili *BRCA2* (eng. *Breast Cancer Gene 2*, BRCA2). Rezultati studija sa navedenim karakteristikama dizajna samo delimično mogu biti upoređeni sa drugim studijama i mogu dovesti potencijalno do odsustva statističke značajnosti u kvantitativnoj sintezi podataka, pogotovo ukoliko podgrupna meta-analiza uključuje rezultate malog broja studija.

Rezultati ove doktorske disertacije govore u prilog asocijacije varijanti u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa sa KP. Doprinos efekata navedenih genetičkih varijanti pre svega se odnosi na rizik za progresiju bolesti. S druge strane, asocijacija sa rizikom za razvoj KP pokazana je po prvi put za varijantu u genu za miR-27a čija se uključenost u molekularnu osnovu ove bolesti vezuje za androgenu signalizaciju. Rezultati koji su se odnosili na druge analizirane varijante u genima za mikroRNK, a koji se razlikuju delimično od prethodno dobijenih u azijskim populacijama, ujedno predstavljaju prve dokaze o efektu navedenih genetičkih varijanti

na rizik za progresiju KP u populaciji evropskog porekla. Po prvi put pokazana je i asocijacija rs7813 u genu *GEMIN4* sa rizikom za progresiju KP u evropskoj populaciji, dok je asocijacija drugih varijanti u genima za proteine RISC analizirana jedino u okviru ove studije.

Navedene dosadašnje studije bazirale su se na analizi pojedinačnih nezavisnih efekata genetičkih varijanti i/ili haplotipova na rizik za razvoj i progresiju KP. Iz ograničenja ovakvog dizajna studija slučajeva i kontrola u detekciji značajnih zajedničkih efekata varijanti proističe naučna opravdanost sprovođenja analize epistatičkih interakcija u okviru ove disertacije. Navedena analiza odnosi se na statističke epistatičke interakcije genetičkih varijanti, a koje mogu odražavati i realne biološke epistaze i ukazala je na asocijaciju interakcije između tri genetičke varijante (rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2*, rs7813 u genu *GEMIN4*, kao i rs784567 u genu *TARBP2*) sa rizikom za progresiju bolesti.

S obzirom na mali broj dosadašnjih studija, veliki broj ustanovljenih novih asocijacija u okviru naše studije, kao i odstupanja u rezultatima, potrebno je izvršiti dodatne replikativne studije slučajeva i kontrola u cilju potvrde asocijacije varijanti u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa sa rizikom za razvoj i progresiju KP. Takođe, naša studija je jedina studija slučajeva i kontrola sa navedenom temom istraživanja koja je sprovedena u populaciji evropskog porekla, što ukazuje na potrebu za validacijom rezultata u drugim evropskim populacijama. Opravdanost za sprovođenje dodatnih validacionih studija proističe i iz meta-analize sprovedene u okviru ove disertacije, a koja je ukazala na razlike u dizajnu prethodnih i trenutne studije genetičke asocijacije sa KP. Takođe, s obzirom na to da ranije nije sprovedena analiza epistatičkih interakcija varijanti u genima za mikroRNK i proteine utišavajućeg kompleksa u kontekstu asocijacije sa KP, rezultati dobijeni u okviru ove disertacije zahtevaju potvrdu u dodatnim studijama odgovarajućeg dizajna.

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pružaju osnovu i za dalja istraživanja vezana za efekte genetičkih varijanti vezanih za biogenezu i ostvarivanje efektorskih aktivnosti mikroRNK molekula na rizik za razvoj i progresiju KP. Osim validacije i

replikacije rezultata ove disertacije, opravdan je i nastavak istraživanja u smislu analize efekata varijanti u drugim genima uključenim u navedene procese, kao i genima za nove kandidate mikroRNK sa potencijalno značajnom ulogom u molekularnoj osnovi KP.

6. Zaključci

1. Nije utvrđena asocijacija varijanti rs2910164, rs3746444 i rs11614913 u genima za miR-146a, miR-499, miR-196a2 i varijanti u analiziranim genima za proteine utišavajućeg kompleksa (*DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* i *GEMIN4*) sa rizikom za razvoj KP.
2. Za manje učestali alel C varijante rs895819 u genu za miR-27a ustanovljena je asocijacija sa povećanim rizikom za razvoj KP.
3. Utvrđena je asocijacija genetičke varijante rs2910164 u genu za miR-146a sa standardnim prognostičkim parametrima KP (Glison skorom, kliničkim stadijumom primarnog tumora i sa rizikom za pojavu udaljenih metastaza). Sa kliničkim stadijumom primarnog tumora i sa rizikom za pojavu udaljenih metastaza KP utvrđena je i asocijacija rs895819 u genu za miR-27a.
4. Za varijantu rs784567 u genu *TARBP2* ustanovljena je asocijacija sa inicijalnim serumskim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP, a za varijante rs3742330 u genu *DICER1* i rs4961280 u genu *AGO2* pokazana je asocijacija sa GS. Sa kliničkim stadijumom primarnog tumora utvrđena je asocijacija varijanti rs3742330 u genu *DICER1*, rs4961280 u genu *AGO2* i rs7813 u genu *GEMIN4*.
5. Utvrđena je asocijacija varijanti rs2910164 u genu *hsa-miR-146a*, rs3746444 u genu *hsa-miR-499* i rs895819 u genu za miR-27a sa rizikom za progresiju KP.
6. Za varijantu rs3742330 u genu *DICER1* pokazana je asocijacija sa rizikom za progresiju KP.
7. Nije pokazana statistički značajna asocijacija epistatičkih interakcija između ispitivanih varijanti sa rizikom za razvoj KP.
8. Pokazana je statistički značajna asocijacija epistatičkih interakcija između varijanti rs11614913 u genu *hsa-miR-196a2*, rs7813 u genu *GEMIN4* i rs784567 u genu *TARBP2* sa rizikom za progresiju KP.

9. Meta-analizom nije pokazana asocijacija rs2910164 u genu *hsa-miR-146a* sa rizikom za razvoj KP, ali je ustanovljena asocijacija sa rizikom za razvoj karcinoma mokraćne bešike, grlića materice, pluća, jetre, želuca, nazofaringealnog karcinoma i skvamoznog karcinoma grla.

7. Literatura

1. Eroschenko VP. Male Reproductive system. In: Eroschenko VP, editor. DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 12th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 477-504.
2. Pechkam M. Accessory sex glands. In: Pechkam M, editor. Histology at a Glance. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2011.
3. Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. Male Reproductive system. In: Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH, editors. Netter's Essential Histology. 2nd edition. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2013. p. 381-402.
4. Ross MH, Pawlina W. Male reproductive system. In: Ross MH, Pawlina W, editors. Histology: A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology. 5th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 728-71.
5. Oh WH, Hurwitz M, D'Amico AV, Richie JP, Kantoff PW. Neoplasms of the Prostate. Biology of Prostate Cancer. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, Frei E, editors. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton: BC Decker; 2003. Dostupno na URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13217/>
6. Petersen RO, Sesterhenn I, Davis CJ. Prostate. In: Petersen RO, Sesterhenn I, Davis CJ, editors. Urologic Pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p. 451-560.
7. Damjanov I. The Lower Urinary Tract and Male Reproductive System. In: Rubin R, Strayer DS, Rubin E, McDonald JM, editors. Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 745-79.
8. Cai T, Bjerklund Johansen TE, editors. Prostatitis and Its Management: Concepts and Recommendations for Clinical Practice. Heidelberg: Springer International Publishing; 2016. p. 3-26.
9. Nickel JC. Prostatitis. Can Urol Assoc J. 2011; 5(5): 306–15.
10. Turkes A, Griffiths K. Molecular Control of Prostatic Growth. In: Kirby RS, McConell JD, Fitzpatrick JM, Roehrborn CG, Boyle P, editors. Textbook of

- Benign Prostatic Hyperplasia. 2nd Edition. London: Taylor and Francis; 2006. p. 29-68.
11. de la Rosette J. Definitions: LUTS, BPH, BPE, BOO, BPO. In: Bachmann A, de la Rosette J, editors. Benign Prostatic Hyperplasia and Lower Urinary Tract Symptoms in Men. Oxford: Oxford University Press; 2011. p. 1-6.
 12. Duane Cespedes R. Pathophysiology of Bladder Outlet Obstruction and Voiding Dysfunction. In: Resnick MI, Thompson IM, editors. Advanced Therapy of Prostate Disease, Volume 1. Hamilton: B.C. Decker Inc.; 2000. p. 491-7.
 13. Ballentine Carter H. Benign Prostatic Hyperplasia. In: Ballentine Carter H, editor. Prostate Disorders 2007. Baltimore: Johns Hopkins Medicine; 2007. p. 2-26.
 14. Roerhborn CG. Benign Prostatic Hyperplasia: Etiology, Pathophysiology, Epidemiology, and Natural History. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. Campbell-Walsh Urology. Volume 2. 10th edition. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2011. p. 2570-610.
 15. Scher HI, Scardino PT, Zelefsky MJ. Chapter 68: Cancer of the Prostate. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 10th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2015. p. 932-80.
 16. Humphrey PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology* 2012; 60(Issue 1): 59–74.
 17. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359-86.
 18. Loeb S, Bjurlin MA, Nicholson J, Tammela TL, Penson DF, Carter HB, Carroll P, Etzioni R. Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer. *Eur Urol*. 2014; 65(6): 1046-55.
 19. Mühlberger N, Kurzthaler C, Iskandar R, Krahn MD, Bremner KE, Oberaigner W, Klocker H, Horninger W, Conrads-Frank A, Sroczynski G, Siebert U. The ONCOTYROL Prostate Cancer Outcome and Policy Model: Effect of Prevalence Assumptions on the Benefit-Harm Balance of Screening. *Med Decis Making*. 2015; 35(6): 758-72.

20. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(1): 5-29.
21. Institut za zaštitu zdravlja Srbije “ Dr Milan Jovanović- Batut”. Registar za rak u Centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji 2003. Izveštaj br. 5. Beograd: Institut za zaštitu zdravlja Srbije “ Dr Milan Jovanović-Batut”; 2003. Dostupno na URL: <http://www.batut.org.rs/> Pristupljeno: 27. juna, 2016.
22. Institut za zaštitu zdravlja Srbije “ Dr Milan Jovanović- Batut”. Registar za rak u Centralnoj Srbiji. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji 2013. Izveštaj br. 15. Beograd: Institut za zaštitu zdravlja Srbije “ Dr Milan Jovanović-Batut”; 2013. Dostupno na URL: <http://www.batut.org.rs/> Pristupljeno: 27. juna, 2016.
23. Li J, German R, King J, Joseph D, Thompson T, Wu XC, Ajani U, Tai E. Recent trends in prostate cancer testing and incidence among men under age of 50. *Cancer Epidemiol.* 2012; 36(2): 122-7.
24. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol.* 2012; 4: 1-11.
25. Stangelberger A, Waldert M, Djavan B. Prostate cancer in elderly men. *Rev Urol.* 2008; 10(2): 111-9.
26. Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology.* 2003; 62(6 Suppl 1): 3-12.
27. Grönberg H, Damber L, Damber JE. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol.* 1994; 152(5 Pt 1): 1484-7.
28. Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, Walsh P. Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins. *Prostate.* 1997; 33(4): 240-5.
29. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000; 343(2): 78-85.
30. Madersbacher S, Alcaraz A, Emberton M, Hammerer P, Ponholzer A, Schröder FH, Tubaro A. The influence of family history on prostate cancer risk: implications for clinical management. *BJU Int.* 2011; 107(5): 716-21.

31. Nwosu V, Carpten J, Trent JM, Sheridan R. Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(20): 2313-8.
32. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol.* 1993; 150(3): 797-802.
33. Potter SR, Partin AW. Hereditary and familial prostate cancer: biologic aggressiveness and recurrence. *Rev Urol.* 2000; 2(1): 35-6.
34. Hemminki K, Försti A, Chen B. Breast and prostate cancer: familial associations. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(7): 523.
35. Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(3): 205-12.
36. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet.* 2003; 361(9360): 859-64.
37. Mazaris E, Tsiotras A. Molecular pathways in prostate cancer. *Nephrourol Mon.* 2013; 5(3): 792-800.
38. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, Mason M, Matveev V, Wiegel T, Zattoni F, Mottet N; European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol.* 2014; 65(1): 124-37.
39. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(4): 268-78.
40. Greene KL, Albertsen PC, Babaian RJ, Carter HB, Gann PH, Han M, Kuban DA, Sartor AO, Stanford JL, Zietman A, Carroll P; American Urological Association. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol.* 2009; 182(5): 2232-41.
41. Roobol MJ. The prostate-specific antigen test. *Expert Opin Med Diagn.* 2013; 7(5): 423-6.
42. Van der Meer S, Löwik SA, Hirdes WH, Nijman RM, Van der Meer K, Hoekstra-Weebers JE, Blanker MH. Prostate specific antigen testing policy worldwide varies greatly and seems not to be in accordance with guidelines: a systematic review. *BMC Fam Pract.* 2012; 13: 100.

43. Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med.* 2012; 4(127): 127rv3.
44. Cerović S. Parametri agresivnosti karcinoma prostate. In: Cerović S, Brajušković G, Vukotić V, eds. *Premaligne Lezije i Karcinom Prostate.* Beograd: IP Beograd d.o.o.; 2009. pp. 8-22.
45. Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008; 5(10): 588-99.
46. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, Fossati N, Gross T, Henry AM, Joniau S, Lam TB, Mason MD, Matveev VB, Moldovan PC, van den Bergh RC, Van den Broeck T, van der Poel HG, van der Kwast TH, Rouvière O, Schoots IG, Wiegel T, Cornford P. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2016. pii: S0302-2838(16)30470-5.
47. Buhmeida A, Pyrhönen S, Laato M, Collan Y. Prognostic factors in prostate cancer. *Diagnostic Pathology* 2006; 1: 4.
48. Mottet N, Bellmunt J, Briers E, Bolla M, Cornford P, De Santis M, Henry A, Joniau S, Lam T, Mason MD, Matveev V, van der Poel H, van der Kwast TH, Rouvière O, Wiegel T, van der Bergh RCN, van den Broeck T, van Casteren NJ, Everaerts W, Marconi L, Moldovan P. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. European Association of Urology, 2016. Dostupno na URL: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Prostate-Cancer-2016.pdf>
49. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.* 2016; 40(2): 244-52.
50. Shah RB, Zhou M. Recent advances in prostate cancer pathology: Gleason grading and beyond. *Pathol Int.* 2016; 66(5): 260-72.
51. Goh CL, Eeles RA. Germline genetic variants associated with prostate cancer and potential relevance to clinical practice. In: Cuzick J, Thorat MA, editors.

- Prostate Cancer Prevention. Heidelberg : Springer; 2014. p. 9-26. (Recent Results in Cancer Research; vol 202).
52. Boyd LK, Mao X, Lu YJ. The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity. *Nat Rev Urol.* 2012; 9(11):652-64.
 53. Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW, Culig Z, Grönberg H, Luo J, Visakorpi T, Rubin MA. The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol.* 2013; 64(4): 567-76.
 54. Chiam K, Ricciardelli C, Bianco-Miotto T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: Current and future uses. *Cancer Lett.* 2014; 342(2): 248-56.
 55. Alberti C. Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2010; 14(1):31-41.
 56. Chen R, Ren S, Sun Y. Genome-wide association studies on prostate cancer: the end or the beginning? *Protein Cell.* 2013; 4(9): 677-86.
 57. Cartwright R, Mangera A, Tikkinen KA, Rajan P, Pesonen J, Kirby AC, Thiagamorthy G, Ambrose C, Gonzalez-Maffe J, Bennett PR, Palmer T, Walley A, Järvelin MR, Khullar V, Chapple C. Systematic review and meta-analysis of candidate gene association studies of lower urinary tract symptoms in men. *Eur Urol.* 2014; 66(4): 752-68.
 58. Hood L, Rowen L. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome Med.* 2013; 5(9): 79.
 59. Shen H. Progress of cancer genomics. *Thorac Cancer.* 2015; 6(5): 557-60.
 60. Sullivan J, Kopp R, Stratton K, Manschreck C, Corines M, Rau-Murthy R, Hayes J, Lincon A, Ashraf A, Thomas T, Schrader K, Gallagher D, Hamilton R, Scher H, Lilja H, Scardino P, Eastham J, Offit K, Vijai J, Klein RJ. An analysis of the association between prostate cancer risk loci, PSA levels, disease aggressiveness and disease-specific mortality. *Br J Cancer.* 2015; 113(1):166-72.
 61. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti DV, Schumacher F, Han Y, Benlloch S, Hazelett DJ, Wang Z, Saunders E, Leongamornlert D, Lindstrom S, Jugurnauth-Little S, Dadaev T, Tymrakiewicz M, Stram DO, Rand K, Wan P, Stram A, Sheng X, Pooler LC, Park K, Xia L, Tyrer J, Kolonel LN, Le Marchand L, Hoover RN, Machiela MJ, Yeager M, Burdette L, Chung CC,

Hutchinson A, Yu K, Goh C, Ahmed M, Govindasami K, Guy M, Tammela TL, Auvinen A, Wahlfors T, Schleutker J, Visakorpi T, Leinonen KA, Xu J, Aly M, Donovan J, Travis RC, Key TJ, Siddiq A, Canzian F, Khaw KT, Takahashi A, Kubo M, Pharoah P, Pashayan N, Weischer M, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Klarskov P, Røder MA, Iversen P, Thibodeau SN, McDonnell SK, Schaid DJ, Stanford JL, Kolb S, Holt S, Knudsen B, Coll AH, Gapstur SM, Diver WR, Stevens VL, Maier C, Luedeke M, Herkommer K, Rinckleb AE, Strom SS, Pettaway C, Yeboah ED, Tettey Y, Biritwum RB, Adjei AA, Tay E, Truelove A, Niwa S, Chokkalingam AP, Cannon-Albright L, Cybulski C, Wokołorczyk D, Kluźniak W, Park J, Sellers T, Lin HY, Isaacs WB, Partin AW, Brenner H, Dieffenbach AK, Stegmaier C, Chen C, Giovannucci EL, Ma J, Stampfer M, Penney KL, Mucci L, John EM, Ingles SA, Kittles RA, Murphy AB, Pandha H, Michael A, Kierzek AM, Blot W, Signorello LB, Zheng W, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Nemesure B, Carpten J, Leske C, Wu SY, Hennis A, Kibel AS, Rybicki BA, Neslund-Dudas C, Hsing AW, Chu L, Goodman PJ, Klein EA, Zheng SL, Batra J, Clements J, Spurdle A, Teixeira MR, Paulo P, Maia S, Slavov C, Kaneva R, Mitev V, Witte JS, Casey G, Gillanders EM, Seminara D, Riboli E, Hamdy FC, Coetzee GA, Li Q, Freedman ML, Hunter DJ, Muir K, Gronberg H, Neal DE, Southey M, Giles GG, Severi G; Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3); PRACTICAL (Prostate Cancer Association Group to Investigate Cancer-Associated Alterations in the Genome) Consortium; COGS (Collaborative Oncological Gene-environment Study) Consortium; GAME-ON/ELLIPSE Consortium, Cook MB, Nakagawa H, Wiklund F, Kraft P, Chanock SJ, Henderson BE, Easton DF, Eeles RA, Haiman CA. A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet.* 2014; 46(10):1103-9. doi: 10.1038/ng.3094.

62. Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, Rafnar T, Bergthorsson JT, Agnarsson BA, Baker A, Sigurdsson A, Benediktsdottir KR, Jakobsdottir M, Xu J, Blondal T, Kostic J, Sun J, Ghosh S, Stacey SN, Mouy M, Saemundsdottir J, Backman VM, Kristjansson K, Tres A, Partin AW, Albers-Akkers MT, Godino-Ivan Marcos J, Walsh PC, Swinkels DW, Navarrete S, Isaacs SD, Aben KK, Graif T, Cashy J, Ruiz-Echarri M,

- Wiley KE, Suarez BK, Witjes JA, Frigge M, Ober C, Jonsson E, Einarsson GV, Mayordomo JI, Kiemeny LA, Isaacs WB, Catalona WJ, Barkardottir RB, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet.* 2007; 39(5):631-7.
63. Haiman CA, Patterson N, Freedman ML, Myers SR, Pike MC, Waliszewska A, Neubauer J, Tandon A, Schirmer C, McDonald GJ, Greenway SC, Stram DO, Le Marchand L, Kolonel LN, Frasco M, Wong D, Pooler LC, Ardlie K, Oakley-Girvan I, Whittemore AS, Cooney KA, John EM, Ingles SA, Altshuler D, Henderson BE, Reich D. Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer. *Nat Genet.* 2007; 39(5):638-44.
64. Yeager M, Orr N, Hayes RB, Jacobs KB, Kraft P, Wacholder S, Minichiello MJ, Fearnhead P, Yu K, Chatterjee N, Wang Z, Welch R, Staats BJ, Calle EE, Feigelson HS, Thun MJ, Rodriguez C, Albanes D, Virtamo J, Weinstein S, Schumacher FR, Giovannucci E, Willett WC, Cancel-Tassin G, Cussenot O, Valeri A, Andriole GL, Gelmann EP, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover R, Hunter DJ, Chanock SJ, Thomas G. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet.* 2007; 39(5):645-9.
65. Schierding W, Cutfield WS, O'Sullivan JM. The missing story behind Genome Wide Association Studies: single nucleotide polymorphisms in gene deserts have a story to tell. *Front Genet.* 2014; 5: 39.
66. Wasserman NF, Aneas I, Nobrega MA. An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a MYC enhancer. *Genome Res.* 2010; 20(9): 1191-7.
67. Huppi K, Pitt JJ, Wahlberg BM, Caplen NJ. The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. *Front Genet.* 2012; 3: 69.
68. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Brajušković G. Genetic Association Studies on Prostate Cancer. In: Mohan R, editor. *Prostate Cancer - Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments.* Rijeka: InTECH; 2016. p. 145-77.
69. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 2006; 11: 1388-413.

70. Dianat SS, Margreiter M, Eckersberger E, Finkelstein J, Kuehas F, Herwig R, Ayati M, Lepor H, Djavan B. Gene polymorphisms and prostate cancer: the evidence. *BJU Int.* 2009; 104(11): 1560-72.
71. Sissung TM, Price DK, Del Re M, Ley AM, Giovannetti E, Figg WD, Danesi R. Genetic variation: effect on prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1846(2): 446-56.
72. Chang CQ, Yesupriya A, Rowell JL, Pimentel CB, Clyne M, Gwinn M, Khoury MJ, Wulf A, Schully SD. A systematic review of cancer GWAS and candidate gene meta-analyses reveals limited overlap but similar effect sizes. *Eur J Hum Genet.* 2014; 22(3): 402-8.
73. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(1): 8-21.
74. Holoch D, Moazed D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2015; 16(2): 71-84.
75. Morris KV, Mattick JS. The rise of regulatory RNA. *Nat Rev Genet.* 2014; 15(6): 423-37.
76. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys.* 2013; 42: 217-39.
77. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(8): 509-24.
78. Dhir A, Dhir S, Proudfoot NJ, Jopling CL. Microprocessor mediates transcriptional termination of long noncoding RNA transcripts hosting microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2015; 22(4): 319-27.
79. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(3): 228-34.
80. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15(6): 321-33.
81. Mah SM, Buske C, Humphries RK, Kuchenbauer F. miRNA*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010; 20(2): 141-8.

82. Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet.* 2013; 14(7): 447-59.
83. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005; 123(4): 631-40.
84. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002; 16(6): 720-8.
85. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(4): 271-82.
86. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Acquafondata M, McHale T, Sobol RW, Dhir R. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 2006; 169(5): 1812-20.
87. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007; 67(13): 6130-5.
88. Fu X, Xue C, Huang Y, Xie Y, Li Y. The activity and expression of microRNAs in prostate cancers. *Mol Biosyst.* 2010; 6(12): 2561-72.
89. Walter BA, Valera VA, Pinto PA, Merino MJ. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *J Cancer.* 2013; 4(5): 350-7.
90. Kim WT, Kim WJ. MicroRNAs in prostate cancer. *Prostate Int.* 2013; 1(1): 3-9.
91. Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, Ramalinga M, Chijioke J, Marian C, Oermann EK, Uhm S, Kim JS, Chen LN, Li X, Berry DL, Kallakury BV, Chauhan SC, Collins SP, Suy S, Kumar D. MicroRNA profiling in prostate cancer - the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. *PLoS One.* 2013; 8(10): e76994.
92. Bian XJ, Zhang GM, Gu CY, Cai Y, Wang CF, Shen YJ, Zhu Y, Zhang HL, Dai B, Ye DW. Down-regulation of Dicer and Ago2 is associated with cell proliferation and apoptosis in prostate cancer. *Tumour Biol.* 2014; 35(11): 11571-8.
93. Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Kurozumi A, Kato M, Enokida H, Matsushita R, Yamazaki K, Ishida Y, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N.

- MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. *Br J Cancer*. 2015; 113(7): 1055-65.
94. Hata A, Lieberman J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. *Sci Signal*. 2015; 8(368): re3.
95. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28(3-4): 369-78.
96. Gill BS, Alex JM, Navgeet, Kumar S. Missing link between microRNA and prostate cancer. *Tumour Biol*. 2016; 37(5): 5683-704.
97. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(3):399-416.
98. Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA* 2009; 15:1640-51.
99. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature Reviews Cancer* 2010; 10:389-402.
100. Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, Tong N, Wang JF, Song NH, Zhang W, Hua LX, Wu HF. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate*. 2010; 70(5):467-72.
101. George GP, Gangwar R, Mandal RK, Sankhwar SN, Mittal RD. Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(3):1609-15.
102. Chen C, Yang S, Chaugai S, Wang Y, Wang DW. Meta-analysis of Hsa-mir-499 polymorphism (rs3746444) for cancer risk: evidence from 31 case-control studies. *BMC Med Genet*. 2014; 15: 126.
103. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA*. 2008; 14(3): 417-24.
104. Sun Q, Zhao X, Liu X, Wang Y, Huang J, Jiang B, Chen Q, Yu J. miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *Prostate*. 2014; 74(16): 1613-21.

105. Xu B, Huang Y, Niu X, Tao T, Jiang L, Tong N, Chen S, Liu N, Zhu W, Chen M. Hsa-miR-146a-5p modulates androgen-independent prostate cancer cells apoptosis by targeting ROCK1. *Prostate*. 2015; 75(16): 1896-903.
106. Xu B, Wang N, Wang X, Tong N, Shao N, Tao J, Li P, Niu X, Feng N, Zhang L, Hua L, Wang Z, Chen M. MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 2012; 72(11): 1171-8.
107. Ambros S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, Wallace TA, Liu CG, Volinia S, Calin GA, Yfantis HG, Stephens RM, Croce CM. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008; 68(15): 6162-70.
108. Fletcher CE, Dart DA, Sita-Lumsden A, Cheng H, Rennie PS, Bevan CL. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Hum Mol Genet*. 2012; 21(14): 3112-27.
109. Bai RP, Weng Y, Su LL, Jin MJ, Xu ZP, Lu LQ, Chen GD. Association of a pre-miR-27a polymorphism with cancer risk: an updated meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(23): 10107-14.
110. Liu J, Liu J, Wei M, He Y, Liao B, Liao G, Li H, Huang J. Genetic variants in the microRNA machinery gene GEMIN4 are associated with risk of prostate cancer: a case-control study of the Chinese Han population. *DNA Cell Biol*. 2012; 31(7): 1296-302.
111. Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, White BC. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol*. 2006; 241(2): 252-61.
112. Wei WH, Hemani G, Haley CS (2014) Detecting epistasis in human complex traits. *Nat Rev Genet*. 15(11):722-733.
113. Moore JH, Williams SM. Traversing the conceptual divide between biological and statistical epistasis: systems biology and a more modern synthesis. *Bioessays*. 2005; 27(6): 637-46.
114. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz B, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A.

- Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *JAMA* 1998; 280(11): 969-74.
115. Medeiros RM, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Ferreira P, Lopes C. Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11): 3433-7.
 116. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
 117. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, Zeng Y, Miao R, Jin G, Ma H, Chen Y, Shen H. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*. 2008; 118(7): 2600-8.
 118. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115.
 119. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 2007; 8(6): 597-608.
 120. Qi JH, Wang J, Chen J, Shen F, Huang JT, Sen S, Zhou X, Liu SM. High-resolution melting analysis reveals genetic polymorphisms in MicroRNAs confer hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients. *BMC Cancer*. 2014; 14: 643.
 121. You FM, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, Lazo GR, Dvorak J, Anderson OD. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9: 253.
 122. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPstats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22(15): 1928-9.
 123. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc*. 2011; 6(2): 121-33.

124. Akaike H. Akaike's Information Criterion. In: Lovrić M, editor. International Encyclopedia of Statistical Science. International Encyclopedia of Statistical Science. Berlin: Springer; 2011. p. 25.
125. Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, Turgwell P. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality if nonrandomized studies in meta-analyses. Dostupno na URL: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm [pristupljeno 06.07.2016.].
126. Wallace BC, Dahabreh IJ, Trikalinos TA, Lau J, Trow P, Schmid CH. Closing the Gap between Methodologists and End-Users: R as a Computational Back-End. *Journal of Statistical Software* 2012; 49(5): 1-15.
127. Der Simonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986; 7: 177-88.
128. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*. 1997; 315(7109): 629-34.
129. Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, Wu X. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008; 1(6): 460-9.
130. Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Al-Hazzani AA, Alsaif MA, Alsaif AA. Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients. *PLoS One*. 2012; 7(2): e30049.
131. Parlayan C, Ikeda S, Sato N, Sawabe M, Muramatsu M, Arai T. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in miR-146a and miR-196a2 on the prevalence of cancer in elderly Japanese: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(5): 2101-7.
132. Catucci I, Yang R, Verderio P, Pizzamiglio S, Heesen L, Hemminki K, Sutter C, Wappenschmidt B, Dick M, Arnold N, Bugert P, Niederacher D, Meindl A, Schmutzler RK, Bartram CC, Ficarazzi F, Tizzoni L, Zaffaroni D, Manoukian S, Barile M, Pierotti MA, Radice P, Burwinkel B, Peterlongo P. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum Mutat*. 2010; 31(1): E1052-7.

133. Mittal RD, Gangwar R, George GP, Mittal T, Kapoor R. Investigative role of pre-microRNAs in bladder cancer patients: a case-control study in North India. *DNA Cell Biol.* 2011; 30(6): 401-6.
134. Zhang XW, Pan SD, Feng YL, Liu JB, Dong J, Zhang YX, Chen JG, Hu ZB, Shen HB. Relationship between genetic polymorphism in microRNAs precursor and genetic predisposition of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2011; 45(3): 239-43.
135. Esteban Cardeñosa E, de Juan Jiménez I, Palanca Suela S, Chirivella González I, Segura Huerta A, Santaballa Beltran A, Casals El Busto M, Barragán González E, Fuster Lluch O, Bermúdez Edo J, Bolufer Gilabert P. Low penetrance alleles as risk modifiers in familial and sporadic breast cancer. *Fam Cancer.* 2012; 11(4): 629-36.
136. Shan YF, Huang YH, Chen ZK, Huang KT, Zhou MT, Shi HQ, Song QT, Yu ZP, Deng AM, Zhang QY. miR-499A>G rs3746444 and miR-146aG>C expression and hepatocellular carcinoma risk in the Chinese population. *Genet Mol Res.* 2013; 12(4): 5365-71.
137. Yamashita J, Iwakiri T, Fukushima S, Jinnin M, Miyashita A, Hamasaki T, Makino T, Aoi J, Masuguchi S, Inoue Y, Ihn H. The rs2910164 G>C polymorphism in microRNA-146a is associated with the incidence of malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2013; 23(1): 13-20.
138. Omrani M, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Hasani SS, Mashhadi MA, Arbabi F, Taheri M. hsa-mir-499 rs3746444 gene polymorphism is associated with susceptibility to breast cancer in an Iranian population. *Biomark Med.* 2014; 8(2): 259-67.
139. Palmieri A, Carinci F, Martinelli M, Pezzetti F, Girardi A, Cura F, Rubini C, Scapoli L. Role of the MIR146A polymorphism in the origin and progression of oral squamous cell carcinoma. *Eur J Oral Sci.* 2014; 122(3): 198-201.
140. Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, Villa C, Comi C, Monaco F, Mellesi L, Valzelli S, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E. Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2011; 504: 9–12.

141. Zhou B, Dong LP, Jing XY, Li JS, Yang SJ, Wang JP, Zhao LF. Association between miR-146aG>C and miR-196a2C>T polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Tumour Biol.* 2014; 35(8): 7775-80.
142. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(20): 7269-74.
143. Okubo M, Tahara T, Shibata T, Yamashita H, Nakamura M, Yoshioka D, Yonemura J, Ishizuka T, Arisawa T, Hirata I. Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population. *Helicobacter.* 2010; 15(6): 524-31.
144. Lung RW, Wang X, Tong JH, Chau SL, Lau KM, Cheng SH, Woo JK, Woo J, Leung PC, Ng MH, Tang NL, To KF. A single nucleotide polymorphism in microRNA-146a is associated with the risk for nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog.* 2013; 52 Suppl 1: E28-38.
145. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, Lin J, Habuchi T, Wu X. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(23): 7956-62.
146. Xu T, Zhu Y, Wei QK, Yuan Y, Zhou F, Ge YY, Yang JR, Su H, Zhuang SM. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 2008; 29(11): 2126-31.
147. Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res.* 2008; 68(7): 2530-7.
148. Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, Zhang Y, Paranjape T, Zhu Y. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res.* 2009; 69(14): 5970-7.
149. Hu Z, Liang J, Wang Z, Tian T, Zhou X, Chen J, Miao R, Wang Y, Wang X, Shen H. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated

- with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum Mutat.* 2009; 30(1): 79-84.
150. Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, Jin G, Liang J, Liu P, Zhou X, Miao R, Ma H, Chen Y, Shen H. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(4): 1183-7.
151. Guo H, Wang K, Xiong G, Hu H, Wang D, Xu X, Guan X, Yang K, Bai Y. A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Fam Cancer.* 2010; 9(4): 599-603.
152. Liu Z, Li G, Wei S, Niu J, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2010; 116(20): 4753-60.
153. Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R. Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis.* 2010; 31(12): 2124-6.
154. Srivastava K, Srivastava A, Mittal B. Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of gallbladder cancer in North Indian population. *J Hum Genet.* 2010; 55(8): 495-9.
155. Zeng Y, Sun QM, Liu NN, Dong GH, Chen J, Yang L, Wang B. Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(28): 3578-83.
156. Akkız H, Bayram S, Bekar A, Akgöllü E, Usküdar O, Sandıkçı M. No association of pre-microRNA-146a rs2910164 polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish population: a case-control study. *Gene.* 2011; 486(1-2): 104-9.
157. Garcia AI, Cox DG, Barjhoux L, Verny-Pierre C, Barnes D; Gemo Study Collaborators, Antoniou AC, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM, Mazoyer S. The rs2910164:G>C SNP in the MIR146A gene is not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Hum Mutat.* 2011; 32(9): 1004-7.

158. Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Naito M, Wakai K, Tajima K, Hamajima N. Combined effect of miR-146a rs2910164 G/C polymorphism and Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism on the risk of severe gastric atrophy in Japanese. *Dig Dis Sci.* 2011; 56(4): 1131-7.
159. Permeth-Wey J, Thompson RC, Burton Nabors L, Olson JJ, Browning JE, Madden MH, Ann Chen Y, Egan KM. A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma. *J Neurooncol.* 2011; 105(3): 639-46.
160. Vinci S, Gelmini S, Pratesi N, Conti S, Malentacchi F, Simi L, Pazzagli M, Orlando C. Genetic variants in miR-146a, miR-149, miR-196a2, miR-499 and their influence on relative expression in lung cancers. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49(12): 2073-80.
161. Yue C, Wang M, Ding B, Wang W, Fu S, Zhou D, Zhang Z, Han S. Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population. *Gynecol Oncol.* 2011; 122(1): 33-7.
162. Zhou B, Wang K, Wang Y, Xi M, Zhang Z, Song Y, Zhang L. Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs and risk of cervical squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog.* 2011; 50(7): 499-505.
163. Chu YH, Tzeng SL, Lin CW, Chien MH, Chen MK, Yang SF. Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39777.
164. Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Redova M, Vasku A, Svoboda M, Radova L, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(22): 2827-31.
165. Jones AM, Howarth KM, Martin L, Gorman M, Mihai R, Moss L, Auton A, Lemon C, Mehanna H, Mohan H, Clarke SE, Wadsley J, Macias E, Coatesworth A, Beasley M, Roques T, Martin C, Ryan P, Gerrard G, Power D, Bremner C; TCUKIN Consortium, Tomlinson I, Carvajal-Carmona LG. Thyroid cancer susceptibility polymorphisms: confirmation of loci on chromosomes 9q22 and 14q13, validation of a recessive 8q24 locus and failure to replicate a locus on 5q24. *J Med Genet.* 2012; 49(3): 158-63.

166. Kim WH, Min KT, Jeon YJ, Kwon CI, Ko KH, Park PW, Hong SP, Rim KS, Kwon SW, Hwang SG, Kim NK. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population. *Gene*. 2012; 504(1): 92-7.
167. Mihalache F, Hoblinger A, Acalovschi M, Sauerbruch T, Lammert F, Zimmer V. A common variant in the precursor miR-146a sequence does not predispose to cholangiocarcinoma in a large European cohort. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2012; 11(4): 412-7.
168. Min KT, Kim JW, Jeon YJ, Jang MJ, Chong SY, Oh D, Kim NK. Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. *Mol Carcinog*. 2012; 51 Suppl 1: E65-73.
169. Wang M, Chu H, Li P, Yuan L, Fu G, Ma L, Shi D, Zhong D, Tong N, Qin C, Yin C, Zhang Z. Genetic variants in miRNAs predict bladder cancer risk and recurrence. *Cancer Res*. 2012; 72(23): 6173-82.
170. Xiang Y, Fan S, Cao J, Huang S, Zhang LP. Association of the microRNA-499 variants with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(6): 7019-23.
171. Zhou J, Lv R, Song X, Li D, Hu X, Ying B, Wei Y, Wang L. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population. *DNA Cell Biol*. 2012; 31(4): 524-30.
172. Zhou F, Zhu H, Luo D, Wang M, Dong X, Hong Y, Lu B, Zhou Y, Zhou J, Zhang Z, Gong W. A functional polymorphism in Pre-miR-146a is associated with susceptibility to gastric cancer in a Chinese population. *DNA Cell Biol*. 2012; 31(7): 1290-5.
173. Ahn DH, Rah H, Choi YK, Jeon YJ, Min KT, Kwack K, Hong SP, Hwang SG, Kim NK. Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. *Mol Carcinog*. 2013; 52 Suppl 1: E39-51.
174. Chae YS, Kim JG, Lee SJ, Kang BW, Lee YJ, Park JY, Jeon HS, Park JS, Choi GS. A miR-146a polymorphism (rs2910164) predicts risk of and survival from colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2013; 33(8): 3233-9.

175. Lv M, Dong W, Li L, Zhang L, Su X, Wang L, Gao L, Zhang L. Association between genetic variants in pre-miRNA and colorectal cancer risk in a Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013; 139(8): 1405-10.
176. Ma L, Zhu L, Gu D, Chu H, Tong N, Chen J, Zhang Z, Wang M. A genetic variant in miR-146a modifies colorectal cancer susceptibility in a Chinese population. *Arch Toxicol*. 2013; 87(5): 825-33.
177. Marino M, Cirello V, Gnarini V, Colombo C, Pignatti E, Casarini L, Diazzi C, Rochira V, Cioni K, Madeo B, Carani C, Simoni M, Fugazzola L. Are pre-miR-146a and PTTG1 associated with papillary thyroid cancer? *Endocr Connect*. 2013; 2(4): 178-85.
178. Orsós Z, Szanyi I, Csejtei A, Gerlinger I, Ember I, Kiss I. Association of pre-miR-146a rs2910164 polymorphism with the risk of head and neck cancer. *Anticancer Res*. 2013; 33(1): 341-6.
179. Pavlakis E, Papaconstantinou I, Gazouli M, Theodosopoulos T, Karamanolis G, Genatas K, Ladas SD. MicroRNA gene polymorphisms in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2013; 13(3): 273-8.
180. Song X, Sturgis EM, Liu J, Jin L, Wang Z, Zhang C, Wei Q, Li G. MicroRNA variants increase the risk of HPV-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never smokers. *PLoS One*. 2013; 8(2): e56622.
181. Vinci S, Gelmini S, Mancini I, Malentacchi F, Pazzagli M, Beltrami C, Pinzani P, Orlando C. Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. *Methods*. 2013; 59(1): 138-46.
182. Wei WJ, Wang YL, Li DS, Wang Y, Wang XF, Zhu YX, Yang YJ, Wang ZY, Ma YY, Wu Y, Jin L, Ji QH, Wang JC. Association between the rs2910164 polymorphism in pre-Mir-146a sequence and thyroid carcinogenesis. *PLoS One*. 2013; 8(2): e56638.
183. Wei J, Zheng L, Liu S, Yin J, Wang L, Wang X, Shi Y, Shao A, Tang W, Ding G, Liu C, Chen S, Gu H. MiR-196a2 rs11614913 T > C polymorphism and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Hum Immunol*. 2013; 74(9): 1199-205.
184. Zhang J, Wang R, Ma YY, Chen LQ, Jin BH, Yu H, Wang JC, Gao CF, Liu J. Association between single nucleotide polymorphisms in miRNA196a-2

- and miRNA146a and susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(11): 6427-31.
185. Chu YH, Hsieh MJ, Chiou HL, Liou YS, Yang CC, Yang SF, Kuo WH. MicroRNA gene polymorphisms and environmental factors increase patient susceptibility to hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014; 9(2): e89930.
186. Cong N, Chen H, Bu WZ, Li JP, Liu N, Song JL. miR-146a G>C polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Tumour Biol.* 2014; 35(6): 5669-73.
187. Dikeakos P, Theodoropoulos G, Rizos S, Tzanakis N, Zografos G, Gazouli M. Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, and miR-196a2T>C polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Greek population. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(2): 1075-80.
188. Du M, Lu D, Wang Q, Chu H, Tong N, Pan X, Qin C, Yin C, Wang M, Zhang Z. Genetic variations in microRNAs and the risk and survival of renal cell cancer. *Carcinogenesis.* 2014; 35(7): 1629-35.
189. Hu X, Li L, Shang M, Zhou J, Song X, Lu X, Wang J, Ying B, Wang L. Association between microRNA genetic variants and susceptibility to colorectal cancer in Chinese population. *Tumour Biol.* 2014; 35(3): 2151-6.
190. Huang GL, Chen ML, Li YZ, Lu Y, Pu XX, He YX, Tang SY, Che H, Zou Y, Ding C, He Z. Association of miR-146a gene polymorphism with risk of nasopharyngeal carcinoma in the central-southern Chinese population. *J Hum Genet.* 2014; 59(3): 141-4.
191. Jeon HS, Lee YH, Lee SY, Jang JA, Choi YY, Yoo SS, Lee WK, Choi JE, Son JW, Kang YM, Park JY. A common polymorphism in pre-microRNA-146a is associated with lung cancer risk in a Korean population. *Gene.* 2014; 534(1): 66-71.
192. Jia Y, Zang A, Shang Y, Yang H, Song Z, Wang Z, Ren L, Wei Y, Hu L, Shi H, Li H. MicroRNA-146a rs2910164 polymorphism is associated with susceptibility to non-small cell lung cancer in the Chinese population. *Med Oncol.* 2014; 31(10): 194.
193. Kupcinskis J, Wex T, Link A, Leja M, Bruzaite I, Steponaitiene R, Juzenas S, Gyvyte U, Ivanauskas A, Ancans G, Petrenkiene V, Skieceviciene J,

- Kupcinskas L, Malfertheiner P. Gene polymorphisms of micornas in Helicobacter pylori-induced high risk atrophic gastritis and gastric cancer. *PLoS One*. 2014; 9(1): e87467.
194. Kupcinskas J, Bruzaite I, Juzenas S, Gyvyte U, Jonaitis L, Kiudelis G, Skieceviciene J, Leja M, Pauzas H, Tamelis A, Pavalkis D, Kupcinskas L. Lack of association between miR-27a, miR-146a, miR-196a-2, miR-492 and miR-608 gene polymorphisms and colorectal cancer. *Sci Rep*. 2014; 4:5993.
 195. Mao Y, Li Y, Jing F, Cai S, Zhang Z, Li Q, Ma X, Wang J, Jin M, Chen K. Association of a genetic variant in microRNA-146a with risk of colorectal cancer: a population-based case-control study. *Tumour Biol*. 2014; 35(7): 6961-7.
 196. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vukotić V, Tomović S, Cerović S, Filipović N, Romac S, Brajušković G. Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control*. 2014; 25(11):1571-5.
 197. Manna I, Labate A, Mumoli L, Pantusa M, Ferlazzo E, Aguglia U, Quattrone A, Gambardella A. Relationship between genetic variant in pre-microRNA-146a and genetic predisposition to temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Gene* 2013; 516: 181-3.
 198. Pu JY, Dong W, Zhang L, Liang WB, Yang Y, Lv ML. No association between single nucleotide polymorphisms in pre-mirnas and the risk of gastric cancer in Chinese population. *Iran J Basic Med Sci*. 2014; 17(2): 128-33.
 199. Qu Y, Qu H, Luo M, Wang P, Song C, Wang K, Zhang J, Dai L. MicroRNAs related polymorphisms and genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Genet Genomics*. 2014; 289(6): 1123-30.
 200. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, Romac S, Brajušković G. Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and cancer risk: an updated meta-analysis. *Public Health Genomics* 2015; 18(5):283-98.
 201. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol*. 2012; 13(8): 790-801.

202. Eeles R, Goh C, Castro E, Bancroft E, Guy M, Al Olama AA, Easton D, Kote-Jarai Z. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol*. 2014; 11(1): 18-31.
203. Zhao L, Chen X, Cao Y. New role of microRNA: carcinogenesis and clinical application in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011; 43(11): 831-9.
204. Patil PA, Magi-Galluzzi C. MicroRNA in prostate cancer: Practical aspects. *Histol Histopathol*. 2015: 11647. [Epub ahead of print]
205. Wang YL, Wu S, Jiang B, Yin FF, Zheng SS, Hou SC. Role of MicroRNAs in Prostate Cancer Pathogenesis. *Clin Genitourin Cancer*. 2015; 13: 261-70.
206. Chen M, Zhou ZY, Chen JG, Tong N, Chen SQ, Yang Y, Zhang XW, Jiang H, Liu N, Liu J, Sha GZ, Zhu WD, Hua LX, Wang ZJ, Xu B. Effect of miR-146a polymorphism on biochemical recurrence risk after radical prostatectomy in southern Chinese population. *Genet Mol Res*. 2014; 13(4): 10615-21.
207. Shen J, Ambrosone CB, DiCioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*. 2008; 29(10): 1963-6.
208. Liu H, Chen M, Wu F, Li F, Yin T, Cheng H, Li W, Liu B, Wang Q, Tao L. rs2910164 Polymorphism Confers a Decreased Risk for Pulmonary Hypertension by Compromising the Processing of microRNA-146a. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36(5): 1951-60.
209. Mo W, Zhang J, Li X, Meng D, Gao Y, Yang S, Wan X, Zhou C, Guo F, Huang Y, Amente S, Avvedimento EV, Xie Y, Li Y. Identification of novel AR-targeted microRNAs mediating androgen signalling through critical pathways to regulate cell viability in prostate cancer. *PLoS One*. 2013; 8(2): e56592.
210. Chu H, Zhong D, Tang J, Li J, Xue Y, Tong N, Qin C, Yin C, Zhang Z, Wang M. A functional variant in miR-143 promoter contributes to prostate cancer risk. *Arch Toxicol*. 2016; 90(2): 403-14.
211. Hashemi M, Moradi N, Ziaee SA, Narouie B, Soltani MH, Rezaei M, Shahkar G, Taheri M. Association between single nucleotide polymorphism in

- miR-499, miR-196a2, miR-146a and miR-149 and prostate cancer risk in a sample of Iranian population. *J Adv Res.* 2016; 7(3): 491-8.
212. Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep.* 2009; 10(4): 400-5.
213. Wang D, Qiu C, Zhang H, Wang J, Cui Q, Yin Y. Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS One.* 2010; 5(9). pii: e13067.
214. Kunej T, Godnic I, Horvat S, Zorc M, Calin GA. Cross talk between microRNA and coding cancer genes. *Cancer J.* 2012; 18(3): 223-31.
215. Jin Y, Lee CG. Single Nucleotide Polymorphisms Associated with MicroRNA Regulation. *Biomolecules.* 2013; 3(2): 287-302.
216. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(17): 5944-53.
217. Guo L, Lu Z. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One.* 2010; 5(6): e11387.
218. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010; 7(4): 248-9.
219. Bian X, Shen Y, Zhang G, Gu C, Cai Y, Wang C, Zhu Y, Zhu Y, Zhang H, Dai B, Ye D. Expression of dicer and its related miRNAs in the progression of prostate cancer. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0120159.
220. Zhang B, Chen H, Zhang L, Dakhova O, Zhang Y, Lewis MT, Creighton CJ, Ittmann MM, Xin L. A dosage-dependent pleiotropic role of Dicer in prostate cancer growth and metastasis. *Oncogene.* 2014; 33(24): 3099-108.
221. Wang M, Ren D, Guo W, Wang Z, Huang S, Du H, Song L, Peng X. Loss of miR-100 enhances migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition and stemness properties in prostate cancer cells through targeting Argonaute 2. *Int J Oncol.* 2014; 45(1): 362-72.
222. Yu X, Li Z. The role of TARBP2 in the development and progression of cancers. *Tumour Biol.* 2016; 37(1): 57-60.

223. Redfern AD, Colley SM, Beveridge DJ, Ikeda N, Epis MR, Li X, Foulds CE, Stuart LM, Barker A, Russell VJ, Ramsay K, Kobelke SJ, Li X, Hatchell EC, Payne C, Giles KM, Messineo A, Gatignol A, Lanz RB, O'Malley BW, Leedman PJ. RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(16): 6536-41.
224. Chen W, Zhou P, Li X. High expression of DDX20 enhances the proliferation and metastatic potential of prostate cancer cells through the NF- κ B pathway. *Int J Mol Med*. 2016; 37(6): 1551-7.
225. Salanti G, Sanderson S, Higgins JP. Obstacles and opportunities in meta-analysis of genetic association studies. *Genet Med*. 2005; 7(1): 13-20.
226. König IR. Validation in genetic association studies. *Brief Bioinform*. 2011; 12(3): 253-8.
227. Jing L, Su L, Ring BZ. Ethnic background and genetic variation in the evaluation of cancer risk: a systematic review. *PLoS One*. 2014; 9(6): e97522.
228. Ma XP, Zhang T, Peng B, Yu L, Jiang de K. Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies. *PLoS One*. 2013; 8(11): e79584.
229. Hu Y, Yu CY, Wang JL, Guan J, Chen HY, Fang JY. MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer. *Sci Rep*. 2014; 4: 3648.

8. Prilozi

Prilog 1. Rezultati testa odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi za genetičke varijante u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa.

Genetička varijanta	P vrednost
rs2910164	1
rs3746444	1
rs11614913	0.81
rs895819	0.12
rs3742330	0.12
rs4961280	0.87
rs784567	0.052
rs7813	0.13
rs197414	0.13

Prilog 2. Rezultati testova asocijacije varijanti u genima za mikroRNK sa serumskim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP.

Genetička varijanta	Genetički model	n	Srednja vrednost (standardna greška)	Serumska vrednost PSA		
				Razlika (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs2910164						
	Kodominantni					
	GG	181	112.05 (36.72)	0.00		
	GC	87	163.27 (59.24)	53.17 (-75.97 - 182.30)	0.68	4285.8
	CC	12	81.68 (36.53)	-38.35 (-334.06 - 257.37)		
	Dominantni					
	GG	181	112.05 (36.72)	0.00		
	GC+CC	99	153.38 (52.26)	42.01 (-81.47 - 165.50)	0.51	4284.2
	Recesivni					
	GG+GC	268	128.67 (31.35)	0.00		
	CC	12	81.68 (36.53)	-55.14 (-347.85 - 237.56)	0.71	4284.5
	Overdominantni					
	GG + CC	193	110.16 (34.51)	0.00		
	GC	87	163.27 (59.24)	55.48 (-72.21 - 183.16)	0.4	4283.9
	Log-aditivni					
	-	-	-	22.63 (-80.97 - 126.24)	0.67	4284.4
rs3746444						
	Kodominantni					
	AA	189	125.46 (38.15)	0.00		
	AG	144	106.37 (30.85)	-18.20 (-116.55 - 80.15)	0.64	5295.8
	GG	18	22.57 (5.57)	-104.15 (-323.36 - 115.05)		
	Dominantni					
	AA	189	125.46 (38.15)	0.00		
	AG+GG	162	97.06 (27.5)	-27.80 (-122.91 - 67.30)	0.57	5294.4
	Recesivni					
	AA+AG	333	117.2 (25.4)	0.00		
	GG	18	22.57 (5.57)	-96.34 (-311.18 - 118.49)	0.38	5293.9
	Overdominantni					
	AA + GG	207	116.51 (34.88)	0.00		
	AG	144	106.37 (30.85)	-9.20 (-105.69 - 87.29)	0.85	5294.7
	Log-aditivni					
	-	-	-	-32.88 (-112.67 - 46.92)	0.42	5294

rs11614913

Kodominantni						
CC	148	91.7 (20.12)	0.00			
CT	160	148.28 (49.4)	56.80 (-44.92 - 158.53)	0.37	5238.3	
TT	39	50.46 (10.22)	-40.26 (-200.87 - 120.36)			
Dominantni						
CC	148	91.7 (20.12)	0.00	0.44	5237.7	
CT+TT	199	129.11 (39.84)	37.81 (-59.08 - 134.70)			
Recesivni						
CC+CT	308	121.09 (27.43)	0.00	0.37	5237.5	
TT	39	50.46 (10.22)	-69.79 (-221.49 - 81.91)			
Overdominantni						
CC + TT	187	83.1 (16.1)	0.00	0.18	5236.5	
CT	160	148.28 (49.4)	65.20 (-30.75 - 161.14)			
Log-aditivni						
-	-	-	5.20 (-67.09 - 77.50)	0.89	5238.3	

rs895819

Kodominantni						
TT	148	68.28 (21.24)	0.00			
TC	171	142.15 (40.79)	75.21 (-24.69 - 175.10)	0.27	5265.9	
CC	30	164.36 (121.28)	98.41 (-79.74 - 276.56)			
Dominantni						
TT	148	68.28 (21.24)	0.00	0.11	5263.9	
TC+CC	201	145.47 (39.01)	78.65 (-17.64 - 174.94)			
Recesivni						
TT+TC	319	107.88 (24.04)	0.00	0.51	5266.1	
CC	30	164.36 (121.28)	57.86 (-112.24 - 227.96)			
Overdominantni						
TT + CC	178	84.47 (26.93)	0.00	0.23	5265.1	
TC	171	142.15 (40.79)	58.52 (-36.72 - 153.76)			
Log-aditivni						
-	-	-	60.08 (-15.59 - 135.76)	0.12	5264.1	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Prilog 3. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs3746444, rs11614913 i rs895819 sa Glison skorom kod bolesnika sa KP.

Genetički model	GS <7 (%)	GS=7 (%)	GS >7 (%)	GS >7 vs. GS <7			GS >7 vs. GS=7			GS=7 vs. GS <7		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3746444												
Kodominantni												
AA	107 (51.2)	45 (56.2)	32 (59.3)	1.00			1.00			1.00		
AG	89 (42.6)	32 (40)	21 (38.9)	0.74 (0.40-1.40)	0.27	262	0.87 (0.42-1.81)	0.89	183.1	0.85 (0.50-1.45)	0.58	347.7
GG	13 (6.2)	3 (3.8)	1 (1.8)	0.26 (0.03-2.13)			0.65 (0.06-6.80)			0.55 (0.15-2.01)		
Dominantni												
AA	107 (51.2)	45 (56.2)	32 (59.3)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	102 (48.8)	35 (43.8)	22 (40.7)	0.69 (0.37-1.27)	0.23	261.2	0.86 (0.42-1.75)	0.68	181.2	0.81 (0.48-1.36)	0.43	346.2
Recesivni												
AA+AG	196 (93.8)	77 (96.2)	53 (98.2)	1.00			1.00			1.00		
GG	13 (6.2)	3 (3.8)	1 (1.8)	0.30 (0.04-2.38)	0.18	260.8	0.69 (0.07-7.04)	0.75	181.3	0.59 (0.16-2.12)	0.39	346.1
Overdominantni												
AA + GG	120 (57.4)	48 (60)	33 (61.1)	1.00			1.00			1.00		
AG	89 (42.6)	32 (40)	21 (38.9)	0.81 (0.43-1.51)	0.5	262.2	0.89 (0.43-1.83)	0.75	181.3	0.89 (0.53-1.51)	0.67	346.6
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.67 (0.39-1.15)	0.14	260.4	0.86 (0.45-1.63)	0.64	181.1	0.80 (0.52-1.25)	0.33	345.9
rs11614913												
Kodominantni												
CC	91 (44)	30 (38.5)	23 (42.6)	1.00			1.00			1.00		
CT	96 (46.4)	38 (48.7)	23 (42.6)	0.94 (0.49-1.82)	0.6	262.5	0.82 (0.38-1.76)	0.87	181.5	1.20 (0.69-2.10)	0.61	341.2
TT	20 (9.7)	10 (12.8)	8 (14.8)	1.56 (0.59-4.09)			0.95 (0.32-2.85)			1.51 (0.64-3.59)		
Dominantni												
CC	91 (44)	30 (38.5)	23 (42.6)	1.00			1.00			1.00		
CT+TT	116 (56)	48 (61.5)	31 (57.4)	1.05 (0.57-1.94)	0.88	261.5	0.85 (0.41-1.74)	0.66	179.6	1.26 (0.74-2.14)	0.4	339.5
Recesivni												
CC+CT	187 (90.3)	68 (87.2)	46 (85.2)	1.00			1.00			1.00		
TT	20 (9.7)	10 (12.8)	8 (14.8)	1.61 (0.65-3.98)	0.32	260.5	1.06 (0.38-2.94)	0.91	179.8	1.37 (0.61-3.08)	0.45	339.6
Overdominantni												
CC + TT	111 (53.6)	40 (51.3)	31 (57.4)	1.00			1.00			1.00		
CT	96 (46.4)	38 (48.7)	23 (42.6)	0.86 (0.46-1.59)	0.62	261.3	0.83 (0.41-1.69)	0.61	179.5	1.10 (0.65-1.85)	0.72	340.1
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.15 (0.73-1.82)	0.55	261.2	0.93 (0.56-1.56)	0.79	179.7	1.22 (0.82-1.81)	0.32	339.2

rs895819

Kodominantni												
TT	90 (43.3)	37 (46.2)	19 (35.9)	1.00			1.00			1.00		
TC	97 (46.6)	40 (50)	30 (56.6)	1.51 (0.78-2.91)	0.38	258.9	1.21 (0.56-2.58)	0.59	180.3	1.00 (0.59-1.71)	0.16	344.6
CC	21 (10.1)	3 (3.8)	4 (7.5)	0.88 (0.27-2.93)			2.27 (0.45-11.50)			0.34 (0.10-1.22)		
Dominantni												
TT	90 (43.3)	37 (46.2)	19 (35.9)	1.00			1.00			1.00		
TC+CC	118 (56.7)	43 (53.8)	34 (64.2)	1.39 (0.74-2.64)	0.3	257.8	1.28 (0.61-2.69)	0.51	179	0.88 (0.53-1.49)	0.64	346
Recesivni												
TT+TC	187 (89.9)	77 (96.2)	49 (92.5)	1.00			1.00			1.00		
CC	21 (10.1)	3 (3.8)	4 (7.5)	0.70 (0.23-2.18)	0.53	258.4	2.04 (0.43-9.73)	0.37	178.6	0.34 (0.10-1.18)	0.058 ^b	342.6
Overdominantni												
TT + CC	111 (53.4)	40 (50)	23 (43.4)	1.00			1.00			1.00		
TC	97 (46.6)	40 (50)	30 (56.6)	1.54 (0.83-2.87)	0.17	256.9	1.08 (0.52-2.25)	0.83	179.3	1.15 (0.68-1.92)	0.61	345.9
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.13 (0.70-1.82)	0.62	258.6	1.34 (0.72-2.49)	0.36	178.6	0.78 (0.52-1.19)	0.25	344.9

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

Prilog 4. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs2910164, rs3746444 i rs11614913 sa kliničkim stadijumom primarnog KP.

Genetički model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 vs. T1			T3/T4 vs. T1			T3/T4 vs. T2		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3746444												
Kodominantni												
AA	25 (51)	87 (51.2)	54 (58.1)	1.00			1.00			1.00		
AG	21 (42.9)	75 (44.1)	34 (36.6)	1.06 (0.55-2.07)	0.91	238	0.73 (0.35-1.51)	0.66	188.4	0.73 (0.43-1.24)	0.49	348.3
GG	3 (6.1)	8 (4.7)	5 (5.4)	0.77 (0.19-3.15)			0.69 (0.15-3.16)			1.01 (0.31-3.24)		
Dominantni												
AA	25 (51)	87 (51.2)	54 (58.1)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	24 (49)	83 (48.8)	39 (41.9)	1.03 (0.54-1.95)	0.93	236.2	0.72 (0.36-1.46)	0.37	186.4	0.76 (0.45-1.26)	0.28	346.6
Recesivni												
AA+AG	46 (93.9)	162 (95.3)	88 (94.6)	1.00			1.00			1.00		
GG	3 (6.1)	8 (4.7)	5 (5.4)	0.75 (0.19-2.96)	0.69	236.1	0.79 (0.18-3.50)	0.76	187.1	1.15 (0.37-3.63)	0.81	347.7
Overdominantni												
AA + GG	28 (57.1)	95 (55.9)	59 (63.4)	1.00			1.00			1.00		
AG	21 (42.9)	75 (44.1)	34 (36.6)	1.09 (0.57-2.09)	0.79	236.2	0.76 (0.37-1.54)	0.44	186.6	0.73 (0.43-1.23)	0.23	346.3
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.98 (0.57-1.68)	0.93	236.2	0.78 (0.44-1.38)	0.39	186.5	0.83 (0.54-1.29)	0.41	347
rs11614913												
Kodominantni												
CC	20 (41.7)	72 (43.1)	40 (43)	1.00			1.00			1.00		
CT	21 (43.8)	75 (44.9)	43 (46.2)	0.96 (0.48-1.92)	0.9	233.6	1.06 (0.50-2.25)	0.82	186.7	1.03 (0.60-1.77)	0.95	347
TT	7 (14.6)	20 (12)	10 (10.8)	0.79 (0.29-2.16)			0.74 (0.24-2.27)			0.90 (0.38-2.11)		
Dominantni												
CC	20 (41.7)	72 (43.1)	40 (43)	1.00			1.00			1.00		
CT+TT	28 (58.3)	95 (56.9)	53 (57)	0.92 (0.48-1.76)	0.79	231.8	0.98 (0.48-1.99)	0.95	185.1	1.00 (0.60-1.68)	0.99	345.1
Recesivni												
CC+CT	41 (85.4)	147 (88)	83 (89.2)	1.00			1.00			1.00		
TT	7 (14.6)	20 (12)	10 (10.8)	0.81 (0.32-2.07)	0.67	231.7	0.72 (0.25-2.05)	0.55	184.7	0.88 (0.40-1.98)	0.77	345
Overdominantni												
CC + TT	27 (56.2)	92 (55.1)	50 (53.8)	1.00			1.00			1.00		
CT	21 (43.8)	75 (44.9)	43 (46.2)	1.01 (0.53-1.94)	0.98	231.8	1.13 (0.56-2.29)	0.73	185	1.06 (0.63-1.76)	0.83	345
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.91 (0.57-1.45)	0.69	231.7	0.91 (0.54-1.54)	0.73	185	0.98 (0.67-1.43)	0.9	345.1

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Prilog 5. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs3746444 i rs11614913 sa prisustvom udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP.

Genetička varijanta	Genetički model	Prisustvo udaljenih metastaza			P vrednost ^a	AIC
		prisutne (%)	odsutne (%)	OR (95% CI) ^a		
rs3746444	Kodominantni					
	AA	142 (52)	31 (59.6)	1.00		
	AG	119 (43.6)	17 (32.7)	0.66 (0.35-1.25)	0.28	291.1
	GG	12 (4.4)	4 (7.7)	1.52 (0.46-5.03)		
	Dominantni					
	AA	142 (52)	31 (59.6)	1.00		
	AG+GG	131 (48)	21 (40.4)	0.74 (0.40-1.35)	0.32	290.6
	Recesivni					
	AA+AG	261 (95.6)	48 (92.3)	1.00	0.35	290.8
	GG	12 (4.4)	4 (7.7)	1.80 (0.56-5.81)		
	Overdominantni					
	AA + GG	154 (56.4)	35 (67.3)	1.00	0.15	289.5
AG	119 (43.6)	17 (32.7)	0.63 (0.34-1.18)			
Log-aditivni						
-	-	-	0.88 (0.53-1.47)	0.63	291.4	
rs11614913	Kodominantni					
	CC	115 (42.6)	23 (45.1)	1.00		
	CT	122 (45.2)	23 (45.1)	0.94 (0.50-1.77)	0.87	288.8
	TT	33 (12.2)	5 (9.8)	0.76 (0.27-2.15)		
	Dominantni					
	CC	115 (42.6)	23 (45.1)	1.00		
	CT+TT	155 (57.4)	28 (54.9)	0.90 (0.49-1.65)	0.74	286.9
	Recesivni					
	CC+CT	237 (87.8)	46 (90.2)	1.00	0.62	286.8
	TT	33 (12.2)	5 (9.8)	0.78 (0.29-2.11)		
	Overdominantni					
	CC + TT	148 (54.8)	28 (54.9)	1.00	0.99	287.1
CT	122 (45.2)	23 (45.1)	1.00 (0.55-1.82)			
Log-aditivni						
-	-	-	0.90 (0.57-1.41)	0.63	286.8	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Prilog 6. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs3746444 i rs11614913 sa rizikom za progresiju KP prećenjenim prema kriterijumima Medeiros-a i saradnika.

Genetička varijanta	Genetički model	Rizik za progresiju KP (Medeiros et al.)				
		Nizak (%)	Visok (%)	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3746444						
	Kodominantni					
	GG	70 (49.6%)	107 (57.5%)	1.00		
	GC	62 (44%)	72 (38.7%)	0.75 (0.47-1.18)	0.27	449.8
	CC	9 (6.4%)	7 (3.8%)	0.52 (0.18-1.46)		
	Dominantni					
	GG	70 (49.6%)	107 (57.5%)	1.00		
	GC+CC	71 (50.4%)	79 (42.5%)	0.72 (0.46-1.12)	0.14	448.3
	Recesivni					
	GG+GC	132 (93.6%)	179 (96.2%)	1.00		
	CC	9 (6.4%)	7 (3.8%)	0.59 (0.21-1.62)	0.3	449.4
	Overdominantni					
	GG + CC	79 (56%)	114 (61.3%)	1.00		
	GC	62 (44%)	72 (38.7%)	0.79 (0.50-1.23)	0.3	449.4
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.73 (0.51-1.07)	0.1	447.8
rs11614913						
	Kodominantni					
	CC	60 (42.9%)	78 (42.6%)	1.00		
	CT	65 (46.4%)	84 (45.9%)	0.99 (0.62-1.59)	0.99	447.3
	TT	15 (10.7%)	21 (11.5%)	1.06 (0.50-2.23)		
	Dominantni					
	CC	60 (42.9%)	78 (42.6%)	1.00	0.98	445.3
	CT+TT	80 (57.1%)	105 (57.4%)	1.01 (0.64-1.57)		
	Recesivni					
	CC+CT	125 (89.3%)	162 (88.5%)	1.00	0.87	445.3
	TT	15 (10.7%)	21 (11.5%)	1.06 (0.52-2.15)		
	Overdominantni					
	CC + TT	75 (53.6%)	99 (54.1%)	1.00	0.94	445.3
	CT	65 (46.4%)	84 (45.9%)	0.98 (0.63-1.53)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.02 (0.73-1.42)	0.92	445.3

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Prilog 7. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs2910164, rs11614913 i rs895819 sa rizikom za progresiju KP procenjenim prema kriterijumima *D'Amico*-a i saradnika.

Genetički model	Nizak (%)	Srednji (%)	Visok (%)	Srednji vs. nizak rizik			Visok vs. nizak rizik			Visok vs. srednji rizik		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC
rs2910164												
Kodominantni												
GG	15 (79)	55 (62.5)	97 (65.5)	1.00			1.00			1.00		
GC	4 (21.1)	28 (31.8)	44 (29.7)	1.87 (0.57-6.19)	0.18	104.4	1.67 (0.52-5.37)	0.27	122.1	0.87 (0.49-1.56)	0.89	317.5
CC	0 (0)	5 (5.7)	7 (4.7)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			0.86 (0.26-2.87)		
Dominantni												
GG	15 (79)	55 (62.5)	97 (65.5)	1.00			1.00			1.00		
GC+CC	4 (21.1)	33 (37.5)	51 (34.5)	2.25 (0.69-7.38)	0.16	103.8	1.96 (0.62-6.25)	0.23	121.3	0.87 (0.50-1.51)	0.63	315.5
Recesivni												
GG+GC	19 (100)	83 (94.3)	141 (95.3)	1.00			1.00			1.00		
CC	0 (0)	5 (5.7)	7 (4.7)	NA (0.00-NA)	0.13	103.6	NA (0.00-NA)	0.17	120.9	0.89 (0.27-2.95)	0.85	315.7
Overdominantni												
GG + CC	15 (79)	60 (68.2)	104 (70.3)	1.00			1.00			1.00		
GC	4 (21.1)	28 (31.8)	44 (29.7)	1.72 (0.52-5.67)	0.36	105	1.56 (0.49-4.98)	0.44	122.1	0.88 (0.50-1.57)	0.68	315.5
Log-aditivni												
-	-	-	-	2.29 (0.78-6.76)	0.1	103.1	2.02 (0.70-5.83)	0.16	120.8	0.90 (0.57-1.41)	0.64	315.5
rs11614913												
Kodominantni												
CC	10 (45.5)	53 (46.1)	80 (41)	1.00			1.00			1.00		
CT	10 (45.5)	53 (46.1)	87 (44.6)	0.99 (0.38-2.59)	0.98	128.7	1.07 (0.42-2.73)	0.79	148.4	1.08 (0.66-1.77)	0.26	406.6
TT	2 (9.1)	9 (7.8)	28 (14.4)	0.83 (0.15-4.50)			1.69 (0.35-8.21)			1.95 (0.85-4.51)		
Dominantni												
CC	10 (45.5)	53 (46.1)	80 (41)	1.00			1.00			1.00		
CT+TT	12 (54.5)	62 (53.9)	115 (59)	0.97 (0.38-2.43)	0.94	126.7	1.18 (0.48-2.86)	0.72	146.8	1.21 (0.76-1.94)	0.43	406.7
Recesivni												
CC+CT	20 (90.9)	106 (92.2)	167 (85.6)	1.00			1.00			1.00		
TT	2 (9.1)	9 (7.8)	28 (14.4)	0.83 (0.16-4.19)	0.82	126.7	1.62 (0.36-7.37)	0.51	146.5	1.88 (0.84-4.17)	0.11	404.7
Overdominantni												
CC + TT	12 (54.5)	62 (53.9)	108 (55.4)	1.00			1.00			1.00		
CT	10 (45.5)	53 (46.1)	87 (44.6)	1.02 (0.41-2.56)	0.96	126.7	0.96 (0.40-2.34)	0.94	146.9	0.95 (0.59-1.52)	0.83	407.2
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.94 (0.45-1.96)	0.88	126.7	1.21 (0.63-2.35)	0.56	146.6	1.27 (0.89-1.81)	0.18	405.5

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Prilog 8. Rezultati testova asocijacije varijanti rs3742330, rs4961280, rs7813 i rs197414 u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa serumskim vrednostima PSA kod bolesnika sa KP.

Genetička varijanta	Genetički model	n	Srednja vrednost (standardna greška)	Serumska vrednost PSA		
				Razlika (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs3742330						
	Kodominantni					
	AA	283	127.83 (29.79)	0.00		
	AG	61	49.85 (9.05)	-77.15 (-202.67 - 48.38)	0.43	5280.9
	GG	6	21.23 (8.9)	-104.50 (-471.28 - 262.28)		
	Dominantni					
	AA	283	127.83 (29.79)	0.00	0.2	5279
	AG+GG	67	47.29 (8.33)	-79.59 (-200.26 - 41.08)		
	Recesivni					
	AA+AG	344	114 (24.61)	0.00	0.63	5280.4
	GG	6	21.23 (8.9)	-90.59 (-456.90 - 275.73)		
	Overdominantni					
	AA + GG	289	125.62 (29.19)	0.00	0.24	5279.3
	AG	61	49.85 (9.05)	-74.94 (-200.09 - 50.22)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	-69.48 (-175.83 - 36.87)	0.2	5279
rs4961280						
	Kodominantni					
	CC	228	99.42 (23.35)	0.00		
	CA	111	139.58 (59.37)	40.09 (-62.63 - 142.81)	0.74	5310.2
	AA	13	97.01 (29.39)	0.16 (-253.22 - 253.54)		
	Dominantni					
	CC	228	99.42 (23.35)	0.00	0.48	5308.3
	CA+AA	124	135.12 (53.22)	35.91 (-63.00 - 134.82)		
	Recesivni					
	CC+CA	339	112.57 (24.96)	0.00	0.92	5308.8
	AA	13	97.01 (29.39)	-12.95 (-263.95 - 238.05)		
	Overdominantni					
	CC + AA	241	99.29 (22.14)	0.00	0.44	5308.2
	CA	111	139.58 (59.37)	40.08 (-61.59 - 141.75)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	24.84 (-59.85 - 109.52)	0.57	5308.5
rs7813						
	Kodominantni					
	AA	113	71.15 (15.99)	0.00		
	AG	179	151.99 (45.43)	80.27 (-26.05 - 186.60)	0.24	5307.9
	GG	60	69.62 (23.32)	-3.43 (-145.02 - 138.15)		
	Dominantni					
	AA	113	71.15 (15.99)	0.00	0.25	5307.5
	AG+GG	239	131.31 (34.58)	59.38 (-41.78 - 160.54)		
	Recesivni					
	AA+AG	292	120.71 (28.59)	0.00	0.41	5308.2
	GG	60	69.62 (23.32)	-52.77 (-178.59 - 73.04)		
	Overdominantni					
	AA + GG	173	70.62 (13.17)	0.00	0.091 ^b	5305.9
	AG	179	151.99 (45.43)	81.46 (-12.72 - 175.65)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	11.74 (-57.42 - 80.90)	0.74	5308.7

rs197414

Kodominantni						
CC	268	131.79 (31.41)	0.00			
CA	72	51.26 (9.48)	-82.03 (-200.03 - 35.97)	0.34	5280.4	
AA	10	37.53 (11.63)	-103.31 (-391.22 - 184.61)			
Dominantni						
CC	268	131.79 (31.41)	0.00	0.14	5278.4	
CA+AA	82	49.59 (8.44)	-84.57 (-196.82 - 27.68)			
Recesivni						
CC+CA	340	114.73 (24.89)	0.00	0.56	5280.3	
AA	10	37.53 (11.63)	-84.88 (-371.93 - 202.17)			
Overdominantni						
CC + AA	278	128.4 (30.3)	0.00	0.19	5278.9	
CA	72	51.26 (9.48)	-78.14 (-195.55 - 39.28)			
Log-aditivni						
-	-	-	-70.12 (-165.27 - 25.03)	0.15	5278.5	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

Prilog 9. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs784567, rs7813 i rs197414 sa Glison skorom kod bolesnika sa KP.

Genetički model	GS <7 (%)	GS=7 (%)	GS >7 (%)	GS >7 vs. GS <7			GS >7 vs. GS=7			GS=7 vs. GS <7		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs784567												
Kodominantni												
GG	62 (29.8)	22 (27.2)	13 (24.5)	1.00			1.00			1.00		
GA	94 (45.2)	38 (46.9)	31 (58.5)	1.70 (0.81-3.57)	0.22	257.7	1.62 (0.69-3.85)	0.25	179.8	1.14 (0.62-2.11)	0.9	350.5
AA	52 (25)	21 (25.9)	9 (17)	0.95 (0.37-2.46)			0.79 (0.27-2.30)			1.15 (0.57-2.32)		
Dominantni												
GG	62 (29.8)	22 (27.2)	13 (24.5)	1.00			1.00			1.00		
GA+AA	146 (70.2)	59 (72.8)	40 (75.5)	1.45 (0.71-2.95)	0.3	257.7	1.31 (0.58-2.98)	0.51	180.1	1.14 (0.65-2.03)	0.64	348.5
Recesivni												
GG+GA	156 (75)	60 (74.1)	44 (83)	1.00			1.00			1.00		
AA	52 (25)	21 (25.9)	9 (17)	0.67 (0.30-1.49)	0.31	257.7	0.58 (0.24-1.41)	0.22	179	1.06 (0.59-1.91)	0.85	348.6
Overdominantni												
GG + AA	114 (54.8)	43 (53.1)	22 (41.5)	1.00			1.00			1.00		
GA	94 (45.2)	38 (46.9)	31 (58.5)	1.74 (0.93-3.24)	0.081 ^b	255.7	1.80 (0.87-3.72)	0.11	177.9	1.07 (0.64-1.79)	0.8	348.6
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.02 (0.66-1.57)	0.94	258.7	0.92 (0.55-1.53)	0.75	180.4	1.07 (0.76-1.52)	0.69	348.5
rs7813												
Kodominantni												
AA	59 (28.4)	29 (35.8)	20 (37.7)	1.00			1.00			1.00		
AG	113 (54.3)	40 (49.4)	24 (45.3)	0.67 (0.34-1.32)	0.5	259.3	0.84 (0.39-1.83)	0.86	182.2	0.72 (0.41-1.28)	0.48	349.2
GG	36 (17.3)	12 (14.8)	9 (17)	0.87 (0.35-2.18)			1.06 (0.37-3.05)			0.69 (0.31-1.52)		
Dominantni												
AA	59 (28.4)	29 (35.8)	20 (37.7)	1.00			1.00			1.00		
AG+GG	149 (71.6)	52 (64.2)	33 (62.3)	0.71 (0.37-1.36)	0.31	257.7	0.89 (0.43-1.86)	0.76	180.4	0.71 (0.41-1.23)	0.23	347.2
Recesivni												
AA+AG	172 (82.7)	69 (85.2)	44 (83)	1.00			1.00			1.00		
GG	36 (17.3)	12 (14.8)	9 (17)	1.12 (0.49-2.54)	0.79	258.7	1.17 (0.45-3.06)	0.74	180.4	0.84 (0.41-1.71)	0.63	348.4
Overdominantni												
AA + GG	95 (45.7)	41 (50.6)	29 (54.7)	1.00			1.00			1.00		
AG	113 (54.3)	40 (49.4)	24 (45.3)	0.70 (0.38-1.29)	0.25	257.4	0.82 (0.41-1.67)	0.59	180.2	0.82 (0.49-1.37)	0.44	348.1
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.87 (0.55-1.39)	0.57	258.4	0.99 (0.59-1.65)	0.97	180.5	0.80 (0.55-1.18)	0.27	347.4

rs197414

Kodominantni													
CC	153 (73.6)	64 (80)	41 (78.8)	1.00				1.00			1.00		
CA	49 (23.6)	13 (16.2)	10 (19.2)	0.83 (0.38-1.81)	0.88	258.1	1.15 (0.46-2.92)	0.93	180.1	0.64 (0.32-1.26)	0.38	346.1	
AA	6 (2.9)	3 (3.8)	1 (1.9)	0.78 (0.09-7.10)			0.80 (0.08-8.33)			1.24 (0.30-5.16)			
Dominantni													
CC	153 (73.6)	64 (80)	41 (78.8)	1.00			1.00			1.00			
CA+AA	55 (26.4)	16 (20)	11 (21.1)	0.83 (0.39-1.75)	0.61	256.1	1.10 (0.46-2.65)	0.83	178.2	0.70 (0.37-1.32)	0.26	344.8	
Recesivni													
CC+CA	202 (97.1)	77 (96.2)	51 (98.1)	1.00			1.00			1.00			
AA	6 (2.9)	3 (3.8)	1 (1.9)	0.81 (0.09-7.37)	0.85	256.3	0.78 (0.08-8.09)	0.83	178.2	1.37 (0.33-5.65)	0.67	345.9	
Overdominantni													
CC + AA	159 (76.4)	67 (83.8)	42 (80.8)	1.00			1.00			1.00			
CA	49 (23.6)	13 (16.2)	10 (19.2)	0.84 (0.39-1.81)	0.65	256.1	1.16 (0.46-2.93)	0.75	178.2	0.63 (0.32-1.24)	0.17	344.2	
Log-aditivni													
-	-	-	-	0.85 (0.44-1.64)	0.62	256.1	1.04 (0.50-2.18)	0.91	178.2	0.81 (0.48-1.38)	0.43	345.5	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

Prilog 10. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs784567 i rs197414 sa kliničkim stadijumom primarnog KP.

Genetički model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 vs. T1			T3/T4 vs. T1			T3/T4 vs. T2		
				OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	AIC
rs784567												
Kodominantni												
GG	12 (24.5)	45 (26.5)	28 (31.1)	1.00			1.00			1.00		
GA	24 (49)	81 (47.6)	45 (50)	0.92 (0.42-2.01)	0.97	238.1	0.89 (0.39-2.05)	0.66	185.6	0.87 (0.48-1.59)	0.35	341.3
AA	13 (26.5)	44 (25.9)	17 (18.9)	0.92 (0.37-2.24)			0.64 (0.24-1.73)			0.59 (0.29-1.23)		
Dominantni												
GG	12 (24.5)	45 (26.5)	28 (31.1)	1.00			1.00			1.00		
GA+AA	37 (75.5)	125 (73.5)	62 (68.9)	0.92 (0.44-1.92)	0.82	236.1	0.81 (0.37-1.76)	0.59	184.2	0.77 (0.44-1.36)	0.37	340.6
Recesivni												
GG+GA	36 (73.5)	126 (74.1)	73 (81.1)	1.00			1.00			1.00		
AA	13 (26.5)	44 (25.9)	17 (18.9)	0.97 (0.47-2.01)	0.94	236.2	0.69 (0.29-1.60)	0.38	183.7	0.65 (0.34-1.21)	0.17	339.5
Overdominantni												
GG + AA	25 (51)	89 (52.4)	45 (50)	1.00			1.00			1.00		
GA	24 (49)	81 (47.6)	45 (50)	0.96 (0.51-1.82)	0.9	236.1	1.08 (0.54-2.19)	0.83	184.4	1.10 (0.66-1.83)	0.72	341.3
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.96 (0.61-1.49)	0.85	236.1	0.80 (0.49-1.33)	0.39	183.7	0.78 (0.54-1.11)	0.17	339.5
rs197414												
Kodominantni												
CC	40 (81.6)	124 (73.8)	67 (74.4)	1.00			1.00			1.00		
CA	8 (16.3)	38 (22.6)	20 (22.2)	1.52 (0.65-3.54)	0.57	235.9	1.42 (0.57-3.56)	0.67	185.7	0.97 (0.53-1.81)	0.99	341.7
AA	1 (2)	6 (3.6)	3 (3.3)	1.58 (0.18-13.91)			1.79 (0.18-18.14)			0.93 (0.22-3.90)		
Dominantni												
CC	40 (81.6)	124 (73.8)	67 (74.4)	1.00			1.00			1.00		
CA+AA	9 (18.4)	44 (26.2)	23 (25.6)	1.53 (0.68-3.42)	0.29	233.9	1.46 (0.61-3.50)	0.39	183.7	0.97 (0.54-1.74)	0.92	339.7
Recesivni												
CC+CA	48 (98)	162 (96.4)	87 (96.7)	1.00			1.00			1.00		
AA	1 (2)	6 (3.6)	3 (3.3)	1.46 (0.17-12.71)	0.72	234.9	1.67 (0.17-16.88)	0.65	184.3	0.93 (0.22-3.89)	0.93	339.7
Overdominantni												
CC + AA	41 (83.7)	130 (77.4)	70 (77.8)	1.00			1.00			1.00		
CA	8 (16.3)	38 (22.6)	20 (22.2)	1.50 (0.64-3.48)	0.34	234.1	1.40 (0.56-3.48)	0.47	183.9	0.98 (0.53-1.81)	0.94	339.7
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.42 (0.71-2.87)	0.31	234	1.39 (0.66-2.94)	0.38	183.7	0.97 (0.59-1.59)	0.9	339.7

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Prilog 11. Rezultati testova asocijacije varijanti u genima za proteine utišavajućeg kompleksa sa prisustvom udaljenih metastaza kod bolesnika sa KP.

Genetička varijanta	Genetički model	Prisustvo udaljenih metastaza				AIC
		prisutne (%)	odsutne (%)	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	
rs3742330						
	Kodominantni					
	AA	219 (81.1)	42 (82.3)	1.00		
	AG	45 (16.7)	9 (17.6)	1.05 (0.48-2.31)	0.35	286.9
	GG	6 (2.2)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		
	Dominantni					
	AA	219 (81.1)	42 (82.3)	1.00		
	AG+GG	51 (18.9)	9 (17.6)	0.93 (0.42-2.03)	0.85	287
	Recesivni					
	AA+AG	264 (97.8)	51 (100)	1.00	0.15	284.9
	GG	6 (2.2)	0 (0)	0.00 (0.00-NA)		
	Overdominantni					
	AA + GG	225 (83.3)	42 (82.3)	1.00		
	AG	45 (16.7)	9 (17.6)	1.08 (0.49-2.37)	0.85	287
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.84 (0.41-1.70)	0.62	286.8
rs4961280						
	Kodominantni					
	CC	172 (63.5)	34 (66.7)	1.00		
	CA	91 (33.6)	13 (25.5)	0.72 (0.36-1.44)	0.2	286.1
	AA	8 (3)	4 (7.8)	2.53 (0.72-8.88)		
	Dominantni					
	CC	172 (63.5)	34 (66.7)	1.00		
	CA+AA	99 (36.5)	17 (33.3)	0.87 (0.46-1.64)	0.66	287.2
	Recesivni					
	CC+CA	263 (97)	47 (92.2)	1.00	0.13	285
	AA	8 (3)	4 (7.8)	2.80 (0.81-9.67)		
	Overdominantni					
	CC + AA	180 (66.4)	38 (74.5)	1.00	0.25	286
	CA	91 (33.6)	13 (25.5)	0.68 (0.34-1.33)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.05 (0.62-1.79)	0.84	287.3
rs784567						
	Kodominantni					
	GG	72 (26.6)	17 (33.3)	1.00		
	GA	132 (48.7)	24 (47.1)	0.77 (0.39-1.53)	0.54	288.1
	AA	67 (24.7)	10 (19.6)	0.63 (0.27-1.47)		
	Dominantni					
	GG	72 (26.6)	17 (33.3)	1.00		
	GA+AA	199 (73.4)	34 (66.7)	0.72 (0.38-1.37)	0.33	286.4
	Recesivni					
	GG+GA	204 (75.3)	41 (80.4)	1.00	0.42	286.7
	AA	67 (24.7)	10 (19.6)	0.74 (0.35-1.56)		
	Overdominantni					
	GG + AA	139 (51.3)	27 (52.9)	1.00	0.83	287.3
	GA	132 (48.7)	24 (47.1)	0.94 (0.51-1.71)		
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.79 (0.52-1.21)	0.27	286.1

rs7813

Kodominantni						
AA	89 (32.8)	17 (33.3)	1.00			
AG	136 (50.2)	25 (49)	0.96 (0.49-1.88)	0.99	289.3	
GG	46 (17)	9 (17.6)	1.02 (0.42-2.47)			
Dominantni						
AA	89 (32.8)	17 (33.3)	1.00			
AG+GG	182 (67.2)	34 (66.7)	0.98 (0.52-1.84)	0.94	287.3	
Recesivni						
AA+AG	225 (83)	42 (82.3)	1.00			
GG	46 (17)	9 (17.6)	1.04 (0.47-2.29)	0.92	287.3	
Overdominantni						
AA + GG	135 (49.8)	26 (51)	1.00			
AG	136 (50.2)	25 (49)	0.95 (0.52-1.74)	0.88	287.3	
Log-aditivni						
-	-	-	1.00 (0.65-1.55)	1	287.4	

rs197414

Kodominantni						
CC	203 (75.5)	37 (72.5)	1.00			
CA	59 (21.9)	11 (21.6)	1.02 (0.49-2.13)	0.54	287.4	
AA	7 (2.6)	3 (5.9)	2.33 (0.57-9.56)			
Dominantni						
CC	203 (75.5)	37 (72.5)	1.00			
CA+AA	66 (24.5)	14 (27.4)	1.16 (0.59-2.28)	0.67	286.5	
Recesivni						
CC+CA	262 (97.4)	48 (94.1)	1.00			
AA	7 (2.6)	3 (5.9)	2.32 (0.57-9.41)	0.27	285.4	
Overdominantni						
CC + AA	210 (78.1)	40 (78.4)	1.00			
CA	59 (21.9)	11 (21.6)	0.98 (0.47-2.02)	0.95	286.7	
Log-aditivni						
-	-	-	1.24 (0.71-2.16)	0.45	286.1	

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

Prilog 12. Rezultati testova asocijacije varijanti rs4961280, rs784567, rs7813 i rs197414 sa rizikom za progresiju KP precenjenim prema kriterijumima Medeiros-a i saradnika.

Genetička varijanta	Genetički model	Rizik za progresiju KP				AIC
		Nizak rizik (%)	Visok rizik (%)	OR (95% CI) ^a	P vrednost ^a	
rs4961280						
	Kodominantni					
	CC	96 (67.6)	117 (62.6)	1.00		
	CA	42 (29.6)	61 (32.6)	1.20 (0.74-1.94)	0.52	453.7
	AA	4 (2.8)	9 (4.8)	1.77 (0.53-5.98)		
	Dominantni					
	CC	96 (67.6)	117 (62.6)	1.00		
	CA+AA	46 (32.4)	70 (37.4)	1.25 (0.79-1.99)	0.34	452.1
	Recesivni					
	CC+CA	138 (97.2)	178 (95.2)	1.00		
	AA	4 (2.8)	9 (4.8)	1.67 (0.50-5.59)	0.39	452.3
	Overdominantni					
	CC + AA	100 (70.4)	126 (67.4)	1.00		
	CA	42 (29.6)	61 (32.6)	1.16 (0.72-1.87)	0.53	452.6
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.25 (0.84-1.85)	0.27	451.8
rs784567						
	Kodominantni					
	GG	39 (27.5)	53 (28.3)	1.00		
	GA	65 (45.8)	95 (50.8)	1.09 (0.65-1.84)	0.47	453.5
	AA	38 (26.8)	39 (20.9)	0.77 (0.42-1.43)		
	Dominantni					
	GG	39 (27.5)	53 (28.3)	1.00		
	GA+AA	103 (72.5)	134 (71.7)	0.97 (0.60-1.59)	0.92	453
	Recesivni					
	GG+GA	104 (73.2)	148 (79.1)	1.00		
	AA	38 (26.8)	39 (20.9)	0.73 (0.44-1.23)	0.24	451.6
	Overdominantni					
	GG + AA	77 (54.2)	92 (49.2)	1.00		
	GA	65 (45.8)	95 (50.8)	1.23 (0.79-1.90)	0.36	452.2
	Log-aditivni					
	-	-	-	0.89 (0.65-1.21)	0.44	452.4
rs7813						
	Kodominantni					
	AA	42 (29.6%)	65 (34.8%)	1.00		
	AG	80 (56.3%)	87 (46.5%)	0.71 (0.43-1.16)	0.18	451.6
	GG	20 (14.1%)	35 (18.7%)	1.18 (0.60-2.33)		
	Dominantni					
	AA	42 (29.6%)	65 (34.8%)	1.00		
	AG+GG	100 (70.4%)	122 (65.2%)	0.80 (0.50-1.29)	0.36	452.2
	Recesivni					
	AA+AG	122 (85.9%)	152 (81.3%)	1.00		
	GG	20 (14.1%)	35 (18.7%)	1.46 (0.80-2.68)	0.21	451.4
	Overdominantni					
	AA + GG	62 (43.7%)	100 (53.5%)	1.00		
	AG	80 (56.3%)	87 (46.5%)	0.67 (0.43-1.04)	0.074 ^b	449.8
	Log-aditivni					
	-	-	-	1.01 (0.73-1.39)	0.96	453

rs197414

Kodominantni						
CC	107 (75.3)	142 (76.8)	1.00			
CA	32 (22.5)	36 (19.5)	0.87 (0.51-1.50)	0.49		451.4
AA	3 (2.1)	7 (3.8)	2.03 (0.50-8.15)			
Dominantni						
CC	107 (75.3)	142 (76.8)	1.00			
CA+AA	35 (24.6)	43 (23.2)	0.96 (0.57-1.61)	0.89		450.8
Recesivni						
CC+CA	139 (97.9)	178 (96.2)	1.00			
AA	3 (2.1)	7 (3.8)	2.09 (0.52-8.37)	0.28		449.7
Overdominantni						
CC + AA	110 (77.5)	149 (80.5)	1.00			
CA	32 (22.5)	36 (19.5)	0.85 (0.49-1.45)	0.55		450.5
Log-aditivni						
-	-	-	1.05 (0.68-1.63)	0.81		450.8

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

Prilog 13. Rezultati testova asocijacije genetičkih varijanti rs2910164, rs11614913 i rs895819 sa rizikom za progresiju KP procenjenim prema kriterijumima *D'Amico*-a i saradnika.

Genetički model	Nizak (%)	Srednji (%)	Visok (%)	Srednji vs. nizak rizik			Visok vs. nizak rizik			Visok vs. srednji rizik		
				OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	<i>P</i> vrednost ^a	AIC
rs3742330												
Kodominantni												
AA	19 (86.4)	87 (76.3)	164 (83.2)	1.00			1.00			1.00	0.21	406.3
AG	2 (9.1)	24 (21.1)	31 (15.7)	2.63 (0.57-12.12)	0.35	126.3	1.70 (0.38-7.73)	0.37	147.4	0.65 (0.36-1.18)		
GG	1 (4.5)	3 (2.6)	2 (1)	0.67 (0.07-6.87)			0.20 (0.02-2.37)			0.35 (0.06-2.19)		
Dominantni												
AA	19 (86.4)	87 (76.3)	164 (83.2)	1.00			1.00			1.00	0.1	404.8
AG+GG	3 (13.6)	27 (23.7)	33 (16.8)	1.98 (0.54-7.24)	0.27	125.1	1.20 (0.33-4.33)	0.77	147.3	0.62 (0.34-1.10)		
Recesivni												
AA+AG	21 (95.5)	111 (97.4)	195 (99)	1.00			1.00			1.00	0.29	406.3
GG	1 (4.5)	3 (2.6)	2 (1)	0.58 (0.06-5.86)	0.66	126.2	0.18 (0.01-2.20)	0.23	145.9	0.38 (0.06-2.37)		
Overdominantni												
AA + GG	20 (90.9)	90 (79)	166 (84.3)	1.00			1.00			1.00	0.18	405.6
AG	2 (9.1)	24 (21.1)	31 (15.7)	2.68 (0.58-12.28)	0.16	124.4	1.78 (0.39-8.06)	0.42	146.7	0.66 (0.36-1.21)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.46 (0.51-4.18)	0.45	125.8	0.92 (0.32-2.65)	0.88	147.3	0.63 (0.38-1.06)	0.081 ^b	404.4
rs4961280												
Kodominantni												
CC	14 (63.6)	71 (61.7)	132 (66.7)	1.00			1.00			1.00		
CA	8 (36.4)	40 (34.8)	57 (28.8)	0.98 (0.38-2.55)	0.48	127.3	0.75 (0.30-1.89)	0.32	147.3	0.76 (0.46-1.26)	0.54	411
AA	0 (0)	4 (3.5)	9 (4.5)	NA (0.00-NA)			NA (0.00-NA)			1.14 (0.33-3.89)		
Dominantni												
CC	14 (63.6)	71 (61.7)	132 (66.7)	1.00			1.00			1.00	0.36	409.4
CA+AA	8 (36.4)	44 (38.3)	66 (33.3)	1.08 (0.42-2.80)	0.87	126.7	0.87 (0.35-2.18)	0.76	147.5	0.80 (0.49-1.29)		
Recesivni												
CC+CA	22 (100)	111 (96.5)	189 (95.5)	1.00			1.00			1.00	0.72	410.2
AA	0 (0)	4 (3.5)	9 (4.5)	NA (0.00-NA)	0.23	125.3	NA (0.00-NA)	0.17	145.6	1.24 (0.37-4.21)		
Overdominantni												
CC + AA	14 (63.6)	75 (65.2)	141 (71.2)	1.00			1.00			1.00	0.27	409.1
CA	8 (36.4)	40 (34.8)	57 (28.8)	0.93 (0.36-2.41)	0.88	126.7	0.70 (0.28-1.77)	0.46	147	0.76 (0.46-1.24)		
Log-aditivni												
-	-	-	-	1.21 (0.51-2.85)	0.67	126.5	1.04 (0.47-2.31)	0.92	147.6	0.87 (0.58-1.31)	0.51	409.8

rs784567													
Kodominantni													
GG	8 (36.4)	28 (24.4)	58 (29.3)	1.00			1.00			1.00			
GA	8 (36.4)	58 (50.4)	97 (49)	2.07 (0.70-6.08)	0.42	126.9	1.26 (0.42-3.83)	0.36	147.5	0.85 (0.49-1.49)	0.77	411.8	
AA	6 (27.3)	29 (25.2)	43 (21.7)	1.38 (0.42-4.48)			0.59 (0.19-1.83)			0.79 (0.41-1.54)			
Dominantni													
GG	8 (36.4)	28 (24.4)	58 (29.3)	1.00			1.00			1.00			
GA+AA	14 (63.6)	87 (75.7)	140 (70.7)	1.77 (0.67-4.66)	0.26	125.4	0.93 (0.34-2.50)	0.88	147.5	0.84 (0.49-1.41)	0.5	409.8	
Recesivni													
GG+GA	16 (72.7)	86 (74.8)	155 (78.3)	1.00			1.00			1.00			
AA	6 (27.3)	29 (25.2)	43 (21.7)	0.90 (0.32-2.52)	0.84	126.7	0.51 (0.20-1.31)	0.17	145.7	0.88 (0.51-1.52)	0.65	410.1	
Overdominantni													
GG + AA	14 (63.6)	57 (49.6)	101 (51)	1.00			1.00			1.00			
GA	8 (36.4)	58 (50.4)	97 (49)	1.78 (0.69-4.56)	0.23	125.2	1.65 (0.66-4.12)	0.28	146.4	0.95 (0.60-1.51)	0.83	410.2	
Log-aditivni													
-	-	-	-	1.21 (0.64-2.29)	0.55	126.4	0.75 (0.40-1.38)	0.35	146.7	0.89 (0.64-1.24)	0.49	409.8	
rs7813													
Kodominantni													
AA	5 (22.7)	40 (34.8)	64 (32.3)	1.00			1.00			1.00			
AG	13 (59.1)	54 (47)	102 (51.5)	0.52 (0.17-1.57)	0.48	127.3	0.60 (0.20-1.78)	0.64	148.7	1.21 (0.72-2.03)	0.74	411.7	
GG	4 (18.2)	21 (18.3)	32 (16.2)	0.65 (0.16-2.69)			0.67 (0.17-2.70)			1.01 (0.51-2.01)			
Dominantni													
AA	5 (22.7)	40 (34.8)	64 (32.3)	1.00			1.00			1.00			
AG+GG	17 (77.3)	75 (65.2)	134 (67.7)	0.55 (0.19-1.60)	0.25	125.4	0.62 (0.22-1.76)	0.35	146.7	1.15 (0.71-1.89)	0.57	410	
Recesivni													
AA+AG	18 (81.8)	94 (81.7)	166 (83.8)	1.00			1.00			1.00			
GG	4 (18.2)	21 (18.3)	32 (16.2)	1.00 (0.31-3.27)	1	126.7	0.94 (0.29-3.00)	0.92	147.6	0.91 (0.49-1.67)	0.75	410.2	
Overdominantni													
AA + GG	9 (40.9)	61 (53)	96 (48.5)	1.00			1.00			1.00			
AG	13 (59.1)	54 (47)	102 (51.5)	0.61 (0.24-1.54)	0.29	125.6	0.71 (0.29-1.74)	0.44	147	1.20 (0.75-1.92)	0.44	409.7	
Log-aditivni													
-	-	-	-	0.78 (0.41-1.50)	0.46	126.2	0.80 (0.42-1.53)	0.5	147.1	1.04 (0.74-1.45)	0.83	410.2	

rs197414

Kodominantni												
CC	18 (81.8)	88 (76.5)	149 (76)	1.00			1.00			1.00		
CA	2 (9.1)	26 (22.6)	40 (20.4)	2.65 (0.58-12.18)	0.051 ^b	122.8	2.67 (0.59-12.14)	0.24	146.3	0.90 (0.51-1.57)	0.27	414.5
AA	2 (9.1)	1 (0.9)	7 (3.6)	0.10 (0.01-1.18)			0.51 (0.09-2.72)			4.13 (0.50-34.17)		
Dominantni												
CC	18 (81.8)	88 (76.5)	149 (76)	1.00			1.00			1.00		
CA+AA	4 (18.2)	27 (23.5)	47 (24)	1.38 (0.43-4.42)	0.58	126.4	1.60 (0.51-5.07)	0.4	146.5	1.01 (0.59-1.75)	0.96	415.2
Recesivni												
CC+CA	20 (90.9)	114 (99.1)	189 (96.4)	1.00			1.00			1.00		
AA	2 (9.1)	1 (0.9)	7 (3.6)	0.12 (0.01-1.01)	0.05 ^b	122.8	0.43 (0.08-2.24)	0.35	146.3	4.23 (0.51-34.88)	0.12	412.7
Overdominantni												
CC + AA	20 (90.9)	89 (77.4)	156 (79.6)	1.00			1.00			1.00		
CA	2 (9.1)	26 (22.6)	40 (20.4)	2.92 (0.64-13.31)	0.12	124.3	2.83 (0.63-12.77)	0.13	144.9	0.86 (0.49-1.51)	0.61	414.9
Log-aditivni												
-	-	-	-	0.88 (0.35-2.21)	0.79	126.6	1.11 (0.47-2.59)	0.81	147.1	1.13 (0.70-1.82)	0.61	414.9

^a Rezultati podešeni prema starosti ispitanika.

^b Statistički trend značajnosti.

Prilog 14. Rezultati ponovljenog testa odstupanja od Hardy-Vajnbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi za genetičke varijante u genima za mikroRNK i za proteine utišavajućeg kompleksa nakon isključenja uzoraka za koje nisu utvrđeni genotipovi svih analiziranih genetičkih varijanti.

Genetička varijanta	P vrednost
rs2910164	0.4
rs3746444	0.92
rs11614913	0.79
rs895819	0.22
rs3742330	0.22
rs4961280	0.5
rs784567	0.10
rs7813	0.11
rs197414	0.27

Prilog 15. Karakteristike studija i studijskih panela isključenih iz meta-analize zbog značajnih odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže u kontrolnoj grupi.

Autori [ref]	Godina	Država	Etničko poreklo	Tip karcinoma	Tip kontrolne grupe	Metod genotipizacije	Broj bolesnika / broj kontrola	Distribucija genotipova rs2910164 kod bolesnika			Distribucija genotipova rs2910164 kod kontrola			Učestalost alela C u kontrolnoj grupi	P_{HWE} u kontrolnoj grupi
								GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Catucci et al. (Italy) [132]	2010	Italija	Evropsko	dojke, familijarni	zdravi	sekvenciranje	754/1243	409	286	59	650	520	73	0.268	0.019
George et al. [101]	2011	Indija	Azijsko	prostate	zdravi	PCR-RFLP	159/230	4	79	76	7	107	116	0.737	0.002
Mittal et al. [133]	2011	Indija	Azijsko	beške	zdravi	PCR-RFLP	212/250	127	79	6	135	108	7	0.244	0.007
Zhang et al. [134]	2011	Kina	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	PIRA-PCR	925/1593	156	450	319	291	725	577	0.590	0.017
Esteban Cardenosa et al. [135]	2012	Španija	Evropsko	dojke i jajnika, sporadični	zdravi	analiza krivih topljenja	198/189	107	77	14	104	80	5	0.238	0.021
Esteban Cardenosa et al. [135]	2012	Španija	Evropsko	dojke i jajnika, familijarni	zdravi	analiza krivih topljenja	340/189	192	124	24	104	80	5	0.238	0.021
Shan et al. [136]	2013	Kina	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	PCR-CTPP	172/185	28	62	82	36	71	78	0.614	0.009
Yamashita et al. [137]	2013	Japan	Azijsko	maligni melanom	zdravi	PCR-RFLP	50/107	0	35	15	3	53	51	0.724	0.013
Omrani et al. [138]	2014	Iran	Azijsko	dojke	zdravi	T-ARMS-PCR	236/203	183	45	8	155	39	9	0.140	0.004
Palmieri et al. (kontrola iz studije autora Fenoglio et al. [140]) [139]	2014	Italija (Fenoglio et al.)	Evropsko	grla, skvamoznih ćelija	zdravi	TaqMan esej	337/339	197	121	19	195	115	29	0.255	0.048
Qi et al. [120]	2014	Kina	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	HRMA	314/407	0	165	149	3	244	159	0.692	< 0.001
Zhou et al. [141]	2014	Kina	Azijsko	hepatocelularni	zdravi	PCR-RFLP	266/281	40	153	73	30	154	97	0.619	0.007

Skraćenice u tabeli: PIRA-PCR – PCR sa uvođenjem restrikcionih mesta pomoću prajmera; PCR-CTPP – alel-specifični PCR sa suprotno usmerenim parovima prajmera; T-ARMS-PCR – sistem za analizu mutacija pomoću alel-specifičnog PCR-a sa četiri prajmera.

Prilog 16. Metodološki kvalitet studija uključenih u meta-analizu prema Njukasl-Otava skali.

Autori [ref]	Godina	Da li je definicija bolesnika adekvatna?	Reprezentativnost bolesnika	Izbor kontrola	Definicija kontrola	Izjednačavanje grupe bolesnika sa kontrolnom grupom	Potvrda genotipova	Izjednačavanje metoda za određivanje genotipova bolesnika i kontrola	Sličnost procenta potencijalnih učesnika koji nisu uključeni u studiju (ili isključenih usled neodređenih genotipova) kod bolesnika i kontrola	Ukupno
Horikawa et al. [145]	2008	*	*	-	*	**	*	*	-	8
Jazdzewski et al. (Finska) [142]	2008	*	*	*	*	-	*	-	*	6
Jazdzewski et al. (Poljska) [142]	2008	*	*	*	*	-	*	-	*	6
Jazdzewski et al. (SAD) [142]	2008	*	*	*	*	-	*	-	*	6
Xu et al. [146]	2008	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Yang et al. [147]	2008	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Hoffman et al. [148]	2009	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Hu et al. [149]	2009	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Tian et al. [150]	2009	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Catucci et al. (Nemačka) [132]	2010	*	-	-	*	*	*	*	*	7
Guo et al. [151]	2010	*	*	*	*	**	*	*	*	8
Liu et al. [152]	2010	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Okubo et al. [143] (kontrola sa čišćenjem želuca)	2010	*	*	*	*	**	*	*	-	7
Okubo et al. [143] (zdrave kontrole)	2010	*	*	-	*	**	*	*	-	7
Pastrello et al. [153]	2010	*	-	-	*	-	*	*	*	6
Srivastava et al. [154]	2010	*	*	*	*	**	*	*	*	9
Xu et al. [100]	2010	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Zeng et al. [155]	2010	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Akkiz et al. [156]	2011	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Garcia et al. [157]	2011	*	-	-	*	*	*	*	*	6
Hishida et al. [158]	2011	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Permuth-Wey et al. [159]	2011	*	*	-	*	-	*	*	*	7

Vinci et al. [160]	2011	*	*	-	*	-	*	*	*	6
Yue et al. [161]	2011	*	*	*	*	**	*	*	*	8
Zhou et al. [162]	2011	*	*	-	*	-	*	*	*	6
Chu et al. [163]	2012	*	-	*	-	**	*	*	*	7
Hezova et al. [164]	2012	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Jones et al. [165]	2012	*	*	-	*	-	*	-	*	6
Kim et al. [166]	2012	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Mihalache et al. [167]	2012	*	*	-	*	-	*	*	*	6
Min et al. [168]	2012	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Wang et al. [169]	2012	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Xiang et al. [170]	2012	*	*	*	*	-	*	*	*	6
Zhou et al. [171]	2012	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Zhou et al. [172]	2012	*	*	*	*	**	*	*	*	8
Ahn et al. [173]	2013	*	*	*	*	**	*	*	*	8
Chae et al. [174]	2013	*	*	*	*	**	*	*	*	8
Lung et al. [144]	2013	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Lung et al. [144] (starije kontrole)	2013	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Lv et al. [175]	2013	*	*	-	*	-	*	*	*	7
Ma et al. [176]	2013	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Marino et al. [177]	2013	*	*	-	*	-	*	*	*	6
Orsos et al. [178]	2013	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Pavlakis et al. [179]	2013	*	*	*	*	-	*	*	*	6
Song et al. [180] ^a	2013	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Vinci et al. [181]	2013	*	*	*	*	**	*	*	*	8
Wei et al. [182]	2013	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Wei et al. [183]	2013	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Zhang et al. [184]	2013	*	*	*	*	**	*	*	*	9
Chu et al. [185]	2014	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Cong et al. [186]	2014	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Dikeakos et al. [187]	2014	*	*	-	*	-	*	*	*	7

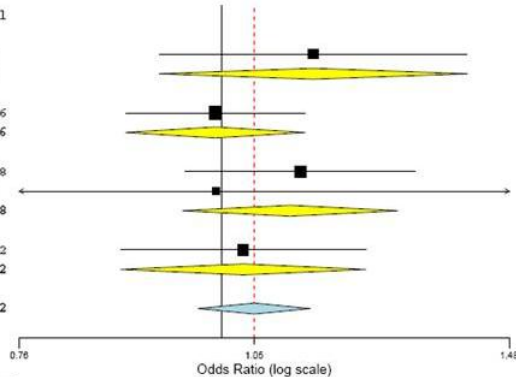
Du et al. [188]	2014	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Hu et al. [189]	2014	*	*	-	*	-	*	*	-	5
Huang et al. [190]	2014	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Jeon et al. [191]	2014	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Jia et al. [192]	2014	*	*	*	*	-	*	*	*	6
Kupcinskas et al. [193]	2014	*	*	-	*	**	*	*	*	8
Kupcinskas et al. [194]	2014	*	*	*	-	**	*	*	*	8
Mao et al. [195]	2014	*	*	-	*	**	*	*	*	9
Nikolic et al. [196]	2014	*	*	-	*	*	*	*	*	7
Palmieri et al. [139] (kontrola iz Toskane, HapMap)	2014	*	*	-	*	-	*	-	*	5
Palmieri et al. [139] (kontrola iz Marino et al. [177])	2014	*	*	-	*	-	*	-	*	5
Palmieri et al. [139] (kontrola iz Manna et al. [197])	2014	*	*	-	*	-	*	*	*	6
Parlayan et al. [131] (karcinom želuca)	2014	*	-	-	*	**	*	*	*	7
Parlayan et al. [131] (karcinom pluća)	2014	*	-	*	*	**	*	*	*	7
Parlayan et al. [131] (karcinom prostate)	2014	*	-	-	*	**	*	*	*	7
Pu et al. [198]	2014	*	*	*	*	**	*	*	*	8
Qu et al. [199]	2014	*	*	*	*	**	*	*	*	9

^a Studija uključena u meta-analizu za dominantni genetički model asocijacije.

Prilog 17. Podgrupna meta-analiza u kojoj su studije i studijski paneli stratifikovani na osnovu tipa malignog tumora i etničkog porekla ispitanika. A) Karcinom dojke; B) Karcinom želuca; C) Karcinomi glave i vrata; D) Karcinom pluća; E) Karcinom štitne žlezde; F) Karcinom prostate; G) Karcinom jetre; H) Karcinom debelog creva.

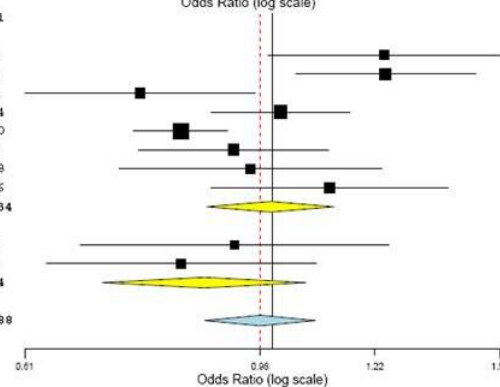
A

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Hoffman et al. [148]	1.134 (0.919, 1.399)	234/878	232/956
Subgroup mixed (I²=NA, P=NA)	1.134 (0.919, 1.399)	234/878	232/956
Hu et al. [149]	0.992 (0.877, 1.121)	1173/2018	1275/2186
Subgroup Asian (I²=NA, P=NA)	0.992 (0.877, 1.121)	1173/2018	1275/2186
Catucci et al. [132] (Germany)	1.114 (0.952, 1.303)	404/1610	418/1808
Pastrello et al. [153]	0.993 (0.651, 1.514)	46/202	71/310
Subgroup Caucasian (I²=0%, P=0.616)	1.098 (0.948, 1.273)	450/1812	489/2118
Garcia et al. [157]	1.030 (0.871, 1.218)	520/2260	268/1192
Subgroup not specified (I²=NA, P=NA)	1.030 (0.871, 1.218)	520/2260	268/1192
Overall (I²=0%, P=0.737)	1.046 (0.969, 1.129)	2377/6968	2264/6452



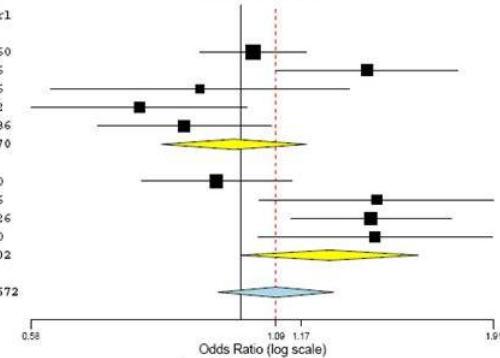
B

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Okubo et al. [143] (controls with ulcer diseases)	1.247 (0.992, 1.568)	715/1104	255/428
Okubo et al. [143] (healthy controls)	1.250 (1.046, 1.494)	715/1104	575/966
Zeng et al. [155]	0.769 (0.612, 0.966)	331/608	370/608
Hishida et al. [158]	1.015 (0.884, 1.166)	731/1166	2041/3274
Zhou et al. [172]	0.833 (0.758, 0.915)	1394/3372	1737/3790
Ahn et al. [173]	0.925 (0.766, 1.116)	549/922	549/894
Parlayan et al. [131] (gastric cancer)	0.957 (0.738, 1.240)	201/320	669/1048
Pu et al. [198]	1.119 (0.885, 1.415)	226/394	560/1026
Subgroup Asian (I²=75.21%, P=0.000)	0.995 (0.877, 1.129)	4862/8990	6756/12034
Dikeakos et al. [187]	0.927 (0.683, 1.259)	255/326	763/960
Kupcinskas et al. [193]	0.834 (0.638, 1.089)	126/724	140/694
Subgroup Caucasian (I²=0%, P=0.608)	0.873 (0.714, 1.068)	381/1050	903/1654
Overall (I²=69.13%, P=0.001)	0.975 (0.874, 1.088)	5243/10040	7659/13688



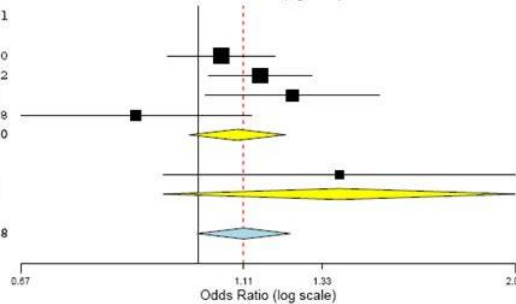
C

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Liu et al. [152]	1.030 (0.899, 1.181)	547/2218	545/2260
Orsos et al. [178]	1.380 (1.093, 1.742)	200/936	154/936
Palmieri et al. [139] (controls from Tuscany, HapMap)	0.899 (0.613, 1.318)	159/674	45/176
Palmieri et al. [139] (controls from Marino et al.)	0.769 (0.583, 1.016)	159/674	118/412
Palmieri et al. [139] (controls from Manna et al.)	0.864 (0.691, 1.080)	159/674	286/1086
Subgroup Caucasian (I²=68.97%, P=0.012)	0.981 (0.814, 1.183)	1224/5176	1148/4870
Chu et al. [163]	0.939 (0.774, 1.138)	590/940	546/850
Lung et al. [144]	1.416 (1.048, 1.913)	322/458	204/326
Lung et al. [144] (elderly controls)	1.395 (1.135, 1.714)	322/458	4547/7226
Huang et al. [190]	1.410 (1.044, 1.904)	201/320	218/400
Subgroup Asian (I²=71.56%, P=0.014)	1.254 (0.998, 1.575)	1435/2176	5515/8802
Overall (I²=72.68%, P=0.000)	1.093 (0.942, 1.268)	2659/7352	6663/13672



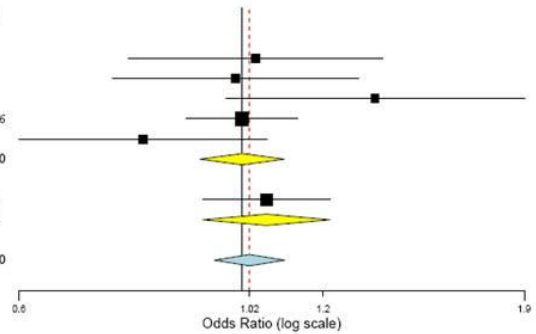
D

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Tian et al. [150]	1.055 (0.933, 1.193)	886/2116	840/2070
Jeon et al. [191]	1.154 (1.024, 1.300)	1236/2182	1164/2192
Jia et al. [192]	1.242 (1.018, 1.516)	490/800	448/800
Parlayan et al. [131] (lung cancer)	0.867 (0.665, 1.130)	179/296	669/1048
Subgroup Asian (I²=46.42%, P=0.133)	1.094 (0.980, 1.222)	2791/5394	3121/6110
Vinci et al. [160]	1.383 (0.923, 2.074)	66/202	67/258
Subgroup Caucasian (I²=NA, P=NA)	1.383 (0.923, 2.074)	66/202	67/258
Overall (I²=40.95%, P=0.148)	1.110 (0.997, 1.236)	2857/5596	3188/6368



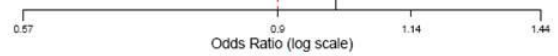
E

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Jazdzewski et al. (Finland) [142]	1.032 (0.772, 1.378)	110/412	143/548
Jazdzewski et al. (Poland) [142]	0.986 (0.746, 1.304)	90/402	215/950
Jazdzewski et al. (USA) [142]	1.355 (0.964, 1.904)	119/402	72/304
Jones et al. [165]	1.001 (0.882, 1.136)	353/1496	2857/12116
Marino et al. [177]	0.798 (0.602, 1.059)	149/614	118/412
Subgroup Caucasian (I²=NA, P=0.234)	1.001 (0.909, 1.102)	821/3326	3405/14330
Wei et al. [182]	1.058 (0.915, 1.223)	911/1506	899/1520
Subgroup Asian (I²=NA, P=NA)	1.058 (0.915, 1.223)	911/1506	899/1520
Overall (I²=NA, P=0.311)	1.018 (0.940, 1.103)	1732/4832	4304/15850



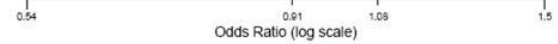
F

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Xu et al. [100]	0.728 (0.572, 0.927)	231/502	302/560
Parlayan et al. [131] (prostate cancer)	1.034 (0.742, 1.441)	115/178	669/1048
Subgroup Asian (I²=64.3%, P=0.094)	0.851 (0.605, 1.198)	346/680	971/1608
Nikolic et al. [196]	1.038 (0.752, 1.432)	114/572	77/398
Subgroup Caucasian (I²=NA, P=NA)	1.038 (0.752, 1.432)	114/572	77/398
Overall (I²=53.1%, P=0.119)	0.901 (0.702, 1.157)	460/1252	1048/2006



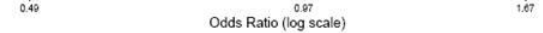
G

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Xu et al. [146]	0.788 (0.658, 0.945)	557/958	643/1008
Kim et al. [166]	1.048 (0.772, 1.421)	202/318	251/402
Xiang et al. [170]	0.802 (0.541, 1.188)	101/200	112/200
Zhou et al. [171]	1.006 (0.788, 1.282)	220/372	570/966
Zhang et al. [184]	0.915 (0.806, 1.038)	1165/1994	1209/1996
Chu et al. [185]	1.140 (0.875, 1.487)	250/376	428/674
Cong et al. [186]	0.729 (0.543, 0.978)	273/412	318/436
Subgroup Asian (I²=0%, P=0.162)	0.904 (0.834, 0.980)	2768/4630	3531/5682
Akkiz et al. [156]	1.086 (0.785, 1.502)	95/444	89/444
Subgroup Caucasian (I²=NA, P=NA)	1.086 (0.785, 1.502)	95/444	89/444
Overall (I²=0%, P=0.169)	0.914 (0.845, 0.988)	2863/5074	3620/6126



H

Studies	Estimate (95% C.I.)	Ev/Trt	Ev/Ctrl
Hezova et al. [164]	1.056 (0.764, 1.461)	94/394	97/424
Vinci et al. [181]	1.157 (0.824, 1.626)	91/320	91/356
Kupcinskis et al. [194]	0.682 (0.489, 0.953)	54/384	164/848
Subgroup Caucasian (I²=63.32%, P=0.065)	0.941 (0.685, 1.293)	239/1098	352/1628
Min et al. [168]	0.924 (0.768, 1.112)	535/892	621/1004
Chae et al. [174]	1.391 (1.157, 1.673)	494/798	612/1136
Lv et al. [175]	0.798 (0.656, 0.970)	324/662	560/1026
Ma et al. [176]	0.865 (0.770, 0.973)	872/2294	998/2406
Hu et al. [189]	0.973 (0.757, 1.251)	250/400	471/746
Mao et al. [195]	0.996 (0.840, 1.181)	663/1094	681/1122
Subgroup Asian (I²=77.63%, P=0.000)	0.973 (0.835, 1.134)	3138/6140	3943/7440
Overall (I²=71.25%, P=0.001)	0.965 (0.847, 1.100)	3377/7238	4295/9068



Stručna biografija

Zorana Z. Nikolić rođena je 22.09.1988. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije u trajanju od tri godine, odnosno 6 semestara, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2007/2008 godine i završila u roku sa prosečnom ocenom 9.77. Školske 2010/2011 godine upisala je master studije na istom fakultetu, smer Molekularna biologija i fiziologija, modul Humana molekularna genetika. Master studije u trajanju od 2 godine, odnosno 4 semestara, završila je u roku, sa prosečnom ocenom 10.00. Master tezu pod nazivom „Asocijacija genetičke varijante rs3787016 sa karcinomom prostate u populaciji Srbije“ odbranila je u julu 2012. godine. Godine 2012. upisana je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota.

2013. godine birana je u zvanje istraživač pripravnik i iste godine unapređena u zvanje istraživač saradnik. Od školske 2012/13 godine angažovana je u realizaciji praktičnih vežbi iz predmeta „Molekularna biologija eukariota“, obaveznom kursu na četvrtoj godini studija modula Molekularna biologija i fiziologija. Takođe, u 2014/2015 i 2015/2016 školskoj godini učestvovala je u teorijskoj nastavi na predmetu „Molekularna biologija maligne ćelije“ na modulu Humana molekularna genetika master studija Biološkog fakulteta.

Od 2012. godine publikovano je deset radova iz oblasti molekularne osnove karcinoma prostate u kojima je navedena kao jedan od autora (četiri kategorije M21, četiri kategorije M22 i dva kategorije M23). Od navedenih radova, u šest radova je prvi autor i u još jednom deli prvo autorstvo. Jedanaesti rad rezultat je istraživanja vezanih za retke bolesti (M21). Prvi je autor i poglavlja u knjizi međunarodnog značaja (M44). Autor je osam saopštenja na kongresima međunarodnog značaja štampanih u izvodu, kao i tri saopštenja na kongresima nacionalnog značaja štampanih u izvodu. Radovi Zorane Nikolić do oktobra 2016. godine citirani su 28 puta u časopisima kategorije M20 (bez autocitata).

KBC "DR DRAGIŠA MIŠOVIĆ-DEDINJE"

Heroja Milana Tepića 1

Broj: 01-1907/17

Datum: 11.02.2011.godine

ZAPISNIK

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

Prisutni članovi:

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

Odsutni članovi:

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

Posle glasanja članovi Etičkog odbora su doneli sledeću

ODLUKU

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

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

Dostavljena je sledeća dokumentacija:

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

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

ZAPISNIK VODILA

Ljiljana Marčetić

PREDSEDNIK ETIČKOG ODBORA,

Prof.dr Vladimir Diligenski



KBC „DR DRAGIŠA MIŠOVIĆ-DEDINJE“

Heoja Milana Tepića 1

Broj: 18-5309/29

Datum: 17.04.2013.godine

Na osnovu odredbe člana 148a Zakona o zdravstvenoj zaštiti („Službeni glasnik RS“ 107/2005, 88/2010, 99/2010 i 57/2011) i odredbe člana 38-39 Statuta KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ Etički odbor na sednici održanoj 17.04.2013.godine sa početkom u 12:00 časova u prostorijama Biblioteke Ustanove doneo je sledeću

ODLUKU

Usvaja se Molba Prof.dr Vinke Vukotić za nastavak učešća u projektu.

O b r a z l o ž e n j e

Naziv projekta - analiza promena u strukturi genoma kao dijagnostički i prognostički parameta humanih bolesti – Evidencini broj 173016 – odobren za finansiranje od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Jedan od saradnika u projektu je prof dr Vinka Vukotić

Obaveze su da se pacijentima pres biopsiju prostate uzme uzorak krvi za šta potpisuju saglasnost. Ispitivanje je sada rezultiralo sa 3 objavljena rada.

U donošenju predmetne odluke učestvovali su, posle glasanja, sledeći članovi Etičkog odbora:

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

Etički odbor KBC „Dr Dragiša Mišović-Dedinje“ radi po principima GCP/ICH.

ZAPISNIK VODILA,

PREDSEDNIK ETIČKOG ODBORA,

Ljiljana Marčetić

Prof.dr Vladimir Diligenski

Ljiljana Marčetić





Assessment of association between genetic variants in microRNA genes *hsa-miR-499*, *hsa-miR-196a2* and *hsa-miR-27a* and prostate cancer risk in Serbian population



Z. Nikolić^a, D. Savić Pavičević^a, N. Vučić^a, S. Cidilko^a, N. Filipović^b, S. Cerović^c, V. Vukotić^b, S. Romac^a, G. Brajušković^{a,*}

^a University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade, Serbia

^b Department of Urology, Clinical Centre "dr Dragiša Mišović", Belgrade, Serbia

^c Institute of Pathology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2015

Accepted 18 June 2015

Available online 22 June 2015

Keywords:

Prostate cancer

MicroRNA

Association study

miR-499

miR-196a2

miR-27a

ABSTRACT

Due to their potentially functional significance, genetic variants within microRNA genes have been recognized as candidates for cancer-related genetic biomarkers. Among the most extensively studied so far are rs3746444, rs11614913 and rs895819. Nevertheless, only few previous studies in Asian population analyzed the association of rs3746444 and rs11614913 with prostate cancer (PCa) risk, while rs895819 was not evaluated in relation to this issue. The aim of this study was to assess the possible association between these genetic variants and PCa risk and progression in Serbian population. 355 samples of peripheral blood were obtained from the patients with PCa and 353 samples from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). 312 volunteers derived from general population who gave samples of buccal swabs were included in the control group. Genotyping of rs3746444, rs11614913 and rs895819 was performed by using PCR-RFLP method, HRM analysis and allele-specific PCR, respectively. Allelic and genotypic associations were evaluated by unconditional linear (for serum PSA level in PCa patients) and logistic regression method with adjustment for age. Minor allele C of rs895819 was found to be associated with the increased risk of developing PCa under dominant ($P = 0.035$; OR = 1.38, 95%CI 1.02–1.86) and overdominant ($P = 0.04$; OR = 1.37, 95%CI 1.01–1.85) genetic model. Same genetic variant was found to be associated with the clinical stage of localized PCa, as well as with the presence of distant metastases. Allele G of rs3746444 was also shown to be associated with the decreased risk of PCa progression. According to our data, rs3746444 qualifies for a genetic variant potentially associated with PCa aggressiveness in Serbian population. Furthermore, our study provided the first evidence of association between rs895819 and PCa risk, as well as for its genetic association with the presence of distant metastases among PCa patients.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

According to recent projections based on GLOBOCAN 2012 report, global cancer burden is expected to substantially increase within the next decade (Ferlay et al., 2015). Being the second leading cancer in terms of incidence and ranking sixth among causes of cancer-related death worldwide, prostate cancer (PCa) is due to significantly contribute to this growing public health problem (Bray et al., 2012; Ferlay et al., 2015). Among diagnosed tumors, clinically inapparent latent

prostate adenocarcinomas which do not require aggressive therapy, but active surveillance, represent a significant proportion (Van der Kwast and Roobol, 2013). Therefore, identification of genetic variants contributing not only to cancer susceptibility, but also to PCa aggressiveness has become one of the imperatives in research activity regarding prostate carcinogenesis. These genetic variants are considered to be potential nonstandard prognostic parameters of PCa that could be implemented in algorithms used for assessing the risk of PCa development, as well as for evaluating the risk of PCa progression and outcome prediction (Goh and Eeles, 2014; Helfand and Catalona, 2014).

Although large genome-wide association studies (GWAS) have made the major contribution to identifying genetic factors contributing to prostate cancer susceptibility, candidate-gene based approaches have also revealed multiple PCa associated regions (Goh and Eeles, 2014). Due to accumulating evidence of the involvement of regulatory mechanisms based on the activity of non-coding RNAs in prostate carcinogenesis,

Abbreviations: PCa, prostate cancer; BPH, benign prostatic hyperplasia; GWAS, genome-wide association study; PSA, prostate-specific antigen; GS, Gleason score; PCR-RFLP, restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments; HRMA, high resolution melting analysis; HW, Hardy-Weinberg equilibrium; OR, odds ratio; CI, confidence interval; AIC, Akaike information criterion.

* Corresponding author.

E-mail address: brajuskovic@bio.bg.ac.rs (G. Brajušković).

genetic variants in microRNA genes have been recognized as potential PCa susceptibility loci (Bolton et al., 2014; George et al., 2011; Nikolić et al., 2014; Xu et al., 2010). These genetic variants could influence microRNA biogenesis, stability of mature microRNA molecules, efficiency of target gene regulation, as well as target specificity, therefore, leading to aberrant expression of numerous oncogenes and tumor-suppressors (George and Mittal, 2010; Ryan et al., 2010).

Among the most extensively analyzed genetic variant in microRNA genes are rs3746444 in *hsa-miR-499* and rs11614913 in *hsa-miR-196a2* (Ma et al., 2013). The minor allele of genetic variant rs3746444 was found to cause a mismatch in the stem region of miR-499 precursor, thus potentially leading to a secondary structure alteration affecting biogenesis of mature microRNA molecules. Being located in the segment of *hsa-miR-499* gene encoding the seed region of the mature passenger microRNA strand (*hsa-miR-499-3p*), rs3746444 was hypothesized to affect its function by altering interactions with target mRNAs and target specificity (Chen et al., 2014; Hu et al., 2009). Therefore, mature passenger microRNAs originating from *hsa-miR-499* gene which bear different allelic variants could have a significantly discordant set of target mRNAs. Genetic variant rs11614913 is located in the region of *hsa-miR-196a2* encoding the passenger strand of the mature miR-196a2 (*hsa-miR-196a2-3p*). Thus, it was hypothesized that this genetic variant could affect the interaction between *hsa-miR-196a2-3p* and target mRNAs by altering the sequence of this potentially functional microRNA molecule. Furthermore, by inducing secondary structure changes, rs11614913 could affect the processing of miR-196a2 precursors (Hu et al., 2009; Ryan et al., 2010). Evidence to support this hypothesis were obtained in expression analyses showing significant differences in mature miR-196a2 levels associated with different rs11614913 genotypes (Hu et al., 2008). Due to these potential functional consequences, rs3746444 and rs11614913 were selected for numerous case-control studies on different types of malignant diseases which provided contrasting and inconclusive results (Ma et al., 2013). Not only that these genetic variants were found to be associated with the risk of developing multiple types of cancer, but also to be related to cancer prognosis (Ahn et al., 2013; Hu et al., 2008; Wang et al., 2013).

In spite of the wide range of their potential functional significance, the effect of genetic variants in genes encoding microRNA on PCa susceptibility and progression was assessed in only few studies conducted in Asian populations and our previous study involving PCa patients from Serbia (European origin). These earlier studies have provided discordant results regarding the effects of genetic variants in *hsa-miR-146a* (Nikolić et al., 2014; Parlayan et al., 2014; Xu et al., 2010) and *hsa-miR-196a2* (George et al., 2011; Parlayan et al., 2014), while for rs3746444 in *hsa-miR-499* gene analysis of association with PCa risk was conducted in a single study (George et al., 2011). The obtained findings emphasize the need for additional analyses in multiple European and non-European populations in order to make definite conclusions. To date, no other microRNA genetic variants have been analyzed in respect to their association with PCa. Nevertheless, rs895819 stands out due to its association with multiple other malignant diseases, as well as for its potential significance in regulating the biogenesis and/or function of PCa-related miR-27a (Fletcher et al., 2012; Goh and Eeles, 2014; Xu et al., 2013). This genetic variant has been identified as a SNP affecting the sequence of the miR-27a pre-microRNA terminal loop and altering its secondary structure. Therefore, rs895819 was hypothesized to influence the processing of miR-27a precursors by Drosha enzyme (Sun et al., 2010; Zeng et al., 2005). Mature miR-27a was previously found to be aberrantly expressed in PCa, leading to enhanced malignant cell growth (Fletcher et al., 2012; Porkka et al., 2007; Szczyrba et al., 2010; Volinia et al., 2006). Also, it was shown that this microRNA is androgen-regulated and stimulates the androgen signaling in a positive feedback loop (Fletcher et al., 2012).

The aim of this study was to evaluate the association of genetic variants rs11614913 in *hsa-miR-196a2* and rs3746444 in *hsa-miR-499* with PCa risk and progression in Serbian population. To our knowledge, this

is the first European population in which a case-control study on this subject was performed. Since there were no reports on the relation of rs895819 with PCa risk, we have also conducted the first study designed to provide data referring to this issue. Furthermore, we assessed the association of rs895819 with standard prognostic parameters of PCa, as well as with the risk of PCa progression.

2. Material and methods

The study used peripheral blood samples obtained from the patients treated in the period between 2009 and 2013 at Clinical Centre “Dr Dragiša Mišević Dedinje”, Belgrade, Serbia. Research was conducted with the approval of ethics committees of this medical institution. Experiments are in accordance with the Helsinki Declaration of 1975.

355 samples of peripheral blood were obtained from patients with PCa and 353 samples from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). The control group comprised 312 healthy volunteers who gave samples of buccal swabs. Written informed consent was obtained from all participants. The exclusion criteria for potential controls were the presence of any self-reported diseases and family history of PCa. Mean ages for PCa and BPH patients and controls were 69.96, 68.13 and 68.27 years, respectively. Diagnoses of PCa and BPH were made by using standard clinical procedure which included digital rectal examination, transrectal ultrasonography, abdominal and pelvic ultrasound, bone scintigraphy and radiography, serum prostate-specific antigen (PSA) level and biopsy of the prostate.

Patients with PCa were selected into groups based on the values of standard prognostic parameters – PSA at diagnosis (PSA < 10 ng/ml; 10 ng/ml ≤ PSA < 20 ng/ml; PSA > 20 ng/ml), Gleason score (GS < 7; GS = 7; GS > 7) and clinical stage (T1; T2; T3/T4). Two groups of patients were formed based on the presence of distant metastases. Based on the risk for localized cancer progression, three groups of patients were formed, according to D’Amico criteria (D’Amico et al., 1998) and as recommended by European Association of Urology (EAU). Groups were defined as low-risk (PSA < 10 ng/ml, GS < 7, and clinical stage T1–T2a), intermediate-risk (PSA 10–20 ng/ml or GS = 7 or clinical stage T2b–T2c), and high-risk (PSA > 20 ng/ml or GS > 7 or stage T3/T4) (D’Amico et al., 1998). Since patients with metastases were included in the study, the criteria were modified to include this subset into high risk group. During the genotyping procedure, investigators were blinded for the clinical status of subjects.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood and buccal swab samples using the QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturers’ protocol.

Genotyping of rs3746444 was performed using PCR-RFLP method. Primers used to amplify a segment of DNA surrounding rs3746444 were previously published by Hu et al. (2008). PCR protocol is presented as Supplementary information 1. The expected length of PCR products was 146 bp.

10 µl of PCR products were digested at 55 °C overnight with 1 U of BclI enzyme (Fermentas, Hunover, MD, USA) per single reaction (15 µl reaction mixture). Digested products were separated by 3% agarose gel electrophoresis. The expected lengths of fragments resulting from restriction digest were 120 bp and 26 bp for AA genotype, 146 bp, 120 bp and 26 bp for AG genotype, and 146 bp for GG genotype.

Genotyping of rs11614913 was performed by High Resolution Melting Analysis (HRMA). Primers used to amplify 81 bp long segment of DNA surrounding this genetic variants were previously described by Qi et al. (2014). The protocol for HRMA is presented as Supplementary information 2.

For genotyping rs895819, allele-specific PCR was optimized. Primers were designed by using BatchPrimer3 v1.0 software (BatchPrimer3; You et al., 2008). For each sample, two PCR reaction mixtures were prepared containing different allele-specific primer, a common forward primer and a common reverse non-allele-specific primer (Table 1) used to generate amplicon which acts as internal positive control. PCR

Table 1
Primers used for genotyping rs895819 by allele-specific PCR.

Primer type	Sequence
Common forward primer	5' - TGATCAAAGGAAGCATCTGG - 3'
Common reverse primer	5' - CATCTCTGCTCCAAGCATCA - 3'
Reverse primer specific for A allele	5' - CCACTGTGAACACGACTTTGT - 3'
Reverse primer specific for G allele	5' - CCACTGTGAACACGACTTTGC - 3'

protocol is presented as Supplementary information 3. The expected length of allele-specific PCR products was 337 bp, while the length of non-allele-specific control PCR products was 574 bp.

Statistical analysis of SNP association was done using SNPStats software (SNPStats Prevention Program; Solé et al., 2006). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was assessed using exact test implemented in SNPStats software. Allelic and genotypic associations were evaluated by unconditional linear (for serum PSA level in PCa patients) and logistic regression method with adjustment for age. Separate comparisons were done for five different genetic models: allelic (log-additive), codominant, dominant, recessive, and overdominant. Odds ratio (OR) and its 95% confidence intervals (95% CI) were used as risk estimates. The best-fitting models were determined by using Akaike information criterion (AIC). All the tests were two-sided and there were no adjustments for multiple comparisons.

3. Results

Clinical and pathological characteristics of PCa patients are summarized in Table 2. According to available data, the majority of these subjects had serum PSA level at diagnosis higher than 20 ng/ml. Also, the most frequently determined GS was 6. More than a half of patients had T2 stage of localized cancer. Furthermore, distant metastases were detected in about 15% of PCa patients.

Genotyping of rs3746444, rs11614913 and rs895819 was successful in 99.3% (1013/1020), 99.5% (1015/1020) and 99.2% (1012/1020) of study participants, respectively. Genotype distributions in PCa and BPH patients, as well as in controls, are presented in Table 3. Deviations from HWE were not found in the control group for any genetic variant tested (results not shown).

Table 2
Classification of patients with PCa based on values of standard prognostic parameters of disease progression, presence of metastases and the risk of cancer progression.

Standard prognostic parameter	PCa patients; n (%)
PSA at diagnosis	
<10 ng/ml	99 (28.2)
10–20 ng/ml	102 (29.1)
>20 ng/ml	150 (42.7)
Gleason score	
4	8 (2.3)
5	16 (4.7)
6	185 (53.9)
7	80 (23.3)
8	31 (9)
9	20 (5.8)
10	3 (0.9)
Clinical stage	
T1	49 (15.7)
T2	170 (54.5)
T3/T4	93 (29.8)
Metastases	
Distant (M+)	52 (16)
Regional (N+) or not detected	273 (84)
Risk of progression	
Low	22 (7)
Medium	106 (33.8)
High	186 (59.2)

Abbreviations: PSA – prostate-specific antigen.

The comparison of genotype frequencies in PCa patients and controls yielded no evidence of association between the analyzed genetic variants and the risk of PCa (Table 3), although for rs895819 statistical trend of significance was reached ($P = 0.082$). Conversely, when comparing genotype distributions in PCa and BPH patients, minor allele C of rs895819 was found to be associated with the increased risk of developing PCa. Statistical significance was reached for dominant ($P = 0.035$; OR = 1.38, 95%CI 1.02–1.86) and overdominant ($P = 0.04$; OR = 1.37, 95%CI 1.01–1.85) model of association, for which AIC scores presented slight difference (969.7 and 969.9, respectively).

The analysis of association between analyzed genetic variants and the serum PSA level at diagnosis did not show statistical significance for any genetic model tested (results not shown, available on request). Similar results were obtained when testing the potential association between these genetic variants and GS (results not shown, available on request). The comparison of genotype distributions between subgroups of PCa patients formed according to clinical stage of localized cancer yielded statistical significance, although marginal, only for association between rs895819 and this prognostic parameter under dominant genetic model ($P = 0.046$; OR = 0.51, 95%CI 0.26–1.00) (Table 4, results for rs3746444 and rs11614913 not shown, available on request). Also, among the genetic variants tested, only rs895819 showed the association with the presence of bone metastases (Table 5 results for rs3746444 and rs11614913 not shown, available on request). Statistically significant results were obtained for multiple genetic models of association, with the lowest AIC scores found for dominant and overdominant ($P = 0.0015$ and $P = 0.0016$, respectively).

No evidence of association with the risk of PCa progression was found for rs11614913 and rs895819 (results not shown, available on request). Nevertheless, when comparing genotype distributions among PCa patients with intermediate and low risk of disease progression ($P = 0.01$; OR = 0.12, 95%CI 0.02–0.58), as well as among those with high and low risk ($P = 0.035$; OR = 0.22, 95%CI 0.06–0.80), minor allele G was found to be protective allelic variant (Table 6).

4. Discussion

With the intensification of research in the area of cancer epigenetics, regulatory features of microRNAs and dysregulation of their function have been implicated in carcinogenesis (Zhao et al., 2011). These findings, together with *in silico* analyses, have led to identification of potentially functional genetic variants in microRNA genes which are suitable candidates for association studies on human cancer. Among the most extensively analyzed genetic variants selected based on these criteria are rs3746444 in *hsa-miR-499*, rs11614913 in *hsa-miR-196a2* and rs895819 in *hsa-miR-27a* (Ma et al., 2013).

To date, only one study conducted in population of North India analyzed the potential association of this genetic variant with PCa (George et al., 2011). Findings of this previous study showed that rs3746444 heterozygotes confer the increased risk of developing PCa. Furthermore, evidence to support the association of rs3746444 with PCa risk under over-dominant genetic model was obtained (George et al., 2011). Therefore, we decided to conduct a case-control study on the association between rs3746444 and PCa risk, as well as between this genetic variant and the risk of cancer progression, which would provide the first data on this issue in European population. Our data was discordant with previously obtained results from North Indian population, since we found no evidence to support the association between rs3746444 and PCa risk. The observed discordances could be attributed to differences in ethnic backgrounds and participant selection process. We also did not find the association of rs3746444 with standard prognostic parameters of PCa progression, which matched the results of George et al. (2011). On the other hand, our data suggested that rs3746444 minor allele G confers the decreased risk of PCa progression, which was not assessed in the previous study.

Table 3
Association of genetic variants within miR-499, miR-196a2 and miR-27a genes with PCa risk.

SNP	Genetic model	No. of PCa patients (%)	No. of controls (%)	No. of BPH patients (%)	PCa vs controls			PCa vs BPH		
					OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs3746444										
Codominant										
	AA	190 (53.5)	180 (58.6)	196 (55.5)	1.00	0.35	912.5	1.00	0.74	979.5
	AG	147 (41.4)	110 (35.8)	135 (38.2)	1.26 (0.92–1.75)			1.10 (0.80–1.49)		
	GG	18 (5.1)	17 (5.5)	22 (6.2)	1.03 (0.51–2.06)			0.87 (0.45–1.69)		
Dominant										
	AA	190 (53.5)	180 (58.6)	196 (55.5)	1.00	0.19	910.9	1.00	0.68	977.9
	AG + GG	165 (46.5)	127 (41.4)	157 (44.5)	1.23 (0.90–1.68)			1.06 (0.79–1.43)		
Recessive										
	AA + AG	337 (94.9)	290 (94.5)	331 (93.8)	1.00	0.84	912.6	1.00	0.6	977.8
	GG	18 (5.1)	17 (5.5)	22 (6.2)	0.93 (0.47–1.85)			0.84 (0.44–1.61)		
Overdominant										
	AA + GG	208 (58.6)	197 (64.2)	218 (61.8)	1.00	0.15	910.6	1.00	0.5	977.7
	AG	147 (41.4)	110 (35.8)	135 (38.2)	1.26 (0.92–1.73)			1.11 (0.82–1.50)		
	Log-additive	–	–	–	1.15 (0.88–1.48)	0.3	911.6	1.02 (0.80–1.30)	0.89	978.1
rs11614913										
Codominant										
	CC	150 (42.7)	121 (39.2)	145 (41.2)	1.00	0.63	912.4	1.00	0.38	971.4
	CT	161 (45.9)	147 (47.6)	156 (44.3)	0.90 (0.65–1.25)			1.00 (0.73–1.38)		
	TT	40 (11.4)	41 (13.3)	51 (14.5)	0.79 (0.48–1.31)			0.73 (0.45–1.17)		
Dominant										
	CC	150 (42.7)	121 (39.2)	145 (41.2)	1.00	0.41	910.7	1.00	0.65	971.1
	CT + TT	201 (57.3)	188 (60.8)	207 (58.8)	0.88 (0.64–1.20)			0.93 (0.69–1.26)		
Recessive										
	CC + CT	311 (88.6)	268 (86.7)	301 (85.5)	1.00	0.47	910.8	1.00	0.16	969.4
	TT	40 (11.4)	41 (13.3)	51 (14.5)	0.84 (0.53–1.34)			0.73 (0.47–1.14)		
Overdominant										
	CC + TT	190 (54.1)	162 (52.4)	196 (55.7)	1.00	0.74	911.2	1.00	0.63	971.1
	CT	161 (45.9)	147 (47.6)	156 (44.3)	0.95 (0.70–1.29)			1.08 (0.80–1.45)		
	Log-additive	–	–	–	0.89 (0.71–1.12)	0.34	910.4	0.89 (0.72–1.11)	0.31	970.3
rs895819										
Codominant										
	TT	151 (42.8)	152 (49.4)	181 (51.4)	1.00	0.22	911.4	1.00	0.094 ^b	971.4
	TC	172 (48.7)	137 (44.5)	142 (40.3)	1.25 (0.91–1.73)			1.41 (1.03–1.93)*		
	CC	30 (8.5)	19 (6.2)	29 (8.2)	1.54 (0.83–2.87)			1.22 (0.70–2.13)		
Dominant										
	TT	151 (42.8)	152 (49.4)	181 (51.4)	1.00	0.11	909.8	1.00	0.035	969.7
	TC + CC	202 (57.2)	156 (50.6)	171 (48.6)	1.29 (0.95–1.76)			1.38 (1.02–1.86)		
Recessive										
	TT + TC	323 (91.5)	289 (93.8)	323 (91.8)	1.00	0.29	911.3	1.00	0.91	974.1
	CC	30 (8.5)	19 (6.2)	29 (8.2)	1.37 (0.76–2.50)			1.03 (0.60–1.77)		
Overdominant										
	TT + CC	181 (51.3)	171 (55.5)	210 (59.7)	1.00	0.29	911.3	1.00	0.04	969.9
	TC	172 (48.7)	137 (44.5)	142 (40.3)	1.18 (0.87–1.61)			1.37 (1.01–1.85)		
	Log-additive	–	–	–	1.25 (0.97–1.60)	0.082	909.4	1.23 (0.97–1.55)	0.088	971.2

Abbreviations: PCa – prostate cancer; BPH – benign prostatic hyperplasia; OR – odds ratio; CI – confidence interval; AIC – Akaike information criteria.

^a Adjusted for age.

^b Statistical trend of significance.

* Statistically significant results are shown in bold.

Studies conducted in North Indian (George et al., 2011) and Japanese (Parlayan et al., 2014) populations have yielded discordant results on potential association between rs11614913 and PCa risk. Nevertheless, the design of these studies was not matching, since the study in Japanese (Parlayan et al., 2014) involved only elderly participants and the presence of PCa was determined based on analysis of post-mortem samples. On the other hand, in the study by George et al. (2011) in North Indian population genotype distributions significantly deviated from HWE. Therefore, evidence of association between rs11614913 and PCa risk obtained in this previous study should be taken with caution. Our result did not support the association of this genetic variant with the risk of developing PCa, nor with the PCa progression risk.

Previous results regarding association of genetic variant rs895819 with cancer risk are contradictory (Bai et al., 2014). Several lines of evidence suggest that minor allele of this variant confers the increased risk

of developing specific types of cancer, while some case–control studies supported the protective effect of the same allele. Therefore, not only that this genetic variant could influence the susceptibility to cancer, but its effect could be specific to cancer-type, both stimulating and suppressing malignant transformation process (Xu et al., 2013).

Our results suggested the association between rs895819 and PCa risk, as indicated in the comparison of distribution of genotypes between PCa and BPH patients, which are considered as another control group in this case–control study design. The lack of statistically significant findings in the comparison of PCa patients and controls derived from general population can be explained by the far better clinical characterization of BPH patients, making them supercontrols in this type of research. Furthermore, rs895819 minor allele C was found to confer the increased risk of developing distant metastases among PCa patients. Taking into consideration these results, as well as previously proposed mechanism of the function of rs895819 in miR-27a biogenesis and

Table 4
Association of rs895819 with the clinical stage of localized PCa.

Genetic model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 vs T1		T3/T4 vs T1		T3/T4 vs T2	
				OR (95% CI) ^a	P value ^a	OR (95% CI) ^a	P value ^a	OR (95% CI) ^a	P value ^a
rs895819									
Codominant									
TT	15 (30.6)	79 (46.8)	40 (43)	1.00	0.13	1.00	0.36	187.2	347.7
TC	29 (59.2)	75 (44.4)	47 (50.5)	0.49 (0.24–0.99)		0.62 (0.29–1.33)			
CC	5 (10.2)	15 (8.9)	6 (6.5)	0.60 (0.19–1.90)		0.48 (0.13–1.82)			
Dominant									
TT	15 (30.6)	79 (46.8)	40 (43)	1.00	0.046*	1.00	0.17	185.3	346.5
TC + CC	34 (69.4)	90 (53.2)	53 (57)	0.51 (0.26–1.00)		0.60 (0.29–1.26)			
Recessive									
TT + TC	44 (89.8)	154 (91.1)	87 (93.5)	1.00	0.84	1.00	0.49	186.7	346.3
CC	5 (10.2)	15 (8.9)	6 (6.5)	0.90 (0.31–2.62)		0.64 (0.18–2.23)			
Overdominant									
TT + CC	20 (40.8)	94 (55.6)	46 (49.5)	1.00	0.066 ^b	1.00	0.35	186.3	345.9
TC	29 (59.2)	75 (44.4)	47 (50.5)	0.55 (0.29–1.05)	0.71 (0.35–1.44)	1.28 (0.77–2.13)			
Log-additive	-	-	0.67 (0.41–1.09)	0.11	233.2	0.66 (0.37–1.18)	0.16	185.2	346.8

Abbreviations: OR – odds ratio; CI – confidence interval; AIC – Akaike information criteria.

^a Adjusted for age.

^b Statistical trend of significance.

* Statistically significant results are shown in bold.

Table 5
Association of rs895819 with the presence of bone metastases among PCa patients.

Genetic model	M0 (%)	M+ (%)	Presence of metastases (M+ vs M0)		
			OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs895819					
Codominant					
TT	125 (46)	12 (23.1)	1.00	0.0042*	282.4
TC	124 (45.6)	36 (69.2)	3.05 (1.51–6.13)		
CC	23 (8.5)	4 (7.7)	1.85 (0.55–6.28)		
Dominant					
TT	125 (46)	12 (23.1)	1.00	0.0015	281.2
TC + CC	147 (54)	40 (76.9)	2.86 (1.44–5.71)		
Recessive					
TT + TC	249 (91.5)	48 (92.3)	1.00	0.87	291.3
CC	23 (8.5)	4 (7.7)	0.92 (0.30–2.77)		
Overdominant					
GG + CC	148 (54.4)	16 (30.8)	1.00	0.0016	281.3
GC	124 (45.6)	36 (69.2)	2.69 (1.43–5.09)		
Log-additive	-	-	1.76 (1.10–2.81)	0.019	285.7

Abbreviations: OR – odds ratio; CI – confidence interval; AIC – Akaike information criteria.

^a Adjusted for age.

* Statistically significant results are shown in bold.

carcinogenesis, it is possible that miR-27a could have tumor-suppressive properties in prostate tissue. Also, these results could be explained by rs895819 influencing the function of miR-27a by mechanisms other than suppressing the precursor microRNA processing by Drosha enzyme.

We are fully aware that the main limitation of this study is its relatively small sample size, even though over 1000 participants were included. Also, the number of patients selected into some of the subgroups according to standard prognostic parameters of PCa progression was small. Therefore, the results obtained in comparisons involving these small subgroups of patients should be taken with caution.

The observed discordance in results of previous and the present study can be explained by differences in ethnical backgrounds, as well as in study designs, recruitment of participants and genotyping procedures. Nevertheless, in order to make further conclusions about the association between the analyzed genetic variants and the risk of PCa additional studies in European and non-European populations are required.

5. Conclusions

According to our data, rs3746444 qualifies for a genetic variant potentially associated with PCa aggressiveness in Serbian population. Furthermore, our study provided not only the first evidence of association between rs895819 and PCa risk, but also of its genetic association with developing distant metastases among PCa patients. Since only few studies conducted in Asians and the present study have analyzed the association between these genetic variants and PCa risk and progression, further analyses in multiple populations are necessary in order to clarify their significance as potential PCa-associated genetic biomarkers.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.06.009>.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project no. 173016).

Table 6
Association of rs3746444 with the risk of PCa progression assessed according to D'Amico criteria.

Genetic model	Low (%)	Intermediate (%)	High (%)	Intermediate vs low risk			High vs low risk			High vs intermediate risk		
				OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
rs3746444												
Codominant												
AA	13 (59.1)	62 (53.5)	108 (54.5)	1.00	0.013*	120.4	1.00	0.05 ^b	143.6	1.00	0.5	413.1
AG	5 (22.7)	51 (44)	81 (40.9)	2.14 (0.71–6.40)			1.91 (0.65–5.60)			0.88 (0.55–1.42)		
GG	4 (18.2)	3 (2.6)	9 (4.5)	0.16 (0.03–0.79)			0.28 (0.07–1.04)			1.89 (0.49–7.32)		
Dominant												
AA	13 (59.1)	62 (53.5)	108 (54.5)	1.00	0.62	126.8	1.00	0.71	147.5	1.00	0.79	412.4
AG + GG	9 (40.9)	54 (46.5)	90 (45.5)	1.26 (0.50–3.18)			1.19 (0.48–2.91)			0.94 (0.59–1.49)		
Recessive												
AA + AG	18 (81.8)	113 (97.4)	189 (95.5)	1.00	0.01	120.4	1.00	0.035	143.2	1.00	0.29	411.3
GG	4 (18.2)	3 (2.6)	9 (4.5)	0.12 (0.02–0.58)			0.22 (0.06–0.80)			2.00 (0.53–7.60)		
Overdominant												
AA + GG	17 (77.3)	65 (56)	117 (59.1)	1.00	0.055 ^b	123.4	1.00	0.096 ^b	144.8	1.00	0.5	412
AG	5 (22.7)	51 (44)	81 (40.9)	2.67 (0.92–7.72)			2.30 (0.81–6.51)			0.85 (0.53–1.36)		
Log-additive												
–	–	–	–	0.76 (0.36–1.61)	0.48	126.6	0.79 (0.39–1.58)	0.51	147.2	1.02 (0.68–1.53)	0.91	412.4

Abbreviations: OR – odds ratio; CI – confidence interval; AIC – Akaike information criteria.

^a Adjusted for age.

^b Statistical trend of significance.

* Statistically significant results are shown in bold.

References

- Ahn, D.H., Rah, H., Choi, Y.K., Jeon, Y.J., Min, K.T., Kwack, K., et al., 2013. Association of the miR-146aC>G, miR-149 T>C, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. *Mol. Carcinog.* 52 (Suppl. 1), E39–E51.
- Bai, R.P., Weng, Y., Su, L.L., Jin, M.J., Xu, Z.P., Lu, L.Q., et al., 2014. Association of a pre-miR-27a polymorphism with cancer risk: an updated meta-analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (23), 10107–10114.
- BatchPrimer3, Available at URL: <http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>.
- Bolton, E.M., Tuzova, A.V., Walsh, A.L., Lynch, T., Perry, A.S., 2014. Noncoding RNAs in prostate cancer: the long and the short of it. *Clin. Cancer Res.* 20 (1), 35–43.
- Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., Forman, D., 2012. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 13 (8), 790–801.
- Chen, C., Yang, S., Chaugai, S., Wang, Y., Wang, D., 2014. Meta-analysis of Hsa-mir-499 polymorphism (rs3746444) for cancer risk: evidence from 31 case-control studies. *BMC Med. Genet.* 15 (1), 126.
- D'Amico, A.V., Whittington, R., Malkowicz, B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G.A., et al., 1998. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280 (11), 969–974.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136 (5), E359–E386.
- Fletcher, C.E., Dart, D.A., Sita-Lumsden, A., Cheng, H., Rennie, P.S., Bevan, C.L., 2012. Androgen-regulated processing of the oncomir miR-27a, which targets Prohibitin in prostate cancer. *Hum. Mol. Genet.* 21 (14), 3112–3127.
- George, G.P., Mittal, R.D., 2010. MicroRNAs: potential biomarkers in cancer. *Indian J. Clin. Biochem.* 25 (1), 4–14.
- George, G.P., Gangwar, R., Mandal, R.K., Sankhwar, S.N., Mittal, R.D., 2011. Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol. Biol. Rep.* 38 (3), 1609–1615.
- Goh, C.L., Eeles, R.A., 2014. Germline genetic variants associated with prostate cancer and potential relevance to clinical practice. In: Cuzick, J., Thorat, M.A. (Eds.), *Prostate Cancer Prevention Recent Results in Cancer Research Vol. 202*. Springer, Heidelberg, pp. 9–26.
- Helfand, B.T., Catalona, W.J., 2014. The epidemiology and clinical implications of genetic variation in prostate cancer. *Urol. Clin. N. Am.* 41 (2), 277–297.
- Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., et al., 2008. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J. Clin. Invest.* 118 (7), 2600–2608.
- Hu, Z., Liang, J., Wang, Z., Tian, T., Zhou, X., Chen, J., et al., 2009. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum. Mutat.* 30 (1), 79–84.
- Ma, X.P., Zhang, T., Peng, B., Yu, L., Jiang de, K., 2013. Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies. *PLoS One* 8 (11), e79584.
- Nikolić, Z.Z., Savić Pavičević, D.Lj., Vukotić, V.D., Tomović, S.M., Cerović, S.J., Filipović, N., et al., 2014. Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control* 25 (11), 1571–1575.
- Parlayan, C., Ikeda, S., Sato, N., Sawabe, M., Muramatsu, M., Arai, T., 2014. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in miR-146a and miR-196a2 on the prevalence of cancer in elderly Japanese: a case-control study. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (5), 2101–2107.
- Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., Vessella, R.L., Tammela, T.L., Visakorpi, T., 2007. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 67, 6130–6135.
- Qi, J.H., Wang, J., Chen, J., Shen, F., Huang, J.T., Sen, S., et al., 2014. High-resolution melting analysis reveals genetic polymorphisms in microRNAs confer hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients. *BMC Cancer* 14, 643.
- Ryan, B.M., Robles, A.I., Harris, C.C., 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* 10, 389–402.
- SNPStats Prevention Program, m. Available at URL: <http://bioinfo.iconcologia.Net/SNPstats>.
- Solé, X., Guinó, E., Valls, J., Niesta, R., Moreno, V., 2006. SNPstats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22 (15), 1928–1929.
- Sun, Q., Gu, H., Zeng, Y., Xia, Y., Wang, Y., Jing, Y., et al., 2010. Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression. *Cancer Sci.* 101 (10), 2241–2247.
- Szczyrba, J., Löprich, E., Wach, S., Jung, V., Unteregger, G., Barth, S., et al., 2010. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol. Cancer Res.* 8 (4), 529–538.
- Van der Kwast, T.H., Roobol, M.J., 2013. Defining the threshold for significant versus insignificant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 10 (8), 473–482.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., et al., 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2257–2261.
- Wang, S., Tao, G., Wu, D., Zhu, H., Gao, Y., Tan, Y., et al., 2013. A functional polymorphism in MIR196A2 is associated with risk and prognosis of gastric cancer. *Mol. Carcinog.* 52 (Suppl. 1), E87–E95.
- Xu, B., Feng, N.H., Li, P.C., Tao, J., Wu, D., Zhang, Z.D., et al., 2010. A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 70 (5), 467–472.
- Xu, Q., He, C.Y., Liu, J.W., Yuan, Y., 2013. Pre-miR-27a rs895819A/G polymorphisms in cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 8 (6), e65208.
- You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.C., Ma, Y., Hane, D., et al., 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinf.* 9, 253.
- Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R., 2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* 24 (1), 138–148.
- Zhao, L., Chen, X., Cao, Y., 2011. New role of microRNA: carcinogenesis and clinical application in cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43 (11), 831–839.

Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population

Zorana Z. Nikolić · Dušanka Lj. Savić Pavićević ·
Vinka D. Vukotić · Saša M. Tomović · Snežana J. Cerović ·
Nataša Filipović · Stanka P. Romac · Goran N. Brajušković

Received: 11 February 2014 / Accepted: 22 July 2014 / Published online: 2 August 2014
© Springer International Publishing Switzerland 2014

Abstract

Purpose Two previous studies of association between rs2910164 in miR-146a gene and prostate cancer (PCa) risk have provided opposing results. Furthermore, no evidence of association of this SNP with standard prognostic parameters of PCa progression was obtained in mentioned studies. The main aim of this study was to evaluate the possible association between PCa onset and progression to a more aggressive form, since it has not been assessed in a population of European descent.

Methods In this study, 286 samples of peripheral blood were obtained from patients with PCa, while the control group comprised 199 volunteers derived from general population who gave samples of buccal swabs. For individuals diagnosed with PCa clinicopathological characteristics including serum prostate-specific antigen level at diagnosis, Gleason score (GS), and clinical stage were determined. Genotyping of rs2910164 was performed using Taqman[®] SNP Genotyping Assay. Analysis of SNP association was done using PLINK and SNPStats software.

Results rs2910164 showed no association with PCa risk. Nevertheless, heterozygous genotype was found to be associated with higher GS, as well as with the presence of distant metastases. rs2910164 was also shown to be associated with cancer aggressiveness ($p = 0.0067$; $OR_{GC} = 2.22$, 95 %CI 1.24–3.97; $OR_{CC} = 0.47$, 95 %CI 0.13–1.68).

Conclusions Our results show no evidence of association between rs2910164 and PCa risk in Serbian population. Conversely, this variant was found to be associated with PCa aggressiveness.

Keywords Association study · microRNA · miR-146a · Prostate cancer · Single-nucleotide polymorphism

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer, and the third leading cause of cancer-related deaths among males in developed countries. Since incidence rates vary severely worldwide, PCa ranks sixth when considering cancer incidence and mortality rates among men in developing regions [1].

These alarming statistics have led to focusing research efforts on discovering molecular mechanisms underlying PCa onset and progression. Due to their diverse regulatory features, miRNA genes are emerging as potentially dysregulated and dysfunctional candidates in carcinogenesis in various tissues, including prostate [2–4]. Beside evaluating possible changes in miRNA and their precursors expression levels, with the intensification of association studies, several research groups focused on SNPs in miRNA genes and targets, mostly on those with potential functional implications. Two previous studies have provided inconsistent

Z. Z. Nikolić · D. Lj. Savić Pavićević · S. P. Romac ·
G. N. Brajušković (✉)
Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia
e-mail: brajuskovic@bio.bg.ac.rs

V. D. Vukotić · N. Filipović
Department of Urology, Clinical Centre “dr Dragiša Mišović”,
Belgrade, Serbia

S. M. Tomović
Clinical Department of Surgery, Clinical Centre “Zvezdara”,
Belgrade, Serbia

S. J. Cerović
Institute of Pathology, Military Medical Academy, Belgrade,
Serbia

results regarding association between SNP (rs2910164) in hsa-miR-146a gene and PCa risk [5, 6]. This variant is shown to affect biogenesis of mature miR-146a and is also located in the “seed” region of the passenger strand [5]. The study conducted by Xu et al. [5] in Chinese Han population has found that rs2910164 minor allele C confers reduced risk of PCa through affecting the amount of mature miR-146a. In contrast to these results, George et al. [6] have shown no evidence of association between this variant and the risk of PCa, nor with the several parameters of cancer progression in North Indian population.

Considering the observed differences, we tested the association between rs2910164 and PCa risk in Serbian population. Furthermore, we assessed the association of rs2910164 with standard prognostic parameters of PCa progression, as well as with the risk of cancer progression. To our knowledge, the present study is the first one assessing the association between variants in miR-146a and the risk of PCa conducted in a population of European descent.

Materials and methods

The study used peripheral blood samples obtained from 286 PCa patients treated in the period between 2009 and 2012 at Clinical Centers “Dr. Dragiša Mišević Dedinje” and “Zvezdara,” Belgrade, Serbia. Research was conducted with the approval of ethics committees of these institutions. Written informed consents were obtained from participants before their inclusion in the study.

The control group comprised 199 healthy volunteers who gave samples of buccal swabs. The exclusion criteria for potential controls were the presence of any self-reported diseases and family history of PCa. Controls were recruited after passing standard annual physical examination. Mean ages for PCa patients and controls were 69.91 and 68.90 years, respectively. Diagnose of PCa was made using standard clinical procedure which included digital rectal examination, transrectal ultrasonography, abdominal and pelvic ultrasound, bone scintigraphy and radiography, serum prostate-specific antigen (PSA) level, and prostate biopsy. Serum PSA levels were determined by Hybritech method of monoclonal immunoassay. Clinical stage of cancer was determined according to TNM classification system. H&E-stained slides of paraffin-embedded prostate biopsy material were used to determine histological type of cancer and Gleason score (GS).

Patients with PCa were selected into groups based on the values of standard prognostic parameters—GS (GS <7 and GS \geq 7) and clinical stage of localized tumor according to TNM classification system (T1/T2 and T3/T4). Two groups of patients were formed based on the presence of distant

metastases. Based on the risk of cancer progression, two groups of patients were formed, according to Medeiros et al. [7]. The high-risk group included patients with GS \geq 7, or advanced clinical stage (T3 and T4), or with bone metastases, while the low-risk group comprised patients with GS <7 and clinical stage T1 or T2.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood and buccal swab samples using the QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturers’ protocol. Genotypization of rs2910164 was performed using Taqman[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Statistical analysis of SNP association was done using PLINK [8] and SNPStats software [9]. Hardy–Weinberg equilibrium was assessed using exact test [10] implemented in PLINK software. Allelic and genotypic associations were evaluated by unconditional linear (for PSA in PCa patients) and logistic regression method. Genotype distributions among PCa patients with GS \geq 7, tumor stage T3/T4, and metastatic PCa were compared to PCa patients with GS <7, tumor stage T1/T2, and without metastases, respectively. All the comparisons were done for three different genetic models: codominant, log-additive, and overdominant. The overdominant model was chosen based on results from other case–control studies involving the same genetic variant. Also, GC heterozygotes differ from both GG and CC homozygotes by producing three mature microRNAs: one from the leading strand and two from the passenger strand, each with its distinct set of target genes. Odds ratio (OR) was used as the effect size measure.

Results

The genotyping of SNP rs2910164 was successful for 199 control subjects and 286 PCa patients. Clinical and pathological characteristics of patients with PCa are presented in Table 1.

Allele and genotype frequencies of rs2910164 in PCa patients, as well as in the control group, are summarized in Table 2. Genotype distributions were consistent with Hardy–Weinberg equilibrium among controls (results not shown). The comparison of genotype frequencies in PCa patients and controls yielded no evidence of association between rs2910164 and the risk of PCa (Table 2).

The analysis of association between rs2910164 and the serum PSA level at diagnosis, as well as between this variant and the stage of localized tumor, did not show statistical significance ($p = 0.68$ and $p = 0.22$, for codominant model, respectively) (results not shown). Conversely, when comparing genotype distributions in subgroups of PCa patients with GS \geq 7 and GS <7, statistically significant difference was found for both codominant and overdominant genetic

Table 1 Classification of patients with prostate cancer based on the values of standard prognostic parameters of disease progression, presence of metastases, and the risk of cancer progression

Characteristics	Prostate cancer patient's n (%)
PSA at diagnosis	
<10 ng/ml	88 (30.99)
10–20 ng/ml	75 (26.41)
>20 ng/ml	121 (42.60)
Unknown	2
Gleason score	
4	7 (2.55)
5	15 (5.47)
6	138 (50.36)
7	73 (26.64)
8	25 (9.12)
9	13 (4.74)
10	3 (1.09)
Unknown	12
Clinical stage	
T1	44 (18.11)
T2	122 (50.20)
T3/T4	77 (31.69)
Unknown	43
Metastases	
Distant (M+)	45 (16.36)
Regional (N+) or not detected	230 (83.64)
Unknown	30
Aggressiveness	
Low	103 (39.16)
High	160 (60.84)
Unknown	23

PSA prostate-specific antigen

Table 2 Association of rs2910164 with prostate cancer risk

Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	PCa versus controls	
			OR (95 % CI) ^a	p value ^a
Codominant				
GG	184 (64.3)	129 (64.8)	1.00	0.89
GC	90 (31.5)	63 (31.7)	1.01 (0.68–1.49)	
CC	12 (4.2)	7 (3.5)	1.27 (0.48–3.33)	
Overdominant				
GG + CC	196 (68.5)	136 (68.3)	1.00	0.98
GC	90 (31.5)	63 (31.7)	0.99 (0.67–1.47)	
Log-additive				
–	–	–	1.05 (0.76–1.45)	0.76

PCa prostate cancer, OR odds ratio

^a Adjusted for age

models ($p = 0.0096$ and $p = 0.045$, respectively) (Table 3). Under codominant model, heterozygotes were found to be associated with higher GSs, while CC homozygotes have shown the opposite effect ($OR_{GC} = 1.57$, 95 %CI 0.93–2.66; $OR_{CC} = 0.15$; 95 %CI 0.02–1.17). Men with GC genotype were found to have an increased risk of higher GS when compared to men with homozygous genotype ($OR = 1.70$, 95 %CI 1.01–2.87).

When PCa patients without detected metastatic disease were compared with patients with distant metastases marginal significance was obtained for association between rs2910164 and progression of localized to advanced metastatic PCa under assumed overdominant genetic model ($p = 0.05$; $OR = 1.95$, 95 %CI 1.01–3.79) (Table 3).

Carriers of GC genotype were found to have a 2.22-fold increased risk of developing more aggressive PCa, when compared to men with GG genotype, while for CC genotype opposite direction of association was shown ($p = 0.0067$; $OR_{GC} = 2.22$, 95 %CI 1.24–3.97; $OR_{CC} = 0.47$, 95 %CI 0.13–1.68, codominant model) (Table 3). Furthermore, when assuming overdominant genetic model, heterozygous carriers of rs2910164 allele C were shown to have 2.32-fold increased risk of aggressive PCa, compared to carriers of both homozygotes ($p = 0.0033$; 95 %CI 1.30–4.13).

Discussion

A SNP located in has-miR-146a has been analyzed for association with various cancers, including PCa. It was shown that this SNP influences the biogenesis of mature miRNA and resides within the sequence encoding mature passenger strand of miR-146a (miR-146a*), specifically its “seed” region [5]. Therefore, its potential influence on the neoplastic transformation process could be attributed to affecting biosynthesis of mature miR-146a, which was found to be upregulated in multiple cancers, and/or to the change of passenger strand target specificity, assuming that this mature form of miR-146a is functional [5, 11]. Previous studies have yielded evidence of association between rs2910164 and the risk of papillary thyroid, breast, ovarian, gastric, and several other types of cancer [11–16]. As for PCa, studies conducted in Han Chinese and North Indian populations have provided inconclusive evidence of association between the risk of developing this malignancy and rs2910164 [5, 6]. Xu et al. [5] have shown that carriers of C allele have the reduced risk of PCa, with the GC and CC genotype ORs for developing PCa of 0.71 and 0.50, respectively, compared with GG homozygotes. In contrast with these results, George et al. [6] have found no evidence of association between rs2910164 and the risk of PCa, but in their study genotype distributions deviated significantly from HWE. We intended to elucidate potential association

Table 3 Association of rs2910164 with Gleason score, presence of metastases, and tumor stage

Genetic model	Gleason score (GS ≥ 7 vs GS < 7)		OR (95 % CI) ^a	<i>p</i> value ^a
	GS < 7 (%)	GS ≥ 7 (%)		
Codominant				
GG	107 (66.9)	69 (61.1)	1	0.0096*
GC	42 (26.2)	43 (38)	1.57 (0.93–2.66)	
CC	11 (6.9)	1 (0.9)	0.15 (0.02–1.17)	
Overdominant				
GG + CC	118 (73.8)	70 (62)	1	0.045
GC	42 (26.2)	43 (38)	1.70 (1.01–2.87)	
Log-additive				
–	–	–	1.00 (0.66–1.53)	0.99
Genetic model	Presence of distant metastases		OR (95 % CI) ^a	<i>p</i> value ^a
	Present (%)	Absent (%)		
Codominant				
GG	157 (68.3)	24 (53.3)	1	0.14
GC	64 (27.8)	19 (42.2)	1.99 (1.02–3.89)	
CC	9 (3.9)	2 (4.4)	1.31 (0.26–6.54)	
Overdominant				
GG + CC	166 (72.2)	26 (57.8)	1	0.05
GC	64 (27.8)	19 (42.2)	1.95 (1.01–3.79)	
Log-additive				
–	–	–	1.55 (0.91–2.63)	0.11
Genetic model	High versus low aggressiveness ^b		OR (95 % CI) ^a	<i>p</i> value ^a
	Low (%)	High (%)		
Codominant				
GG	75 (72.8)	96 (60)	1	0.0067*
GC	21 (20.4)	60 (37.5)	2.22 (1.24–3.97)	
CC	7 (6.8)	4 (2.5)	0.47 (0.13–1.68)	
Overdominant				
GG + CC	82 (79.6)	100 (62.5)	1	0.0033
GC	21 (20.4)	60 (37.5)	2.32 (1.30–4.13)	
Log-additive				
–	–	–	1.32 (0.85–2.07)	0.22

OR odds ratio, GS Gleason score

^a Adjusted for age

^b The high-risk group included patients with GS ≥ 7 , or clinical stage T3 or T4, or with bone metastases, while the low-risk group comprised patients with GS < 7 and clinical stage T1 or T2

* Statistically significant results are shown in bold

of this variant and PCa risk in Serbian population, which is the first population of European descent in which the mentioned association was tested and found no evidence to support this assumption.

Our results obtained in Serbian population significantly differ from previously reported from Chinese Han [5] and North Indian population [6], since we have found evidence for association of this SNP with GS, while for association with the presence of distant metastases marginal statistical significance was reached. In contrast to results obtained for CC genotype, rs2910164 GC heterozygote was found to confer increased risk of developing tumor with GS ≥ 7 among PCa patients. For several comparisons, association under overdominant model was found to be significant,

which possibly reflects the combined effect of heterozygosity on miRNA biogenesis and target selection, since heterozygous genotype is the only one potentially producing three different mature miRNAs with different target specificity. The importance of rs2910164 heterozygotes for cancerogenesis was previously proposed by Jazdzewski et al. [11, 17]. Furthermore, association between rs2910164 and PCa aggressiveness was found to be highly statistically significant. Therefore, data obtained in the present study suggest possible involvement of rs2910164 and miR-146a in PCa progression. Although this study was limited by the lack of data on miR-146a expression in normal and malignant prostate tissue, the above-mentioned assumptions are substantiated by the previous expression analyses

that demonstrated the loss of miR-146a in hormone-refractory PCa and the effect of expression of this miRNA on tumorigenicity and angiogenesis [18, 19].

The main limitation of this study is a relatively small number of participants. Therefore, in order to make further conclusions about the association between rs2910164 and the risk of PCa, as well as about possible involvement of miR-146a and molecular pathogenesis of PCa, study population needs to be enlarged. Discordance in results of previous and the present study can be explained by differences in ethnical backgrounds that are clearly reflected in significant departure in allele frequencies. Further analysis involving a larger sample and in other populations should be performed in order to confirm the association of rs2910164 with the risk of PCa progression to a more aggressive form.

Acknowledgments The research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Serbia (Project No. 173016).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN. *Int J Cancer* 127(12):2893–2917
2. Alshalalfa M, Bader GD, Goldenberg A, Morris Q, Alhaji R (2012) Detecting microRNAs of high influence on protein functional interaction networks: a prostate cancer case study. *BMC Syst Biol* 6:112
3. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T (2013) MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 774:1–20
4. Shenouda SK, Alaahri SK (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 28:369–378
5. Xu B, Feng NH, Li PC et al (2010) A functional polymorphism in pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 70(5):467–472
6. George GP, Gangwar R, Mandal RK, Sankhwar SN, Mittal RD (2011) Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Biol Rep* 38(3):1609–1615
7. Medeiros RM, Morais A, Vasconcelos A et al (2002) Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin Cancer Res* 8(11):3433–3437
8. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K et al (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet* 81(3):559–575
9. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPstats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22(15):1928–1929
10. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR (2005) A note on exact tests of Hardy–Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 76(5):887–893
11. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A (2008) Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(20):7269–7274
12. Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R (2010) Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* 31(12):2124–2126
13. Yue C, Wang M, Ding B et al (2011) Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population. *Gynecol Oncol* 122(1):33–37
14. Guo H, Wang K, Xiong G et al (2010) A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Fam Cancer* 9(4):599–603
15. Xu T, Zhu Y, Wei QK et al (2008) A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 29(11):2126–2131
16. Zeng Y, Sun QM, Liu NN et al (2010) Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population. *World J Gastroenterol* 16(28):3578–3583
17. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M et al (2009) Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(5):1502–1505
18. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY (2008) Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* 14(3):417–424
19. Xu B, Wang N, Wang X et al (2012) MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 72(11):1171–1178

Genetic variants in RNA-induced silencing complex genes and prostate cancer

Z. Nikolić¹ · D. Savić Pavićević¹ · N. Vučić¹ · S. Cerović² · V. Vukotić³ · G. Brajušković¹

Received: 17 March 2016 / Accepted: 30 July 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract

Purpose The purpose of this study is to evaluate the potential association between genetic variants in genes encoding the components of RNA-induced silencing complex and prostate cancer (PCa) risk. Genetic variants chosen for this study are rs3742330 in *DICER1*, rs4961280 in *AGO2*, rs784567 in *TARBP2*, rs7813 in *GEMIN4* and rs197414 in *GEMIN3*.

Methods The study involved 355 PCa patients, 360 patients with benign prostatic hyperplasia and 318 healthy controls. For individuals diagnosed with PCa, clinicopathological characteristics including serum prostate-specific antigen level at diagnosis, Gleason score (GS) and clinical stage were determined. Genotyping was performed using high-resolution melting analysis, PCR–RFLP, TaqMan SNP Genotyping Assay and real-time PCR-based genotyping assay using specific probes. Allelic and genotypic associations were evaluated by unconditional linear and logistic regression methods.

Results The study provided no evidence of association between the analyzed genetic variants and PCa risk. Nevertheless, allele A of rs784567 was found to confer the reduced risk of higher serum PSA level at diagnosis ($P = 0.046$; Difference = -66.64 , 95 % CI -131.93 to 1.35 , for log-additive model). Furthermore, rs4961280, as well as rs3742330, were shown to be associated with

GS. These variants, together with rs7813, were found to be associated with the lower clinical stage of PCa. Also, rs3742330 minor allele G was found to be associated with lower PCa aggressiveness ($P = 0.036$; OR 0.14, 95 % CI 0.023–1.22, for recessive model).

Conclusions According to our data, rs3742330, rs4961280 and rs7813 qualify for potentially protective genetic variants against PCa progression. These variants were not shown to be associated with PCa risk.

Keywords Prostate cancer · rs3742330 · rs4961280 · rs784567 · rs7813 · rs197414

Introduction

Recent statistics on prostate cancer (PCa) show that this malignancy is the second most commonly diagnosed cancer among males. Furthermore, it contributes substantially to cancer-related death rates, ranking fifth on mortality scales in global male population [1]. Among the newly diagnosed, latent PCa that remains indolent during the life time represents a significant percent. According to estimations based on clinical reports from developed countries, as much as a half of patients are overdiagnosed with PCa [2], which leads to unnecessary morbidity due to application of invasive therapeutic procedures [3]. Therefore, among prevailing aims in modern scientific research on PCa is to identify genetic markers potentially significant for constructing reliable algorithms applicable for assessing the risk of disease progression to a more aggressive form [4].

Regulatory activities of microRNA molecules have been extensively studied in the last decade [5]. During this period, numerous lines of evidence have been found to support the involvement of deregulations in RNA interference

✉ G. Brajušković
brajuskovic@bio.bg.ac.rs

¹ Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

² Institute of Pathology, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

³ Department of Urology, Clinical Centre “dr Dragiša Mišović”, Belgrade, Serbia

process in carcinogenesis in various tissues, including prostatic [6–9]. These data mostly consist of the observed differences in microRNA and their targets' expression between normal and malignant cells [8, 10]. Furthermore, forced or silenced expression of numerous microRNAs was found to be correlated with presentation of various aspects of PCa malignant phenotype in in vitro systems [10].

Due to their potential effect on microRNA biogenesis and function, components of RNA-induced silencing complex (RISC) could also be involved in molecular pathogenesis of PCa. This hypothesis is augmented by the recent data indicating the aberrant expression of several components of this protein complex in malignant, compared to normal prostatic tissue [9, 11]. Also, downregulated or increased expression of several RISC proteins has been associated with cancer growth, apoptosis, as well as with the development of metastases [11, 12].

Based on these data, genetic variants potentially influencing the biogenesis and function of microRNAs qualify for candidates in case–control studies on PCa risk and progression [13–16]. Among these genetic variants are, therefore, those located in genes encoding the components of RISC: *DICER1*, *AGO2*, *TARBP2*, *GEMIN3* and *GEMIN4* [17].

To date, microRNA genetic variants have been evaluated for their potential association with PCa in both Asian and European populations [13–16]. Still, those located in RISC genes have been analyzed in a single study in Han Chinese [18]. The only component of RISC that was a subject of this study is *GEMIN4*. Evidence was obtained supporting the association of two *GEMIN4* variants (rs2740348 and rs7813) with PCa risk. Furthermore, three genetic variants were found to be associated with the increased stage of localized PCa [18].

Since the association between variants located within genes encoding the components of RISC and PCa risk has not been analyzed in European populations, we conducted a case–control study in Serbian population. Potentially functional genetic variants chosen for this study are rs3742330 in *DICER1*, rs4961280 in *AGO2*, rs784567 in *TARBP2*, rs7813 in *GEMIN4* and rs197414 in *GEMIN3*. Furthermore, we have evaluated the possible association of selected genetic variants with standard prognostic parameters of PCa progression, as well as with the risk of PCa progression. Genetic variants included in this study were selected based on their potential functional significance and also for their previously found association with PCa and/or other malignant diseases.

Materials and methods

The study used peripheral blood samples obtained from patients treated in the period between 2009 and 2013 at

Clinical Centre “Dr Dragiša Mišović Dedinje”, Belgrade, Serbia. Research was conducted with the approval of ethics committee of this medical institution. Written informed consents were obtained from participants before their inclusion in the study. Experiments are in accordance with the Helsinki Declaration of 1964.

Three hundred and fifty-five samples of peripheral blood were obtained from patients with PCa and 360 samples from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). The control group comprised 318 healthy volunteers who gave samples of buccal swabs. The exclusion criteria for potential controls were the presence of any self-reported diseases and family history of PCa. Controls were recruited after passing standard annual physical examination. Mean ages for PCa, BPH patients and controls were 69.91, 68.10 and 69.11 years, respectively. Diagnoses of PCa and BPH were made by using standard clinical procedure which included digital rectal examination, transrectal ultrasonography, abdominal and pelvic ultrasound, bone scintigraphy and radiography, serum prostate-specific antigen (PSA) level and biopsy of the prostate. Serum PSA levels were determined by Hybritech method of monoclonal immunoassay. Clinical stage of cancer was determined according to TNM classification system. H&E-stained slides of paraffin-embedded prostate biopsy material were used to determine histological type of cancer and Gleason score (GS).

Patients with PCa were selected into groups based on the values of standard prognostic parameters—PSA at diagnosis (PSA < 10 ng/ml; 10 ng/ml ≤ PSA ≤ 20 ng/ml; PSA > 20 ng/ml), Gleason score (GS < 7; GS = 7; GS > 7) and clinical stage (T1; T2; T3/T4). Two groups of patients were formed based on the presence of distant metastases. Based on the risk for localized cancer progression, three groups of patients were formed, according to D'Amico criteria and as recommended by European Association of Urology (EAU). Groups were defined as low-risk (PSA < 10 ng/ml, GS < 7, and clinical stage T1–T2a), intermediate-risk (PSA 10–20 ng/ml or GS = 7 or clinical stage T2b–T2c) and high-risk (PSA > 20 ng/ml or GS > 7 or stage T3/T4) [19]. Since patients with metastases were included in the study, the criteria were modified to include this subset into high-risk group. Patients were also selected into low-risk (Gleason score < 7 and stage T1–T2) and high-risk (Gleason score ≥ 7 or stage T3/T4 or bone metastases) groups according to Medeiros et al. [20].

Genomic DNA was isolated from peripheral blood and buccal swab samples using the QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturers' protocol.

Genotyping of rs3742330 was performed by high-resolution melting analysis (HRMA). Primers used to amplify 198-bp-long segment of DNA surrounding this genetic variant were designed by using Primer3 software [21, 22]:

5'-CAAAGTCTTCACTTCCCTGCCA-3' and 5'-GATGTTAACTCCTCTCCACGTGATC-3'. The amplifications were performed in 10 μ l volumes containing 10–20 ng of genomic DNA, 1X MeltDoctor™ HRM Master Mix (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), 0.3 μ M of both primers (*Invitrogen*, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and nuclease-free water (*Serva*, Westbury, NY, USA). PCR cycling included an initial denaturation and enzyme activation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 15 s at 60 °C. The heteroduplex formation step included denaturation at 95 °C for 10 s, followed by 30 s at 40 °C, while the melt curve run included hold at 60 °C for 1 min, 15 s at 95 °C with ramp rate of 0.3 % during which fluorescence was acquired and 15 s at 60 °C. The HRMA was performed by using High Resolution Melting Software version 3.0.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA).

Genotyping of rs4961280 was performed by custom-designed real-time PCR-based genotyping assay using specific probes (*PrimerDesign Ltd*, Southampton, UK). The assay was carried out using the standard method recommended by the manufacturer.

HRMA was used to genotype rs784567. Primers used to amplify 198-bp-long segment of DNA surrounding this genetic variant were designed by using Primer3 software [21, 22]: 5'-AGCCCTGCGGAAACAGAG-3' and 5'-GTCCGATCCTGGCTCTTTG-3'. PCR amplification, melting curve run and the analysis of the obtained results were conducted as described for rs3742330.

Genotyping of rs7813 was performed using TaqMan® SNP Genotyping Assay (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). The assay was carried out using the standard method recommended by the manufacturer.

Genetic variant rs197414 was genotyped by using PCR-RFLP method. Primers used to amplify a segment of DNA surrounding rs197414 were designed by using Primer3 software [21, 22]: 5'-TCTTCCCAGAGCAAA GGAAA-3' and 5'-TGGTGGTTGTTCCAAAGAAA-3'. The 15- μ l PCR reaction mixture contained approximately 50 ng of genomic DNA, 0.3 μ M of both primers (*Invitrogen*, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 200 μ M of each dNTP (*Fermentas*, Hanover, MD, USA), 1.5 μ l of 10X PCR buffer A (containing 15 mM MgCl₂, *Kapa Biosystems*, Woburn, MA, USA), 0.04 U/ μ l of Taq DNA polymerase (*Kapa Biosystems*, Woburn, MA, USA) and nuclease-free water (*Serva*, Westbury, NY, USA). After initial denaturation at 97 °C for 3 min, PCR reactions were run for 35 cycles: 95 °C for 60 s, 62 °C for 60 s and 72 °C for 60 s, while final extension was at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were separated by 1.5 % agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Their expected length was 111 bp. Ten microliters of PCR

products were digested at 37 °C overnight with 1 U of MboI enzyme (*Fermentas*, Hanover, MD, USA) per single reaction (15- μ l reaction mixture). Digested products were separated by 3 % agarose gel electrophoresis. The expected lengths of fragments resulting from restriction digest were 84 and 27 bp for CC genotype, 111, 84 and 27 bp for CA genotype and 111 bp for AA genotype.

Statistical analysis of SNP association was done using SNPStats software [23, 24]. Hardy–Weinberg equilibrium was assessed using exact test implemented in SNPStats software. Allelic and genotypic associations were evaluated by unconditional linear (for serum PSA level in PCa patients) and logistic regression method with adjustment for age. Separate comparisons were done for five different genetic models: allelic (log-additive), codominant, dominant, recessive and overdominant. Odds ratio (OR) and its 95 % confidence intervals (95 % CI) were used as risk estimates. The best-fitting models were determined by using Akaike information criterion (AIC).

Results

Clinical and pathological characteristics of PCa patients are presented in Table 1. According to available data, 15.8 % of PCa patients had distant metastases at diagnosis, while the most frequently determined serum PSA scores were higher than 20 ng/ml. Also, the majority of PCa patients had GG = 6 (53.8 %) as well as clinical stage T2 of primary cancer (55 %). Not all of the PCa patients were included in the tests of association of the analyzed genetic variants with the values of standard prognostic parameters and PCa progression risk due to the lack of data on initial serum PSA, GS or clinical stage in patients' records. Also, for some patients, clinical stage was initially assessed according to different classification systems which could not be reliably converted to TNM stages. Furthermore, instead of GS, histological grades were obtained for several patients in the initial period of the collection of data.

Basic data of the genetic variants selected for the analysis in this study are presented in Table 2. Genotyping of all five genetic variants analyzed was successful for more than 99 % of subjects (Table 3). Genotype distributions, presented in Table 3, were not found to significantly deviate from HWE (Table 2).

By comparing genotype distributions among PCa patients and healthy controls, as well as among PCa and BPH patients, no evidence of association between the analyzed genetic variants and PCa was found (Table 3). Nevertheless, a statistical trend of significance was reached for association between rs784567 and the risk of developing

Table 1 Classification of patients with PCa based on the values of standard prognostic parameters of disease progression, presence of metastases and the risk of cancer progression

Standard prognostic parameter	PCa patients; n (%)
PSA at diagnosis	
<10 ng/ml	99 (28.2)
10–20 ng/ml	102 (29.1)
>20 ng/ml	150 (42.7)
Gleason score	
4	8 (2.3)
5	16 (4.7)
6	184 (53.8)
7	81 (23.7)
8	31 (9.1)
9	19 (5.5)
10	3 (0.9)
Clinical stage	
T1	49 (15.8)
T2	170 (55)
T3/T4	90 (29.2)
Metastases	
Distant (M+)	51 (15.8)
Regional (N+) or not detected	271 (84.2)
Risk of progression (D'Amico et al.)	
Low	22 (6.6)
Medium	115 (34.3)
High	198 (59.1)
Risk of progression (Medeiros et al.)	
Low	142 (43.1)
High	187 (56.9)

PSA prostate-specific antigen

PCa ($P = 0.055$, for dominant model). Also, rs4961280 minor allele A was found to confer the reduced risk of developing BPH ($P = 0.03$; OR 0.74, 95 % CI 0.56–0.97, for log-additive model), while the opposite direction

of association was found for rs784567 minor allele A ($P = 0.013$; OR 1.52, 95 % CI 1.09–2.11, for dominant model; results not shown).

Allele A of rs784567 was found to confer the reduced risk of higher serum PSA level at diagnosis ($P = 0.046$; Difference = -66.64 , 95 % CI -131.93 to 1.35 , for log-additive model). Besides for log-additive genetic model, statistical significance was obtained for dominant model ($P = 0.05$; Table 4). The analysis of association between other analyzed genetic variants and the serum PSA level at diagnosis did not show statistical significance for any genetic model tested (results not shown).

When genotype frequencies among PCa patients with $GS < 7$ and $GS > 7$ were compared, rs3742330 minor allele G was found to confer the decreased risk for high GS ($P = 0.027$; OR 0.40, 95 % CI 0.16–1.00, for log-additive model; Table 5). Furthermore, the comparison of genotype distributions among PCa patients with $GS > 7$ and $GS = 7$ showed the statistical trend for the association between this variant and GS ($P = 0.059$). Also, the same comparison showed that rs4961280 minor allele A confers the decreased risk of high GS ($P = 0.045$; OR 0.45, 95 % CI 0.20–1.00, for overdominant model). Conversely, opposite direction of association was observed in comparison of rs4961280 genotype distributions among patients with $GS < 7$ and $GS = 7$ ($P = 0.033$; OR 1.64, 95 % CI 1.04–2.58, for log-additive model).

By comparing genotype frequencies among subgroups of PCa patients with primary tumor clinical stages T1 and T2, rs4961280 and rs7813 minor alleles were found to be associated with the lower stage disease ($P = 0.0013$; OR 0.34, 95 % CI 0.18–0.66, for dominant model; and $P = 0.035$; OR 0.46, 95 % CI 0.22–0.97, for dominant model, respectively; Table 6). The results for rs4961280 were also confirmed by the comparison involving PCa patients with T3 and T1 stages ($P = 0.037$; OR 0.47, 95 % CI 0.23–0.96, for dominant model). *DICER1* genetic variant rs3742330 was also shown to be associated with the

Table 2 Genetic variants selected for the analysis

Gene	Genetic variant	Chromosomal location	Position within the gene	Major allele	Minor allele	HWE P value
<i>DICER1</i>	rs3742330	chr14:95087025	3'-UTR	A	G	0.12
<i>TARBP2</i>	rs784567	chr12:53500681	Promoter	G	A	0.052
<i>AGO2</i>	rs4961280	chr8:140637315	Promoter	C	A	0.87
<i>GEMIN3</i>	rs197414	chr1:111766501	Exon (p.R693S)	C	A	0.13
<i>GEMIN4</i>	rs7813	chr17:744946	Exon (p.R1033C)	A	G	0.13

Table 3 Association of genetic variants within *DICER1*, *AGO2*, *TARBP*, *GEMIN4* and *GEMIN3* with PCa risk

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	No of BPH patients (%)	PCa versus controls		PCa versus BPH		
					OR (95 % CI) ^a	P value ^a	OR (95 % CI) ^a	P value ^a	
<i>rs3742330</i>									
Codominant									
	AA	285 (80.7)	259 (81.5)	276 (76.9)	1.00	0.91	1.00	0.49	984.2
	AG	62 (17.6)	53 (16.7)	76 (21.2)	1.09 (0.73–1.64)		0.80 (0.55–1.16)		
	GG	6 (1.7)	6 (1.9)	7 (2)	0.92 (0.29–2.92)		0.88 (0.29–2.71)		
Dominant									
	AA	285 (80.7)	259 (81.5)	276 (76.9)	1.00	0.73	1.00	0.24	982.3
	AG + GG	68 (19.3)	59 (18.6)	83 (23.1)	1.07 (0.73–1.58)		0.80 (0.56–1.16)		
Recessive									
	AA + AG	347 (98.3)	312 (98.1)	352 (98)	1.00	0.87	1.00	0.89	983.7
	GG	6 (1.7)	6 (1.9)	7 (2)	0.91 (0.29–2.87)		0.93 (0.30–2.83)		
Overdominant									
	AA + GG	291 (82.4)	265 (83.3)	283 (78.8)	1.00	0.67	1.00	0.24	982.3
	AG	62 (17.6)	53 (16.7)	76 (21.2)	1.09 (0.73–1.64)		0.80 (0.55–1.16)		
Log-additive									
	–	–	–	–	1.05 (0.74–1.47)	0.8	0.84 (0.61–1.15)	0.28	982.5
<i>rs4961280</i>									
Codominant									
	CC	230 (64.8)	194 (61)	243 (67.5)	1.00	0.51	1.00	0.54	988.5
	CA	112 (31.6)	108 (34)	109 (30.3)	0.88 (0.63–1.22)		1.09 (0.79–1.50)		
	AA	13 (3.7)	16 (5)	8 (2.2)	0.68 (0.32–1.46)		1.61 (0.65–3.98)		
Dominant									
	CC	230 (64.8)	194 (61)	243 (67.5)	1.00	0.33	1.00	0.47	987.2
	CA + AA	125 (35.2)	124 (39)	117 (32.5)	0.85 (0.62–1.17)		1.12 (0.82–1.53)		
Recessive									
	CC + CA	342 (96.3)	302 (95)	352 (97.8)	1.00	0.38	1.00	0.32	986.8
	AA	13 (3.7)	16 (5)	8 (2.2)	0.71 (0.33–1.51)		1.56 (0.64–3.85)		
Overdominant									
	CC + AA	243 (68.5)	210 (66)	251 (69.7)	1.00	0.53	1.00	0.7	987.6
	CA	112 (31.6)	108 (34)	109 (30.3)	0.90 (0.65–1.25)		1.06 (0.77–1.46)		
Log-additive									
	–	–	–	–	0.86 (0.66–1.12)	0.26	1.14 (0.87–1.50)	0.35	986.9

Table 3 continued

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	No of BPH patients (%)	PCa versus controls		PCa versus BPH		
					OR (95 % CI) ^a	P value ^a	OR (95 % CI) ^a	P value ^a	AIC
<i>rs784567</i>									
Codominant									
	GG	100 (28.2)	111 (34.9)	94 (26.1)	1.00		1.00		
	GA	169 (47.6)	139 (43.7)	190 (52.8)	1.36 (0.95–1.93)	0.15	0.84 (0.59–1.19)	0.33	987.5
	AA	86 (24.2)	68 (21.4)	76 (21.1)	1.43 (0.94–2.17)		1.10 (0.72–1.67)		
Dominant									
	GG	100 (28.2)	111 (34.9)	94 (26.1)	1.00	0.055 ^b	1.00	0.59	987.5
	GA + AA	255 (71.8)	207 (65.1)	266 (73.9)	1.38 (0.99–1.92)		0.91 (0.65–1.27)		
Recessive									
	GG + GA	269 (75.8)	250 (78.6)	284 (78.9)	1.00	0.34	1.00	0.25	986.4
	AA	86 (24.2)	68 (21.4)	76 (21.1)	1.19 (0.83–1.72)		1.23 (0.86–1.75)		
Overdominant									
	GG + AA	186 (52.4)	179 (56.3)	170 (47.2)	1.00	0.32	1.00	0.15	985.7
	GA	169 (47.6)	139 (43.7)	190 (52.8)	1.17 (0.86–1.58)		0.81 (0.60–1.08)		
Log-additive									
	–	–	–	–	1.21 (0.98–1.49)	0.078 ^b	1.04 (0.84–1.28)	0.74	987.6
<i>rs7813</i>									
Codominant									
	AA	114 (32.1)	101 (31.7)	122 (33.9)	1.00		1.00		
	AG	181 (51)	169 (53)	176 (48.9)	0.96 (0.68–1.36)	0.79	1.09 (0.79–1.52)	0.86	989.4
	GG	60 (16.9)	49 (15.4)	62 (17.2)	1.12 (0.70–1.78)		1.03 (0.66–1.60)		
Dominant									
	AA	114 (32.1)	101 (31.7)	122 (33.9)	1.00	0.99	1.00	0.65	987.5
	AG + GG	241 (67.9)	218 (68.3)	238 (66.1)	1.00 (0.72–1.38)		1.08 (0.79–1.47)		
Recessive									
	AA + AG	295 (83.1)	270 (84.6)	298 (82.8)	1.00	0.52	1.00	0.89	987.7
	GG	60 (16.9)	49 (15.4)	62 (17.2)	1.15 (0.76–1.74)		0.97 (0.66–1.44)		
Overdominant									
	AA + GG	174 (49)	150 (47)	184 (51.1)	1.00	0.62	1.00	0.59	987.5
	AG	181 (51)	169 (53)	176 (48.9)	0.93 (0.68–1.26)		1.08 (0.81–1.46)		
Log-additive									
	–	–	–	–	1.04 (0.83–1.30)	0.73	1.03 (0.83–1.27)	0.81	987.7

Table 3 continued

SNP	Genetic model	No of PCa patients (%)	No of controls (%)	No of BPH patients (%)	PCa versus controls		PCa versus BPH		
					OR (95 % CI) ^a	P value ^a	OR (95 % CI) ^a	P value ^a	AIC
<i>rs197414</i>									
Codominant									
	CC	268 (75.9)	233 (73)	264 (73.5)	1.00	1.00	1.00		
	CA	75 (21.2)	75 (23.5)	81 (22.6)	0.88 (0.61–1.27)	0.75	0.90 (0.63–1.29)	0.68	985.1
	AA	10 (2.8)	11 (3.5)	14 (3.9)	0.83 (0.34–2.00)		0.74 (0.32–1.70)		
Dominant									
	CC	268 (75.9)	233 (73)	264 (73.5)	1.00	0.45	1.00	0.45	983.3
	CA + AA	85 (24.1)	86 (27)	95 (26.5)	0.87 (0.62–1.24)		0.88 (0.62–1.23)		
Recessive									
	CC + CA	343 (97.2)	308 (96.5)	345 (96.1)	1.00	0.72	1.00	0.51	983.5
	AA	10 (2.8)	11 (3.5)	14 (3.9)	0.85 (0.35–2.05)		0.76 (0.33–1.73)		
Overdominant									
	CC + AA	278 (78.8)	244 (76.5)	278 (77.4)	1.00	0.52	1.00	0.62	983.7
	CA	75 (21.2)	75 (23.5)	81 (22.6)	0.89 (0.62–1.28)		0.91 (0.64–1.31)		
Log-additive									
	–	–	–	–	0.89 (0.66–1.20)	0.45	0.88 (0.66–1.17)	0.39	983.2

PCa prostate cancer, BPH benign prostatic hyperplasia, OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

^a Adjusted for age

^b Statistical trend of significance

Table 4 Association of rs784567 with initial serum PSA level among PCa patients

Genetic model	<i>n</i>	Response mean (s.e.)	Serum PSA level		
			Difference (95 % CI)	<i>P</i> value ^a	AIC
<i>rs784567</i>					
Codominant					
GG	100	186.01 (70.22)	0.00		5306.5
GA	168	95.29 (27.1)	−91.95 (−203.55 to 19.65)	0.12	
AA	84	57.3 (13.32)	−131.09 (−262.03 to −0.14)		
Dominant					
GG	100	186.01 (70.22)	0.00	0.05*	5304.9
GA + AA	252	82.63 (18.62)	−104.93 (−209.35 to −0.51)		
Log-additive					
–	–	–	−66.64 (−131.93 to −1.35)	0.046	5304.8

CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

* Statistically significant results are shown in bold

^a Adjusted for age

decreased risk for high clinical stage, when comparing genotype distributions among PCa patients stratified into groups with T3 and T2 stages ($P = 0.022$). The exact OR could not be calculated, since there were no PCa patients with T3 stage who had GG genotype.

The genetic variants tested were not shown to be associated with the presence of bone metastases among PCa patients (results not shown).

When classifying PCa patients according to D'Amico criteria for disease aggressiveness, tests for genetic associations yielded no statistically significant results (results not shown). Conversely, when PCa patients were selected according to different criteria for progression risk assessment, rs3742330 minor allele G was found to be associated with the lower PCa aggressiveness ($P = 0.036$; OR 0.14, 95 % CI 0.023–1.22, for recessive model; Table 7). The same comparison showed statistical trend of association between rs7813 and the risk of PCa progression ($P = 0.074$, for overdominant model; results not shown).

Discussion

Dysregulation of microRNA-based regulatory mechanisms was found to be involved in the pathogenesis of PCa. These observations mainly refer to microRNAs, but similar findings were obtained for components of microRNA machinery [8, 25]. To date, evidence was found to support the association of genetic variants in microRNA genes with PCa risk and/or progression in Asians, as well as in Europeans, as found in our previous studies in Serbian population [13–16]. Nevertheless, a single case–control study on PCa analyzed the variants within microRNA machinery

genes [18]. The mentioned study provided evidence of association between two genetic variants in *GEMIN4* and PCa risk and progression [18]. Still, these results needed to be replicated in other populations in order to validate the observed effects of *GEMIN4* variants on PCa risk/progression. Therefore, we decided to conduct the first case–control study on a *GEMIN4* variant and PCa in a European population.

The exonic genetic variant in *GEMIN4* chosen for this study is rs7813, for which it was previously found that genotype TT confers the increased risk of developing PCa [18]. The same genotype was also found to be associated with the higher clinical stage of PCa [18]. Our result did not support the association of this genetic variant with the risk of developing PCa. The discordance with the previous results can be explained by the differences in ethnic backgrounds, since they were obtained in a European and an Asian population. Also, the potential reasons for differences in the observed effect of rs7813 on PCa could be unmatched subject recruitment procedure. Still, our results show similarities with previously obtained regarding PCa progression, even though patient classifications differed between these two studies. Findings from both studies qualify rs7813 allele G for protective allelic variant against disease aggressiveness.

Other genetic variants selected for the present study were never previously analyzed for association with PCa. *DICER1* variant rs3742330, located in the 3'UTR, was found to be associated with both GS and clinical stage of primary PCa. Also, this genetic variant was shown to be related to disease aggressiveness. These findings, even though unique for PCa, are consistent with previously obtained suggesting the association with osteosarcoma prognosis, with minor allele G being protective [26].

Table 5 Association of rs3742330 and rs4961280 with Gleason score (GS)

Genetic model	GS < 7 (%)		GS = 7 (%)		GS > 7 (%)		GS < 7 versus GS > 7		GS = 7 versus GS = 7		GS = 7 versus GS < 7	
	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95% CI) ^a	P value ^a	AIC
<i>rs3742330</i>												
Codominant												
AA	166 (79.8)	63 (78.8)	47 (90.4)	1.00	0.06 ^b	251.7	1.00		175.9	1.00		347.5
AG	37 (17.8)	16 (20)	5 (9.6)	0.46 (0.17–1.26)			0.40 (0.13–1.18)	0.16		1.12 (0.58–2.17)	0.75	
GG	5 (2.4)	1 (1.2)	0 (0)	0.00 (0.00–NA)			0.00 (0.00–NA)			0.52 (0.06–4.51)		
Dominant												
AA	166 (79.8)	63 (78.8)	47 (90.4)	1.00	0.045	251.2	1.00	0.066 ^b	174.3	1.00	0.88	346.1
AG + GG	42 (20.2)	17 (21.2)	5 (9.6)	0.39 (0.14–1.06)			0.38 (0.13–1.13)			1.05 (0.56–1.99)		
Log-additive	–	–	–	0.40 (0.16–1.00)	0.027	250.4	0.38 (0.13–1.11)	0.059 ^b	174.1	0.98 (0.56–1.72)	0.95	346.1
<i>rs4961280</i>												
Codominant												
CC	140 (67.3)	44 (54.3)	37 (69.8)	1.00			1.00		178.5	1.00		346.1
CA	63 (30.3)	33 (40.7)	12 (22.6)	0.72 (0.35–1.48)	0.29	258.2	0.45 (0.20–1.02)	0.13		1.66 (0.97–2.85)	0.1	
AA	5 (2.4)	4 (4.9)	4 (7.5)	2.39 (0.57–10.07)			1.07 (0.24–4.78)			2.58 (0.66–10.05)		
Dominant												
CC	140 (67.3)	44 (54.3)	37 (69.8)	1.00	0.64	258.5	1.00	0.087 ^b	177.6	1.00	0.042	344.5
CA + AA	68 (32.7)	37 (45.7)	16 (30.2)	0.85 (0.44–1.67)			0.53 (0.25–1.11)			1.73 (1.02–2.92)		
Overdominant												
CC + AA	145 (69.7)	48 (59.3)	41 (77.4)	1.00	0.28	257.6	1.00	0.045	176.5	1.00	0.096 ^b	345.9
CA	63 (30.3)	33 (40.7)	12 (22.6)	0.68 (0.33–1.40)			0.45 (0.20–1.00)			1.58 (0.93–2.69)		
Log-additive	–	–	–	1.02 (0.59–1.78)	0.94	258.7	0.69 (0.38–1.26)	0.23	179.1	1.64 (1.04–2.58)	0.033	344.1

GS Gleason score, OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

* Statistically significant results are shown in bold

^a Adjusted for age^b Statistical trend of significance

Table 6 Association of rs3742330, rs4961280 and rs7813 with the clinical stage of primary prostate cancer assessed according to TNM classification system

Genetic model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 versus T1		T3/T4 versus T1		T3/T4 versus T2	
				OR (95 % CI) ^a	P value ^a	OR (95 % CI) ^a	P value ^a	OR (95 % CI) ^a	P value ^a
<i>rs3742330</i>									
Codominant									
AA	37 (75.5)	136 (80.5)	77 (85.6)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
AG	12 (24.5)	27 (16)	13 (14.4)	0.62 (0.28–1.34)	0.091 ^b	1.42 (0.57–3.56)	0.67	0.85 (0.41–1.74)	0.067 ^b
GG	0 (0)	6 (3.5)	0 (0)	NA (0.00–NA)		1.79 (0.18–18.14)		0.00 (0.00–NA)	
Recessive									
AA + AG	49 (100)	163 (96.5)	90 (100)	1.00	0.066 ^b	1.00	0.65	1.00	0.022*
GG	0 (0)	6 (3.5)	0 (0)	NA (0.00–NA)		1.67 (0.17–16.88)		0.00 (0.00–NA)	
<i>rs4961280</i>									
Codominant									
CC	22 (44.9)	119 (70)	57 (63.3)	1.00		1.00		1.00	
CA	25 (51)	46 (27.1)	29 (32.2)	0.33 (0.17–0.65)	0.0053	0.44 (0.21–0.92)	0.086 ^b	1.32 (0.75–2.31)	0.52
AA	2 (4.1)	5 (2.9)	4 (4.4)	0.46 (0.08–2.57)		0.87 (0.15–5.16)		1.67 (0.43–6.46)	
Dominant									
CC	22 (44.9)	119 (70)	57 (63.3)	1.00	0.0013	1.00	0.037	180.1	1.00
CA + AA	27 (55.1)	51 (30)	33 (36.7)	0.34 (0.18–0.66)		0.47 (0.23–0.96)		1.35 (0.79–2.32)	0.28
Overdominant									
CC + AA	24 (49)	124 (72.9)	61 (67.8)	1.00	0.0018	1.00	0.027	179.6	1.00
CA	25 (51)	46 (27.1)	29 (32.2)	0.35 (0.18–0.67)		0.45 (0.22–0.92)		1.28 (0.73–2.24)	0.38
Log-additive									
–	–	–	–	0.44 (0.25–0.77)	0.0039	0.60 (0.33–1.09)	0.092 ^b	181.6	1.31 (0.83–2.07)
<i>rs7813</i>									
Codominant									
AA	11 (22.4)	64 (37.6)	27 (30)	1.00		1.00		1.00	
AG	31 (63.3)	81 (47.6)	43 (47.8)	0.44 (0.20–0.94)	0.09 ^b	0.57 (0.25–1.34)	0.22	1.26 (0.70–2.26)	0.24
GG	7 (14.3)	25 (14.7)	20 (22.2)	0.58 (0.20–1.67)		1.17 (0.38–3.58)		1.90 (0.91–4.00)	
Dominant									
AA	11 (22.4)	64 (37.6)	27 (30)	1.00	0.035	1.00	0.36	183.6	1.00
AG + GG	38 (77.5)	106 (62.4)	63 (70)	0.46 (0.22–0.97)		0.69 (0.30–1.55)		1.41 (0.82–2.45)	0.21
Overdominant									
AA + GG	18 (36.7)	89 (52.4)	47 (52.2)	1.00	0.051 ^b	1.00	0.088 ^b	181.5	1.00
AG	31 (63.3)	81 (47.6)	43 (47.8)	0.52 (0.27–1.01)		0.54 (0.26–1.10)		1.01 (0.60–1.68)	0.98

Table 6 continued

Genetic model	T1 (%)	T2 (%)	T3/T4 (%)	T2 versus T1		T3/T4 versus T1		T3/T4 versus T2				
				OR (95 % CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95 % CI) ^a	P value ^a	AIC	OR (95 % CI) ^a	P value ^a	AIC
Log-additive	-	-	-	0.70 (0.43–1.13)	0.14	234	1.01 (0.60–1.70)	0.96	184.4	1.36 (0.95–1.97)	0.096 ^b	338.6

OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

* Statistically significant results are shown in bold

^a Adjusted for age

^b Statistical trend of significance

Table 7 Association of rs3742330 with the risk of PCa progression assessed according to Medeiros et al.

Genetic model	Low	High	Risk of PCa progression		
			OR (95 % CI) ^a	P value ^a	AIC
<i>rs3742330</i>					
Codominant					
AA	111 (78.2)	155 (83.8)	1.00		447.6
AG	26 (18.3)	29 (15.7)	0.78 (0.43–1.39)	0.077 ^b	
GG	5 (3.5)	1 (0.5)	0.13 (0.02–1.17)		
Recessive					
AA + AG	137 (96.5)	184 (99.5)	1.00	0.036*	446.3
GG	5 (3.5)	1 (0.5)	0.14 (0.02–1.22)		
Log-additive					
-	-	-	0.63 (0.39–1.04)	0.068 ^b	447.3

OR odds ratio, CI confidence interval, AIC Akaike information criteria

* Statistically significant results are shown in bold

^a Adjusted for age

^b Statistical trend of significance

Similarly, minor allele of rs784567 located in *TARBP2* promoter was found to be associated with the lower serum PSA level. Still, these results are in contrast to those obtained for renal cell carcinoma outcome [27].

Genetic variant rs4961280 located in *AGO2* promoter showed opposing direction of association with GS when different groups of PCa patients were compared. This can be explained by the relatively small number of patients within some GS-based groups. More significant are results regarding the association with the clinical stage of PCa, suggesting the protective effect of minor allele A. The observed results are concordant with the potential biological function of rs4961280 as a repressive promoter variant, since *AGO2* was found to be upregulated in PCa [28].

Our study provided no evidence of association between the analyzed genetic variants in RISC genes and PCa susceptibility. Nevertheless, the protective effect of rs3742330, rs4961280 and rs7813 on PCa progression risk was shown. The most significant results obtained in multiple comparisons are those implying the association of rs3742330 located in *DICER1* with both GG and clinical stage of PCa, as well as with cancer aggressiveness. Still, in order to make further conclusions about the association between the analyzed genetic variants and the risk of PCa progression, additional studies in European and non-European populations are required.

Acknowledgments The research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Serbia (Project No. 173016). The scientific work of Zorana Nikolic was supported by the PhD student scholarship provided by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Serbia.

Compliance with ethical standards

Authors' contribution Protocol development, data collection, data analysis and manuscript writing were done by Z Nikolić. Protocol development, data analysis and manuscript editing were carried out by D Savić Pavićević. Data collection and data analysis were performed by N Vučić, S Cerović and V Vukotić. Protocol development, data collection, data analysis and manuscript writing/editing were done by G Brajušković.

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

References

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108
- Mühlberger N, Kurzhthaler C, Iskandar R, Krahn MD, Bremner KE, Oberaigner W, Klocker H, Horninger W, Conrads-Frank A, Sroczynski G, Siebert U (2015) The ONCOTYROL prostate cancer outcome and policy model: effect of prevalence assumptions on the benefit-harm balance of screening. *Med Decis Mak* 35:758–772
- Klotz L (2012) Active surveillance for favorable-risk prostate cancer: background, patient selection, triggers for intervention, and outcomes. *Curr Urol Rep* 13:153–159
- Goh CL, Eeles RA (2014) Germline genetic variants associated with prostate cancer and potential relevance to clinical practice. In: Cuzick J, Thorat MA (eds) *Prostate cancer prevention*. Springer, Heidelberg, pp 9–26 (**Recent Results in Cancer Research; vol 202**)
- Pasquinelli AE (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13:271–282
- Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussel S, Hamdy FC, Kallioniemi O, Mengual L, Schlomm T, Visakorpi T (2011) MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol* 59:671–681
- Zimmerman AL, Wu S (2011) MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. *Cancer Lett* 300:10–19
- Patil PA, Magi-Galluzzi C (2015) MicroRNA in prostate cancer: practical aspects. *Histol Histopathol* 30(12):11647
- Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Acquafondata M, McHale T, Sobol RW, Dhir R (2006) Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 169:1812–1820
- Wang YL, Wu S, Jiang B, Yin FF, Zheng SS, Hou SC (2015) Role of MicroRNAs in prostate cancer pathogenesis. *Clin Genitourin Cancer* 13:261–270
- Bian XJ, Zhang GM, Gu CY, Cai Y, Wang CF, Shen YJ, Zhu Y, Zhang HL, Dai B, Ye DW (2014) Down-regulation of Dicer and Ago2 is associated with cell proliferation and apoptosis in prostate cancer. *Tumour Biol* 35:11571–11578
- Zhang B, Chen H, Zhang L, Dakhova O, Zhang Y, Lewis MT, Creighton CJ, Ittmann MM, Xin L (2014) A dosage-dependent pleiotropic role of Dicer in prostate cancer growth and metastasis. *Oncogene* 33:3099–3108
- Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, Tong N, Wang JF, Song NH, Zhang W, Hua LX, Wu HF (2010) A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 70:467–472
- George GP, Gangwar R, Mandal RK, Sankhwar SN, Mittal RD (2011) Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Biol Rep* 38:1609–1615
- Nikolić ZZ, Pavićević DLS, Vukotić VD, Tomović SM, Cerović SJ, Filipović N, Romac SP, Brajušković GN (2014) Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control* 25:1571–1575
- Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, Cidilko S, Filipović N, Cerović S, Vukotić V, Romac S, Brajušković G (2015) Assessment of association between genetic variants in microRNA genes hsa-miR-499, hsa-miR-196a2 and hsa-miR-27a and prostate cancer risk in Serbian population. *Exp Mol Pathol* 99:145–150
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123:631–640
- Liu J, Liu J, Wei M, He Y, Liao B, Liao G, Li H, Huang J (2012) Genetic variants in the microRNA machinery gene GEMIN4 are associated with risk of prostate cancer: a case-control study of the Chinese Han population. *DNA Cell Biol* 31:1296–1302
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz B, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280:969–974
- Medeiros RM, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Ferreira P, Lopes C (2002) Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin Cancer Res* 8:3433–3437
- Primer3 software. <http://primer3.ut.ee/>
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3: new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115
- SNPStats Prevention Program. <http://bioinfo.iconcologia.Net/SNPstats>
- Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V (2006) SNPstats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22:1928–1929
- Huang JT, Wang J, Srivastava V, Sen S, Liu SM (2014) MicroRNA machinery genes as novel biomarkers for cancer. *Front Oncol* 4:113
- Weng Y, Chen Y, Chen J, Liu Y, Bao T (2016) Common genetic variants in microRNA processing machinery genes are associated with risk and survival in patients with osteosarcoma. *Mol Genet Genom* 291:511–511
- Lin J, Horikawa Y, Tamboli P, Clague J, Wood CG, Wu X (2010) Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 31:1805–1812
- Fu X, Xue C, Huang Y, Xie Y, Li Y (2010) The activity and expression of microRNAs in prostate cancers. *Mol BioSyst* 6:2561–2572

Association between a Genetic Variant in the *hsa-miR-146a* Gene and Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis

Zorana Z. Nikolić · Dušanka L. Savić Pavićević · Nemanja L. Vučić
Stanka P. Romac · Goran N. Brajušković

Centre for Human Molecular Genetics, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Key Words

Cancer · *hsa-miR-146a* gene · Meta-analysis · MicroRNA · rs2910164 genetic variant

Abstract

Background and Aims: A large number of studies have investigated the association between the potentially functional genetic variant rs2910164 located in the *hsa-miR-146a* gene and susceptibility to various types of cancer. Nevertheless, the results obtained in these studies are contradictory. Therefore, we conducted a meta-analysis of data from eligible reports comprising a total of 28,359 cases and 41,678 controls. **Methods:** The literature included in this meta-analysis was selected from the PubMed database. Quantitative data synthesis was performed by using the OpenMeta-analyst software. **Results:** The meta-analysis yielded no evidence of an association between rs2910164 and the overall cancer risk. Conversely, the C allele of this genetic variant was found to be associated with a decreased risk of developing bladder and cervical cancer in multiple genetic models. The same direction of association was found for the C allele and liver cancer, gastric cancer and oral squamous cell carcinoma risk. In contrast to these results, the same allelic variant of rs2910164 was found to confer an increased risk of developing lung cancer. The stratified meta-analysis based on ethnicity did not show significant differences in the associa-

tion between rs2910164 and cancer risk in populations with different ethnic backgrounds. **Conclusion:** We conclude that rs2910164 may represent a valuable biomarker associated with the risk of developing specific types of cancer.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

Malignant diseases are among the major causes of death in many developed countries [1]. Moreover, they tend to become the global leading cause of morbidity and mortality [2]. Due to the present statistics, as well as alarming predictions, this cluster of diseases has been recognized as one of the major health issues, leading to significant research efforts being focused on investigating molecular mechanisms involved in carcinogenesis and cancer genetics [3].

Several lines of evidence have implicated noncoding RNA in malignant transformation processes [4]. These lines of evidence were obtained mainly through gene expression analyses of normal and malignant tissue [5, 6]. Many investigators focused on the role of microRNAs (miRNAs) in cancer biology, due to their diverse regulatory features. These small, linear, single-stranded, non-coding regulatory RNAs were shown to regulate the expression of genes involved in multiple essential cellular

processes and pathways [7]. Therefore, the dysregulation of their expression and/or the sequence alterations could be implicated in carcinogenesis [8].

Genetic variants potentially creating or destroying miRNA binding sites, affecting primary miRNA and precursor miRNA processing, efficiency of the regulation of the target gene expression, as well as target specificity, have emerged as potential cancer susceptibility polymorphisms [9, 10]. Therefore, single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the 'seed' region of mature miRNAs are of interest to a great number of researchers since they could potentially simultaneously affect the expression of hundreds of genes, some of which could have oncogenic or tumor-suppressive properties [9]. One such genetic variant is rs2910164 located in the *hsa-miR-146a* gene which was reported to influence the biogenesis of mature miRNA, as well as to alter the sequence of the 'passenger' strand 'seed' region [11–13]. Therefore, this genetic variant could possibly affect the cancer onset and/or progression by multiple mechanisms [11].

A large number of studies have investigated the association of rs2910164 with the risk of developing various types of cancer. Nevertheless, the obtained results have been contradictory. This refers not only to the lack of a statistically significant association found in some of these studies, but also to the increased risk of developing cancer being associated with different allelic variants of rs2910164 [11, 13–83]. Therefore, in order to elucidate the effect of this genetic variant on cancer risk, we have conducted a meta-analysis of eligible studies. In this meta-analysis, several factors potentially influencing the results, including ethnicity and cancer type-specific effects of rs2910164, were evaluated. Also, multiple genetic models of association were evaluated in order to maximize the study's power to detect a potential association.

Materials and Methods

Publication Search

The literature included in this meta-analysis was selected from the PubMed database using a search strategy based on combinations of the key words 'miR-146a' or 'rs2910164', 'association' and 'cancer' without language restriction. References cited in retrieved original studies, as well as in review articles and previous meta-analyses, were examined for additional studies suitable for inclusion in this meta-analysis. The selected articles were published before September 2014.

Inclusion and Exclusion Criteria and Data Extraction

Eligible studies met the following criteria: (a) analysis of an association between the genetic variant rs2910164 and cancer risk

(except for hematological malignancies and nonmelanoma skin cancer); (b) case-control study design; (c) provided sufficient data about the genotype and allele frequencies to calculate risk estimates – odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CIs) and p values, and (d) provided detailed information about the recruitment of participants, diagnostic protocols, genotyping, statistical analysis and other relevant methodological data. An additional criterion was the presence of the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the control group. Studies that included several case-control groups were segregated into multiple study panels which were independently included in the meta-analysis.

The data extracted from the selected studies included: the first author's last name, year of publication, country from which the participants were recruited, ethnicity, source of controls, methods, sample size, genotype, and allele counts. The main exclusion criterion was the presence of major errors in the study design or interpretation and presentation of the results. Data extraction was performed independently by two authors. In case of any disagreement, a consensus was reached by consultation between all authors. The interrater agreeability is presented as Cohen's kappa coefficient [84]. The methodological quality of the included studies was evaluated using the Newcastle-Ottawa Scale criteria [85]. Three aspects including the selection of subjects, the comparability of cases and controls, and the exposure were assessed, with the highest score of 9.

Statistical Analysis

Departures of genotype distributions from the HWE in controls were assessed using the Pearson χ^2 test. The risk estimates for each study were OR and 95% CI. The statistical software OpenMeta-analyst (Center for Evidence-based Medicine, Brown University, Providence, R.I., USA) was used for performing heterogeneity tests and meta-analyses [86]. Estimates of ORs and their 95% CIs were calculated using the fixed-effect or the random-effects model, depending on the results of the heterogeneity tests. For assessing heterogeneity of results across studies, Cochran's Q statistical test was used, combined with the inconsistency index (I^2). Heterogeneity was considered significant at $p < 0.1$, while $I^2 = 0$ –25% suggested no heterogeneity, $I^2 = 25$ –50% moderate heterogeneity, $I^2 = 50$ –75% large heterogeneity, and $I^2 = 75$ –100% extreme heterogeneity. The random-effects model was selected for meta-analysis when heterogeneity tests yielded significant results ($p < 0.1$ or $I^2 \geq 50\%$). For the fixed-effect model, the Mantel-Haenszel method of weighting was applied [87], while for pooling results using the random-effects model, the method proposed by DerSimonian and Laird was chosen [88]. Separate meta-analyses were performed for the effects of heterozygotes and CC homozygotes, compared to the GG genotype, as well as for the allelic (C vs. G), dominant (GC + CC vs. GG), recessive (CC vs. GG + GC), and overdominant (GC vs. GG + CC) genetic models. Selected studies were classified according to cancer type, ethnicity of participants, sample size (<1,000 participants and >1,000 participants), and the source of controls (hospital-based and population-based) and a meta-analysis was performed if two or more studies corresponded to a classification subgroup. Publication bias was assessed by visual inspection of funnel plots and using Egger's test. A p value of Egger's test <0.05 was considered representative of statistically significant publication bias. Sensitivity analysis was carried out by repeating the meta-analysis and removing each study at a time to evaluate the stability of the results.

Table 1. Characteristics of the studies and study panels excluded from the meta-analysis due to deviations from the HWE in controls

Authors [Ref.]	Year	Country	Ethnicity	Cancer type	Con- trols	Genotyping method	Cases/ controls	Genotype distri- bution in cases			Genotype distri- bution in controls			C allele frequency in controls	P _{HWE} in con- trols
								GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Catucci et al. [21]	2010	Italy	Caucasian	familial breast	healthy	sequencing	754/1,243	409	286	59	650	520	73	0.268	0.019
George et al. [30]	2011	India	Asian	prostate	healthy	PCR-RFLP	159/230	4	79	76	7	107	116	0.737	0.002
Mittal et al. [32]	2011	India	Asian	bladder	healthy	PCR-RFLP	212/250	127	79	6	135	108	7	0.244	0.007
Zhang et al. [36]	2011	China	Asian	hepatocellular	healthy	PIRA-PCR	925/1,593	156	450	319	291	725	577	0.590	0.017
Esteban Cardeñosa et al. [40]	2012	Spain	Caucasian	sporadic breast and ovarian	healthy	melting curve analysis	198/189	107	77	14	104	80	5	0.238	0.021
Esteban Cardeñosa et al. [40]	2012	Spain	Caucasian	familial breast and ovarian	healthy	melting curve analysis	340/189	192	124	24	104	80	5	0.238	0.021
Shan et al. [58]	2013	China	Asian	hepatocellular	healthy	PCR-CTPP	172/185	28	62	82	36	71	78	0.614	0.009
Yamashita et al. [63]	2013	Japan	Asian	malignant melanoma	healthy	PCR-RFLP	50/107	0	35	15	3	53	51	0.724	0.013
Omrani et al. [77]	2014	Iran	Asian	breast	healthy	T-ARMS-PCR	236/203	183	45	8	155	39	9	0.140	0.004
Palmieri et al. [78] (controls from Fenoglio et al. [101])	2014	Italy	Caucasian	OSCC	healthy	TaqMan assay	337/339	197	121	19	195	115	29	0.255	0.048
Qi et al. [81]	2014	China	Asian	hepatocellular	healthy	HRMA	314/407	0	165	149	3	244	159	0.692	<0.001
Zhou et al. [83]	2014	China	Asian	hepatocellular	healthy	PCR-RFLP	266/281	40	153	73	30	154	97	0.619	0.007

PCR-RFLP = Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments; PIRA-PCR = primer-introduced restriction analysis PCR; PCR-CTPP = PCR with confronting two-pair primers; T-ARMS-PCR = tetra-primer amplification refractory mutation system PCR; HRMA = high-resolution melting analysis.

Results

Study Identification and HWE Assessment

The flowchart of study selection for this meta-analysis is presented in figure 1. A total of 276 records were retrieved through database searching by using several combinations of key words. By reviewing reference lists, an additional 4 records were identified. After removing overlapping records, together with 19 studies not relevant to the topic, the 106 remaining full-text articles were assessed for eligibility. A total of 36 articles were excluded for not meeting the inclusion criteria. Among the excluded records, 28 were meta-analyses and reviews, while 6 were case-only studies. One potentially eligible article did not provide data on the distribution of all 3 genotypes, but was still included in the meta-analysis for the dominant genetic model [59]. Another study by Ye et al. [17] that did not provide any data on genotype counts was excluded. Three studies included genotyping data for ≥ 2 countries/regions of origin of

study participants, based on which multiple study panels were formed [11, 21, 78]. Furthermore, 2 studies were conducted on the association of rs2910164 with different types or subtypes of cancer [40, 79], while another 2 studies [24, 52] included >1 type of the control group. One study by Alshatwi et al. [38] was excluded from the meta-analysis due to inconsistencies in the presented genotyping results. For the same reason, genotyping data referring to colorectal cancer risk from Parlayan et al. [79] were not pooled for the meta-analysis. After passing the initial eligibility assessment, 9 studies and 2 study panels were excluded from the meta-analysis based on significant departure from the HWE in the control group (table 1). Finally, 61 studies, based on which 69 independent study panels were formed, comprising 28,359 cases and 41,678 controls, were included in the meta-analysis (table 2). After classifying the study panels according to cancer type, ethnicity, sample size, and source of controls, a subgroup meta-analysis was performed. The subgroup data synthesis was conducted

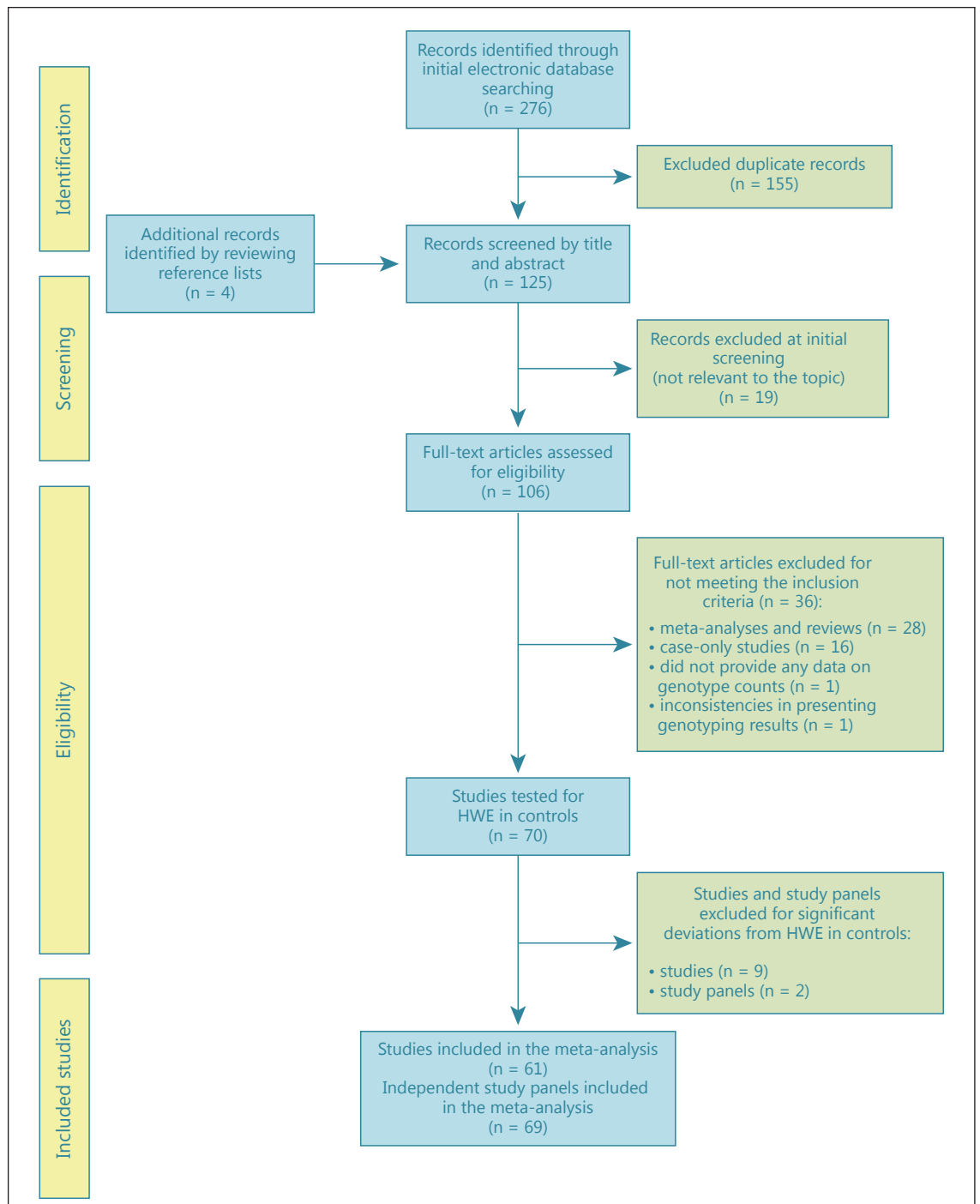


Fig. 1. Flowchart of the study selection process.

for an association of rs2910164 with renal, thyroid, liver, bladder, breast, lung, esophageal, head and neck, gastric, prostate, cervical, and colorectal cancer, as well as with the overall cancer risk in Asians and Caucasians. Cohen's kappa coefficient for interrater agreement was

0.958 (95% CI 0.900–1.016). The results obtained in the assessment of the methodological quality of the included studies are presented in online supplementary table 1 (see www.karger.com/doi/10.1159/000438695 for all online suppl. material).

Table 2. Characteristics of the studies included in the meta-analysis

Authors [Ref.]	Year	Country	Ethnicity	Cancer type	Controls	Genotyping method	Cases/controls	Genotype distribution in cases			Genotype distribution in controls			C allele frequency in controls	P _{HWE} in controls
								GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Horikawa et al. [14]	2008	USA	Caucasian	renal	healthy	SNPlex assay	261/235	144	103	14	126	94	15	0.264	0.648
Jazdzewski et al. [11] (Finland)	2008	Finland	Caucasian	thyroid	healthy	sequencing, SNUPE assay	206/274	99	104	3	150	105	19	0.261	0.915
Jazdzewski et al. [11] (Poland)	2008	Poland	Caucasian	thyroid	healthy	sequencing, SNUPE assay	201/475	115	82	4	286	163	26	0.226	0.661
Jazdzewski et al. [11] (USA)	2008	USA (Ohio)	Caucasian	thyroid	healthy	sequencing, SNUPE assay	201/152	91	101	9	90	52	10	0.237	0.508
Xu et al. [15]	2008	China	Asian	liver	healthy	PCR-RFLP	479/504	80	241	158	58	249	197	0.638	0.119
Yang et al. [16]	2008	USA	Caucasian	bladder	healthy	SNPlex assay	691/674	414	242	35	385	258	31	0.237	0.137
Hoffman et al. [18]	2009	USA	mixed	breast	healthy	MassARRAY	439/478	234	176	29	273	178	27	0.243	0.775
Hu et al. [19]	2009	China	Asian	breast	healthy	PCR-RFLP	1,009/1,093	165	515	329	180	551	362	0.583	0.221
Tian et al. [20]	2009	China	Asian	lung	healthy	PCR-RFLP	1,058/1,035	360	510	188	364	502	169	0.406	0.853
Catucci et al. [21] (Germany)	2010	German	Caucasian	familial breast	healthy	sequencing	805/904	451	304	50	536	318	50	0.231	0.753
Guo et al. [22]	2010	China	Asian	ESCC	healthy	SNAPshot assay	444/468	234	190	20	206	220	42	0.325	0.120
Liu et al. [23]	2010	USA	Caucasian	SCCHN	healthy	PCR-RFLP	1,109/1,130	630	411	68	655	405	70	0.241	0.486
Okubo et al. [24] (controls with ulcer diseases)	2010	Japan	Asian	gastric	with ulcer diseases	PCR-RFLP	552/214	73	243	236	32	109	73	0.596	0.400
Okubo et al. [24] (healthy controls)	2010	Japan	Asian	gastric	healthy	PCR-RFLP	552/483	73	243	236	89	213	181	0.595	0.062
Pastrello et al. [25]	2010	Italy	Caucasian	familial breast and ovarian	healthy	sequencing	101/155	60	36	5	90	59	6	0.229	0.332
Srivastava et al. [26]	2010	India	Asian	gallbladder	healthy	PCR-RFLP	230/224	129	90	11	138	81	5	0.203	0.080
Xu et al. [13]	2010	China	Asian	prostate	healthy	PCR-RFLP	251/280	68	135	48	54	150	76	0.539	0.191
Zeng et al. [27]	2010	China	Asian	gastric	healthy	PCR-RFLP	304/304	62	153	89	53	132	119	0.609	0.122
Akkiz et al. [28]	2011	Turkey	Caucasian	hepatocellular	healthy	PCR-RFLP	222/222	137	75	10	144	67	11	0.200	0.384
Garcia et al. [29]	2011	France and USA	not specified	breast (BRCA1 and BRCA2 carriers)	carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations, unaffected	TaqMan assay	1,130/596	676	388	66	352	220	24	0.225	0.150
Hishida et al. [30]	2011	Japan	Asian	gastric	healthy	PCR-CTPP	583/1,637	82	271	230	229	775	633	0.623	0.738
Permuth-Wey et al. [33]	2011	USA	Caucasian	adult glioma	healthy	Illumina's GoldenGate assay	593/614	345	198	50	375	214	25	0.215	0.419
Vinci et al. [34]	2011	Italy	Caucasian	NSCLC	healthy	HRMA	101/129	44	48	9	73	45	11	0.260	0.292
Yue et al. [35]	2011	China	Asian	cervical	healthy	PCR-RFLP	447/443	118	224	105	87	206	150	0.571	0.285
Zhou et al. [37]	2011	China	Asian	CSCC	healthy	PCR-RFLP	226/309	43	113	70	34	159	116	0.633	0.060
Chu et al. [39]	2012	Taiwan	Asian	oral	healthy	PCR-RFLP	470/425	54	242	174	54	196	175	0.642	0.939
Hezova et al. [41]	2012	Czech Republic	Caucasian	colorectal	healthy	TaqMan assay	197/212	115	70	12	124	79	9	0.229	0.415
Jones et al. [42]	2012	UK	Caucasian	thyroid	healthy	KASPar assay, Illumina's Hap1.2M and Hap550 arrays	748/6,058	436	271	41	3,540	2,179	339	0.236	0.878
Kim et al. [43]	2012	South Korea	Asian	hepatocellular	healthy	PCR-RFLP	159/201	14	88	57	24	103	74	0.624	0.190
Mihalache et al. [44]	2012	Germany and Romania	Caucasian	cholangio-carcinoma	healthy	TaqMan assay	182/350	118	53	11	211	122	17	0.223	0.906

Table 2 (continued)

Authors [Ref.]	Year	Country	Ethnicity	Cancer type	Controls	Genotyping method	Cases/controls	Genotype distribution in cases			Genotype distribution in controls			C allele frequency in controls	P _{HWE} in controls
								GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Min et al. [45]	2012	South Korea	Asian	colorectal	healthy	PCR-RFLP	446/502	62	233	151	69	245	188	0.619	0.443
Wang et al. [46]	2012	China	Asian	bladder	healthy	TaqMan assay	1,017/1,179	369	456	192	340	571	268	0.469	0.341
Xiang et al. [47]	2012	China	Asian	hepatocellular	healthy	PCR-RFLP	100/100	27	45	28	21	46	33	0.560	0.506
Zhou et al. [48]	2012	China	Asian	liver	healthy	PCR-RFLP	186/483	33	86	67	71	254	158	0.590	0.056
Zhou et al. [49]	2012	China	Asian	gastric	healthy	TaqMan assay	1,686/1,895	578	822	286	551	951	393	0.458	0.641
Ahn et al. [50]	2013	South Korea	Asian	gastric	healthy	PCR-RFLP	461/447	71	231	159	62	221	164	0.614	0.362
Chae et al. [51]	2013	South Korea	Asian	colorectal	healthy	PCR-RFLP	399/568	61	182	156	121	282	165	0.539	0.980
Lung et al. [52]	2013	China	Asian	naso-pharyngeal	healthy	melting temperature shift assay	229/163	24	88	117	18	86	59	0.626	0.106
Lung et al. [52] (elderly controls)	2013	China	Asian	naso-pharyngeal	healthy, elderly	melting temperature shift assay	229/3,613	24	88	117	479	1,721	1,413	0.629	0.209
Lv et al. [53]	2013	China	Asian	colorectal	healthy	PCR-RFLP	331/513	54	230	47	96	274	143	0.546	0.080
Ma et al. [54]	2013	China	Asian	colorectal	healthy	TaqMan assay	1,147/1,203	444	534	169	397	614	192	0.415	0.075
Marino et al. [55]	2013	Italy	Caucasian	papillary thyroid	healthy	sequencing	307/206	180	105	22	105	84	17	0.286	0.972
Orsos et al. [56]	2013	Hungary	Caucasian	SCCHN	healthy	PCR-CTPP	468/468	284	168	16	323	136	9	0.165	0.217
Pavlakis et al. [57]	2013	Greece	Caucasian	pancreatic	healthy	PCR-RFLP	93/122	4	38	51	4	39	79	0.807	0.759
Song et al. [59]	2013	USA	Caucasian	OSCC	healthy	PCR-RFLP	325/335	184	?	?	203	?	?	?	0.535
Vinci et al. [60]	2013	Italy	Caucasian	colorectal	healthy	HRMA	160/178	86	57	17	100	65	13	0.256	0.590
Wei et al. [61]	2013	China	Asian	papillary thyroid	healthy	MassARRAY	753/760	136	323	294	138	345	277	0.591	0.094
Wei et al. [62]	2013	China	Asian	esophageal	healthy	SNPscan system	368/370	67	184	117	67	181	122	0.574	0.993
Zhang et al. [64]	2013	China	Asian	hepatocellular	healthy	MassARRAY	997/998	163	503	331	156	475	367	0.606	0.911
Chu et al. [65]	2014	Taiwan	Asian	hepatocellular	healthy	PCR-RFLP	188/337	22	82	84	50	146	141	0.635	0.230
Cong et al. [66]	2014	China	Asian	hepatocellular	healthy	PCR-RFLP	206/218	27	85	94	17	84	117	0.729	0.723
Dikeakos et al. [67]	2014	Greece	Caucasian	gastric	healthy	PCR-RFLP	163/480	13	45	105	24	149	307	0.795	0.289
Du et al. [68]	2014	China	Asian	renal	healthy	TaqMan assay	353/362	68	167	118	57	190	115	0.580	0.141
Hu et al. [69]	2014	China	Asian	colorectal	healthy	PCR-RFLP	200/373	34	82	84	44	187	142	0.631	0.137
Huang et al. [70]	2014	China	Asian	nasopharyngeal	healthy	PCR-RFLP	160/200	23	73	64	36	110	54	0.545	0.123
Jeon et al. [71]	2014	South Korea	Asian	lung	healthy	PCR-RFLP	1,091/1,096	223	500	368	244	540	312	0.531	0.721
Jia et al. [72]	2014	China	Asian	NSCLC	healthy	PCR-RFLP	400/400	64	182	154	76	200	124	0.560	0.770
Kupcinskis et al. [73]	2014	Germany, Lithuania, Latvia	Caucasian	gastric	healthy	TaqMan assay	362/347	252	94	16	223	108	16	0.202	0.531
Kupcinskis et al. [74]	2014	Lithuania, Latvia	Caucasian	colorectal	healthy	TaqMan assay	192/424	140	50	2	275	134	15	0.193	0.789
Mao et al. [75]	2014	China	Asian	colorectal	healthy	SNPscan system	547/561	70	291	186	85	271	205	0.607	0.768
Nikolić et al. [76]	2014	Serbia	Caucasian	prostate	healthy	TaqMan assay	286/199	184	90	12	129	63	7	0.193	0.839
Palmieri et al. [78] (controls from Tuscany, HapMap)	2014	Italy	Caucasian	OSCC	healthy	TaqMan assay	337/88	197	121	19	50	31	7	0.256	0.485
Palmieri et al. [78] (controls from Marino et al. [55])	2014	Italy	Caucasian	OSCC	healthy	TaqMan assay	337/206	197	121	19	105	84	17	0.286	0.972

Table 2 (continued)

Authors [Ref.]	Year	Country	Ethnicity	Cancer type	Controls	Genotyping method	Cases/controls	Genotype distribution in cases			Genotype distribution in controls			C allele frequency in controls	P _{HWE} in controls
								GG	GC	CC	GG	GC	CC		
Palmieri et al. [78] (controls from Manna et al. [100])	2014	Italy	Caucasian	OSCC	healthy	TaqMan assay	337/543	197	121	19	297	206	40	0.263	0.605
Parlayan et al. [79] (gastric cancer)	2014	Japan	Asian	gastric	healthy	TaqMan assay	160/524	20	79	61	71	237	216	0.638	0.640
Parlayan et al. [79] (lung cancer)	2014	Japan	Asian	lung	healthy	TaqMan assay	148/524	25	67	56	71	237	216	0.638	0.640
Parlayan et al. [79] (prostate cancer)	2014	Japan	Asian	prostate	healthy	TaqMan assay	89/524	11	41	37	71	237	216	0.638	0.640
Pu et al. [80]	2014	China	Asian	gastric	healthy	PCR-RFLP	197/513	36	96	65	96	274	143	0.546	0.080
Qu et al. [82]	2014	China	Asian	ESCC	healthy	allele-specific PCR	381/426	62	203	116	75	228	123	0.556	0.082

ESCC = Esophageal squamous cell carcinoma; SCCHN = squamous cell carcinoma of head and neck; NSCLC = non-small cell lung carcinoma; CSCC = cervical squamous cell carcinoma; PCR-RFLP = restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments; PCR-CTPP = PCR with confronting two-pair primers; HRMA = high-resolution melting analysis.

^a Study included in the meta-analysis of the association under the dominant genetic model.

Quantitative Data Synthesis

The results of the meta-analysis of the association between rs2910164 and cancer risk are presented in table 3. Also, a forest plot of the association of the C allele with cancer susceptibility is shown in figure 2. No evidence of a supposed association was found for any genetic model tested, nor for separate heterozygotes and homozygotes of the C allele, compared to the GG genotype ($p_{\text{allelic}} = 0.499$, $OR_{\text{allelic}} = 0.985$, 95% CI 0.944–1.029; $p_{\text{GC}} = 0.293$, $OR_{\text{GC}} = 0.972$, 95% CI 0.921–1.025; $p_{\text{CC}} = 0.315$, $OR_{\text{CC}} = 0.954$, 95% CI 0.870–1.046; $p_{\text{dom}} = 0.411$, $OR_{\text{dom}} = 0.944$, 95% CI 0.823–1.083; $p_{\text{rec}} = 0.607$, $OR_{\text{rec}} = 0.982$, 95% CI 0.915–1.054; $p_{\text{overdom}} = 0.597$, $OR_{\text{overdom}} = 0.987$, 95% CI 0.942–1.035). The random-effects model was selected for these meta-analyses due to significant between-study heterogeneity ($p_{\text{het}} < 0.001$).

In the subgroup analysis, where studies were classified according to cancer type, a significant association was found between the C allele and a reduced risk of bladder cancer (fig. 2; table 3). Statistical significance was obtained for the supposed association under allelic, dominant, and overdominant genetic models ($p_{\text{allelic}} = 0.046$, $OR_{\text{allelic}} = 0.851$, 95% CI 0.726–0.997; $p_{\text{dom}} = 0.036$, $OR_{\text{dom}} = 0.790$, 95% CI 0.634–0.984; $p_{\text{overdom}} = 0.036$, $OR_{\text{overdom}} = 0.867$, 95% CI 0.758–0.991). Furthermore, the GC genotype was found to confer a decreased risk of developing bladder cancer, compared to the GG homozygote ($p_{\text{GC}} = 0.002$, $OR_{\text{GC}} = 0.791$, 95% CI 0.684–0.915), while for the association between the C allele and the sus-

ceptibility to develop this type of cancer under the recessive genetic model, a statistical trend of significance was reached ($p_{\text{rec}} = 0.059$). Even though p values obtained in heterogeneity tests were >0.1 for all genetic models tested, inconsistency indexes for allelic and dominant genetic models, as well as for the GC versus GG comparison, suggested significant heterogeneity among study panels included in the bladder cancer subgroup meta-analysis, for which reason the fixed-effect model was considered appropriate.

Similar results were obtained in tests of an association between rs2910164 and cervical cancer (table 3). Minor C allele was found to confer a decreased risk of developing this type of malignancy ($p_{\text{allelic}} < 0.001$, $OR_{\text{allelic}} = 0.719$, 95% CI 0.620–0.835; $p_{\text{GC}} = 0.022$, $OR_{\text{GC}} = 0.721$, 95% CI 0.545–0.953; $p_{\text{CC}} < 0.001$, $OR_{\text{CC}} = 0.503$, 95% CI 0.370–0.684; $p_{\text{dom}} < 0.001$, $OR_{\text{dom}} = 0.632$, 95% CI 0.485–0.823; $p_{\text{rec}} < 0.001$, $OR_{\text{rec}} = 0.654$, 95% CI 0.520–0.822). Only for the association under the overdominant genetic model was statistical significance not reached ($p_{\text{overdom}} = 0.514$, $OR_{\text{overdom}} = 1.072$, 95% CI 0.870–1.321). For all genetic models tested, the fixed-effect model of meta-analysis was used, since heterogeneity between studies was not found to be significant.

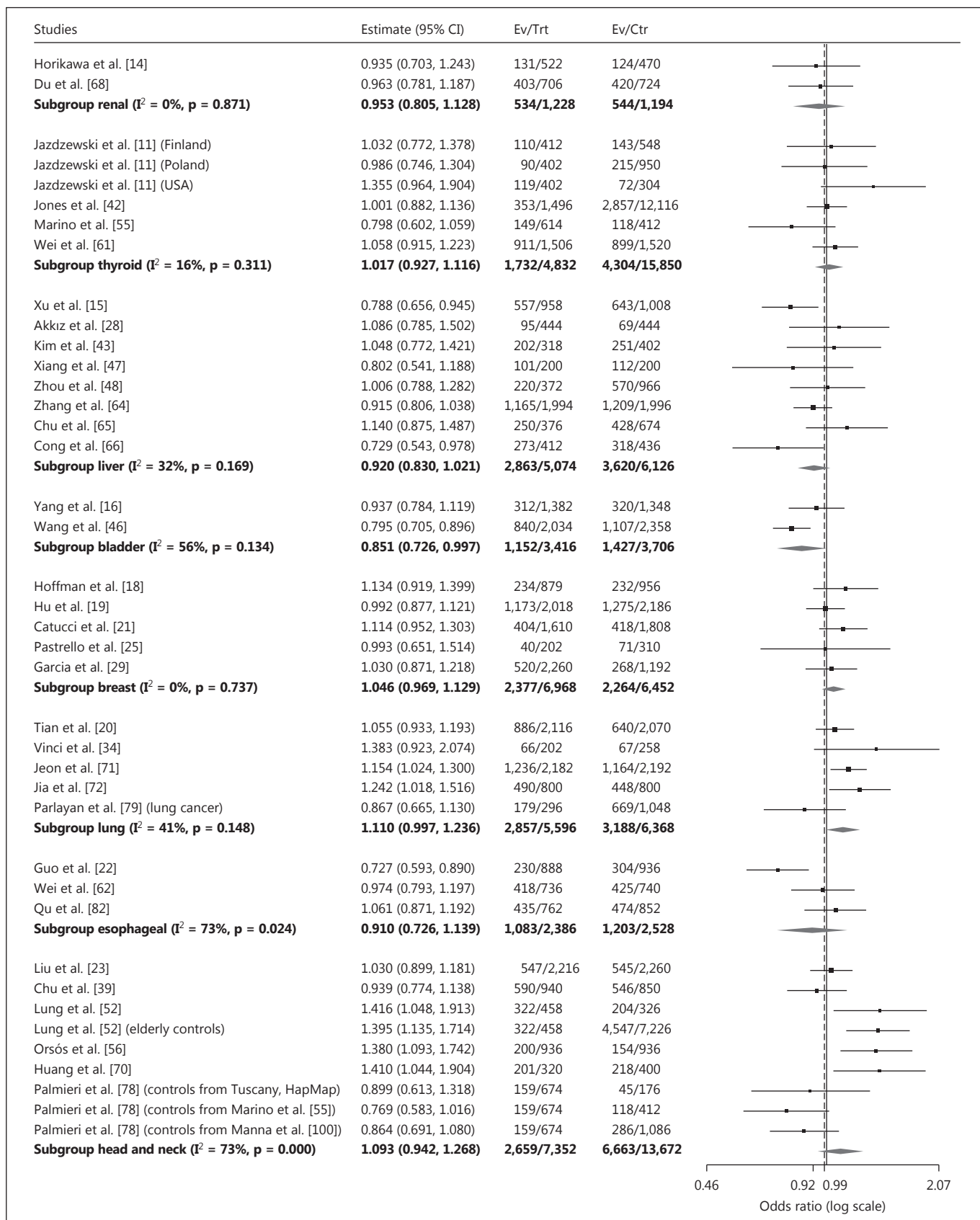
Furthermore, by applying the fixed-effect model of meta-analysis, rs2910164 was found to be associated with liver cancer risk under the allelic genetic model ($p_{\text{allelic}} = 0.024$; table 3). However, the reduction in the liver cancer risk associated with the C allele was shown to be only

Table 3. Meta-analysis of the association between the genetic variant rs2910164 and cancer risk

n	GC vs. GG		CC vs. GG		Allelic (C vs. G)		Dominant (GC + CC vs. GG)		Recessive (CC vs. GG + GC)		Overdominant (CC vs. GG + GC)								
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P							
Overall	0.972 (0.921–1.025)	0.293	<0.001	0.315	<0.001	0.985 (0.944–1.029)	0.499	<0.001	0.944 (0.823–1.083)	0.411	<0.001	0.982 (0.915–1.054)	0.607	<0.001	0.597	<0.001			
<i>Cancer type</i>																			
Renal	2	0.852 (0.648–1.120)	0.251	0.348	0.849 (0.581–1.240)	0.398	0.908	0.953 (0.805–1.128)	0.575	0.871	0.231 (0.015–3.621)	0.296	<0.001	1.038 (0.778–1.385)	0.802	0.530	0.875 (0.697–1.099)	0.250	0.436
Thyroid	6	1.135 (0.907–1.420)	0.269	0.007	0.910 (0.748–1.107)	0.346	0.123	1.018 (0.940–1.103)	0.665	0.311	1.087 (0.910–1.299)	0.357	0.044	0.789 (0.552–1.128)	0.193	0.030	1.155 (0.914–1.458)	0.227	<0.001
Liver	8	0.940 (0.791–1.096)	0.431	0.249	0.823 (0.696–0.974)	0.024	0.178	0.914 (0.845–0.988)	0.024	0.169	0.802 (0.277–2.324)	0.685	<0.001	0.930 (0.829–1.043)	0.214	0.243	1.057 (0.949–1.176)	0.315	0.724
Bladder	2	0.791 (0.684–0.915)	0.002	0.258	0.788 (0.506–1.225)	0.290	0.102	0.851 (0.736–0.997)	0.046	0.134	0.790 (0.634–0.984)	0.036	0.116	0.832 (0.687–1.007)	0.059	0.221	0.867 (0.758–0.991)	0.036	0.977
Breast	5	1.040 (0.931–1.161)	0.491	0.574	1.123 (0.933–1.351)	0.219	0.716	1.046 (0.969–1.129)	0.249	0.737	1.059 (0.952–1.177)	0.293	0.691	1.060 (0.913–1.230)	0.442	0.560	1.024 (0.927–1.131)	0.636	0.530
Lung	5	1.044 (0.919–1.185)	0.509	0.334	1.201 (1.033–1.397)	0.017	0.311	1.110 (1.031–1.196)	0.006	0.148	0.655 (0.285–1.504)	0.319	<0.001	1.194 (1.059–1.346)	0.004	0.298	0.940 (0.848–1.043)	0.243	0.159
Esophageal	3	0.889 (0.733–1.078)	0.231	0.262	0.795 (0.461–1.370)	0.409	0.017	0.910 (0.726–1.139)	0.410	0.024	0.893 (0.670–1.189)	0.438	0.106	0.841 (0.572–1.237)	0.378	0.038	0.948 (0.809–1.111)	0.512	0.523
Head and neck ^b	9	1.043 (0.935–1.162)	0.452	0.275	1.122 (0.863–1.458)	0.390	0.058	1.093 (0.942–1.268)	0.242	<0.001	1.069 (0.969–1.179)	0.185	0.137	1.002 (0.827–1.215)	0.980	0.094	0.913 (0.759–1.099)	0.337	<0.001
Gastric	10	0.902 (0.817–0.997)	0.043	0.280	0.954 (0.766–1.188)	0.673	0.003	0.975 (0.874–1.088)	0.655	<0.001	1.259 (0.876–1.812)	0.214	<0.001	0.974 (0.834–1.138)	0.740	0.003	0.955 (0.884–1.031)	0.238	0.314
Prostate	3	0.890 (0.682–1.162)	0.393	0.417	0.803 (0.458–1.474)	0.480	0.111	0.901 (0.702–1.157)	0.414	0.119	0.861 (0.668–1.110)	0.248	0.192	0.814 (0.610–1.087)	0.163	0.228	1.009 (0.807–1.261)	0.937	0.990
Cervical	2	0.721 (0.545–0.953)	0.022	0.254	0.503 (0.370–0.684)	<0.001	0.814	0.719 (0.620–0.835)	<0.001	0.796	0.632 (0.485–0.823)	<0.001	0.382	0.654 (0.520–0.822)	<0.001	0.359	1.072 (0.870–1.321)	0.514	0.358
Colorectal	9	0.986 (0.809–1.202)	0.889	0.005	0.966 (0.725–1.288)	0.814	0.001	0.965 (0.847–1.100)	0.596	<0.001	1.083 (0.881–1.332)	0.450	<0.001	0.944 (0.719–1.239)	0.677	<0.001	1.000 (0.814–1.228)	0.999	<0.001
<i>Ethnicity</i>																			
Caucasian ^b	25	1.013 (0.926–1.108)	0.778	0.011	0.973 (0.824–1.151)	0.753	0.092	0.999 (0.936–1.066)	0.967	0.033	1.104 (0.960–1.270)	0.166	<0.001	1.000 (0.856–1.170)	0.995	0.081	1.025 (0.939–1.119)	0.577	0.008
Asian	41	0.941 (0.879–1.007)	0.078	0.025	0.937 (0.837–1.048)	0.253	<0.001	0.977 (0.923–1.034)	0.415	<0.001	0.839 (0.676–1.041)	0.112	<0.001	0.968 (0.892–1.049)	0.425	<0.001	0.970 (0.914–1.028)	0.300	<0.001
<i>Sample size</i>																			
<1,000 ^b	50	0.864 (0.700–1.064)	0.175	<0.001	0.892 (0.787–1.010)	0.072	<0.001	1.043 (0.946–1.149)	0.398	<0.001	0.964 (0.893–1.042)	0.359	<0.001	0.951 (0.859–1.052)	0.327	<0.001	1.007 (0.940–1.080)	0.836	<0.001
>1,000	18	1.045 (0.756–1.444)	0.790	<0.001	1.058 (0.923–1.212)	0.420	<0.001	0.972 (0.918–1.030)	0.336	<0.001	1.258 (0.720–2.200)	0.420	<0.001	1.022 (0.931–1.121)	0.646	<0.001	0.958 (0.909–1.010)	0.113	0.107
<i>Source of controls</i>																			
PB	21	1.055 (0.983–1.133)	0.138	0.305	0.962 (0.830–1.115)	0.606	0.004	1.051 (0.998–1.106)	0.059	<0.001	0.966 (0.761–1.227)	0.778	<0.001	1.072 (0.941–1.222)	0.295	<0.001	1.021 (0.937–1.114)	0.630	0.002
HB ^b	44	0.912 (0.854–0.975)	0.007	0.011	0.935 (0.826–1.059)	0.290	<0.001	0.941 (0.889–0.997)	0.038	<0.001	1.058 (0.863–1.298)	0.586	<0.001	0.941 (0.857–1.034)	0.205	<0.001	0.963 (0.909–1.019)	0.190	0.001

PB = Population-based; HB = hospital-based.

^a p value obtained in the heterogeneity test. ^b For the dominant model, an additional study by Song et al. [59] was included in the meta-analysis.



(For legend see next page.)

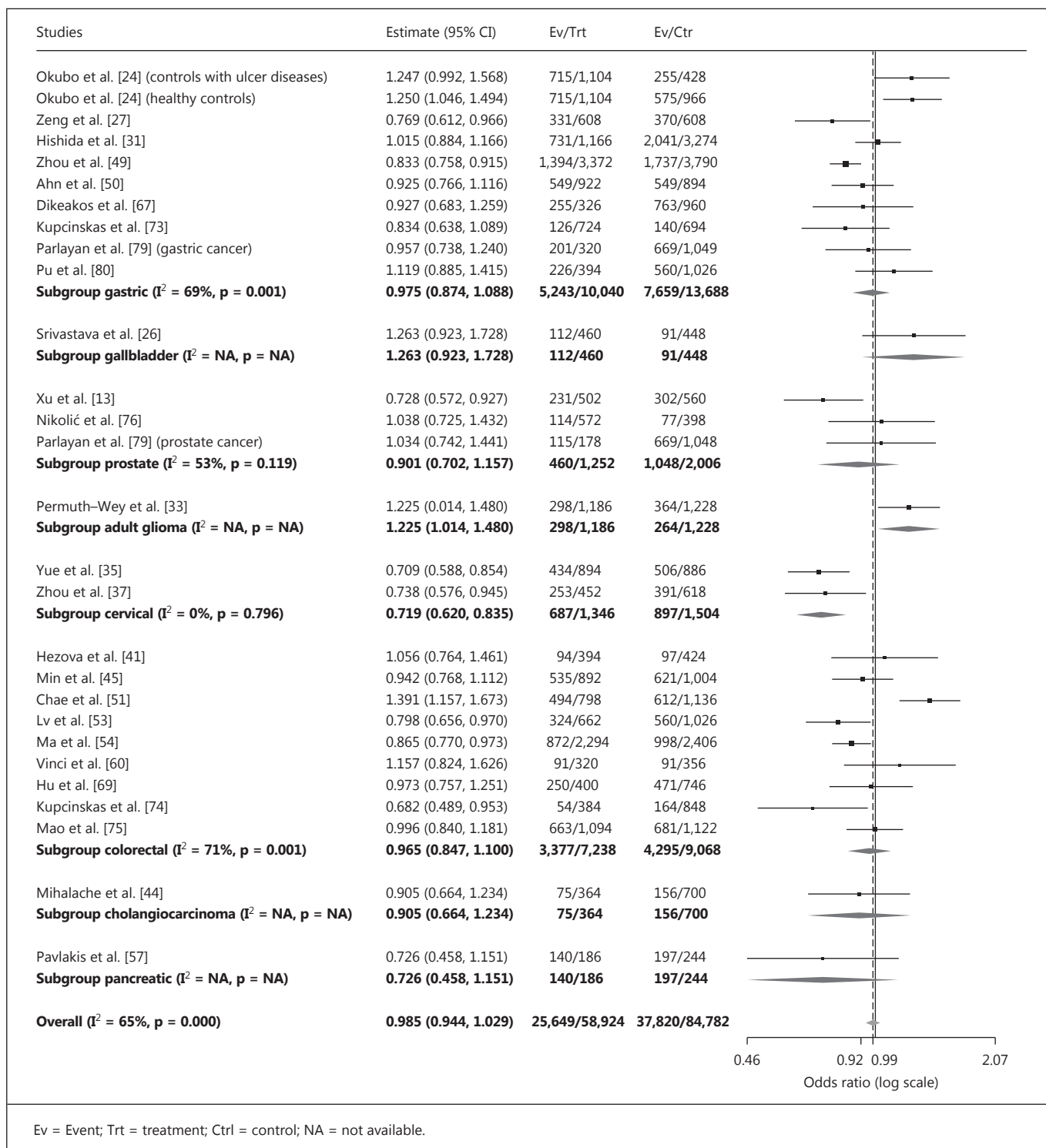


Fig. 2. Meta-analysis of the association between rs2910164 and cancer risk under the allelic genetic model (random-effects model used for the meta-analysis). The subgroup meta-analysis was based on cancer type criteria. The results of different studies presented

as ORs, with 95% CI, and the overall effect with 95% CI are shown in the forest plot. The size of the square symbol representing the study's result is proportional to the weight assigned to the study. *p* values presented are derived from heterogeneity tests.

slight ($OR_{\text{allelic}} = 0.914$, 95% CI 0.845–0.988). For this cancer type, the CC genotype was also found to decrease cancer susceptibility compared to the GG homozygote ($p_{\text{CC}} = 0.024$, $OR_{\text{CC}} = 0.823$, 95% CI 0.696–0.974).

On the other hand, when analyzing the association between rs2910164 and lung cancer, the C allele was shown to confer increased susceptibility ($p_{\text{allelic}} = 0.006$, $OR_{\text{allelic}} = 1.110$, 95% CI 1.031–1.196; table 3). Except for the effects of the C allele on lung cancer risk, statistical significance was found for the association of the CC genotype with increased lung cancer susceptibility, compared to the GG genotype, and also for the recessive genetic model ($p_{\text{CC}} = 0.017$, $OR_{\text{CC}} = 1.201$, 95% CI 1.033–1.397; $p_{\text{rec}} = 0.004$, $OR_{\text{rec}} = 1.194$, 95% CI 1.059–1.346).

Additionally, the GC genotype was shown to slightly decrease the risk of developing gastric cancer, compared to the GG homozygote ($p_{\text{GC}} = 0.043$, $OR_{\text{GC}} = 0.902$, 95% CI 0.817–0.997; table 3). Statistical significance was not reached in any other comparison regarding rs2910164 alleles and genotypes and gastric cancer susceptibility.

Although rs2910164 was not found to be associated with the risk of developing head and neck cancers in general, when they were stratified according to specific type and site of origin, the C allele was shown to decrease the oral squamous cell carcinoma (OSCC) risk ($p_{\text{allelic}} = 0.028$, $OR_{\text{allelic}} = 0.838$, 95% CI 0.715–0.982), while for nasopharyngeal cancer, statistical significance was reached for the recessive and overdominant genetic model of the supposed association ($p_{\text{rec}} < 0.001$, $OR_{\text{rec}} = 1.711$, 95% CI 1.401–2.091; $p_{\text{overdom}} < 0.001$, $OR_{\text{overdom}} = 0.654$, 95% CI 0.535–0.798).

When ethnicity-based subgroup meta-analysis was performed, statistical significance was not reached for the association between rs2910164 and cancer risk in general in Asians ($p_{\text{allelic}} = 0.415$; $p_{\text{GC}} = 0.078$; $p_{\text{CC}} = 0.253$; $p_{\text{dom}} = 0.112$; $p_{\text{rec}} = 0.425$; $p_{\text{overdom}} = 0.300$) and Caucasians ($p_{\text{allelic}} = 0.967$; $p_{\text{GC}} = 0.778$; $p_{\text{CC}} = 0.753$; $p_{\text{dom}} = 0.166$; $p_{\text{rec}} = 0.995$; $p_{\text{overdom}} = 0.577$) (table 3). No subgroup of studies in African populations was formed, and the association of rs2910164 with cancer risk in populations of African descent was not assessed since none of the studies included in this meta-analysis involved case-control groups derived from these populations. When subgroups of studies on specific cancer types were further stratified according to ethnicity of the participants, the results did not significantly differ in Asians and Caucasians (results not shown). This stratified meta-analysis based on ethnicity criteria was possible for only a few types of cancer: breast, colorectal, gastric, head and neck, liver, lung, prostate, and thyroid. The subgroup meta-analysis based on

the sample size yielded no statistical significance (table 3). On the other hand, in hospital-based studies, rs2910164 was found to be associated with the overall cancer risk (table 3).

Publication Bias Assessment and Sensitivity Analysis

Visual inspection of funnel plots did not show any obvious asymmetry which would suggest the presence of a publication bias (online suppl. fig. 1). Furthermore, the results of Egger's tests did not reveal any evidence of a publication bias in this meta-analysis for any genetic model tested (online suppl. table 2). The pooled ORs obtained in the meta-analyses were not significantly influenced by the exclusion of any study, which indicated that the results were statistically stable (results not shown).

Discussion

The genetic variant rs2910164 located in the *hsa-miR-146a* gene was hypothesized to be a cancer susceptibility SNP due to its potential functional significance [11]. Specifically, this variant was shown to influence the biogenesis of mature miRNA by analyzing gene expression patterns associated with different genotypes in multiple normal and malignant tissues, as well as in transfected cell lines [11, 13, 34, 35, 46, 63]. This property of rs2910164 was explained by the destabilizing effect of the minor C allele on the hairpin structure of miRNA precursors. Also, the substitution of a major with a minor allele would influence the sequence of miR-146a passenger strand, which could have consequences in altering basic cellular processes; therefore, one should consider accumulating data on the potential functional significance of these miRNA molecules [11, 89]. Evidence to substantiate these claims were obtained in a study by Jazdzewski et al. [12] that showed the concurrent presence of leading and passenger strands of miR-146a in thyroid tissue. These authors predicted 3 profoundly different target gene groups for mature miRNA products of *hsa-miR-146a*, with only 1 target gene being shared among all 3 of them. The supposed functionality of all 3 products of the *hsa-miR-146a* gene was also supported by the results obtained by Lung et al. [52], which show the interaction of mature miRNAs encoded by this gene with the AGO2 protein, a key component of the RNA-induced silencing complex, as well as the suppressive effects exerted by these regulatory molecules. Furthermore, rs2910164 genotypes were shown to influence the transcription patterns of papillary thyroid cancer and surrounding normal tissue [12].

Although numerous studies have described an association of rs2910164 with the risk of developing cancer and/or its progression to a more aggressive form, there have been inconsistencies in the findings regarding different types of cancer, as well as in the results obtained for the association with a specific type of malignancy in participants from different populations [11, 13–83]. In order to elucidate the potential effect of rs2910164 on cancer susceptibility as well as the possible cancer type-specific and ethnicity-related differences, we have performed a meta-analysis including all case-control studies related to this issue published until September 2014, except those not meeting the basic requirements, such as the presence of HWE in control groups, or consistency in reporting results. The main rationale for conducting this type of comprehensive analysis was to obtain data significant for the future construction of algorithms for assessing the risk of developing particular types of malignant tumors. Since cancer represents one of the main health issues, upgrading the diagnostics and treatment of cancer by implementing genetic data in clinical protocols could greatly reflect public health in general [90]. Therefore, it is important to characterize the potential influence of rs2910164, as one of the most extensively studied microRNA-related genetic variant, on the risk of developing various types of cancer, and also to determine the effect of potential ethnic differences. Compared to the most recent meta-analysis of association between rs2910164 and cancer risk by Ma et al. [91] from 2013, this study included 22 new results published in 2013 and 2014, while several other reports were excluded due to deviations from the HWE in control groups. Furthermore, the segregation of several studies into 2 or more independent study panels was inconsistent with Ma et al. [91], as well as with previous meta-analyses [92–99]. Therefore, this meta-analysis offers an up-to-date perspective on the effect of rs2910164 on cancer risk, with a considerable amount of recently published results included in the risk assessment. Taking into account the percent of the studies on this issue published in the period between the present meta-analysis and the previous one, and also the relatively small number of studies on specific types of cancer, any new result included in the data synthesis could yield better estimates, and therefore, be of significance to tendencies to improve the clinical practice in the area of treating malignant diseases. Furthermore, although most of the meta-analyses are based on the allelic model of association, we did not presume the adequate genetic model a priori, tending not to overlook the true association. It was also not presumed that rs2910164 is associated with the risk of developing

different types of cancer under the same genetic model, since their molecular bases differ and there could be multiple oncogenic or tumor-suppressive molecular pathways involving miR-146a targets.

In this meta-analysis, no evidence of association between rs2910164 and the overall cancer risk under any genetic model tested was obtained. Nevertheless, in the subgroup meta-analysis, the C allele was found to confer a decreased risk of developing bladder, cervical or liver cancer, as well as OSCC, but also to be associated with an increased risk of lung cancer. The lack of evidence for overall cancer risk associated with rs2910164 could, therefore, be explained by the opposing effects of the same allelic variant on cancer type-specific susceptibility. Biologically, these opposing effects of the C allele of rs2910164 could be caused by differences in the molecular pathogenesis of cancer types analyzed in this meta-analysis. Furthermore, the GC heterozygote, but not the CC genotype, was found to be associated with a slightly decreased risk of gastric cancer, while for nasopharyngeal cancer, contrasting directions of the association between rs2910164 and cancer susceptibility were found for the recessive and overdominant genetic models.

The lack of evidence of an association between this variant and susceptibility to specific cancer types could be the result of the small number of studies included in this meta-analysis, as well as of the small sample sizes of these studies, differences in the genetic background of the populations, and differences in their demographics. The effect of the genetic background on the association between rs2910164 and cancer susceptibility is supported by significant differences in allele frequencies in Asians and Caucasians. While in Asians the minor allele in most of the studies was G, in Caucasians this allele was mostly found to be the more frequent allelic variant of rs2910164. Furthermore, allele frequencies in controls in multiple studies conducted in same populations, even by the same research groups in their separate studies, were found to deviate significantly, resulting in different alleles being presented as the minor variant. The C allele, for instance, has a frequency span of about 20–70% in controls in studies conducted in a Chinese population, while for 2 studies conducted in India at the same research center, which were excluded from this meta-analysis due to deviations from the HWE [30, 32], the minor allele frequencies in controls were 26 and 24%, but for different alleles. These results raise questions about possible errors in the interpretations and differences in the presentation of the results of genotyping, which could be affected by a specific G>C allelic combination. In this meta-analysis, no evi-

dence of an association of rs2910164 and cancer was obtained when studies were stratified according to ethnicity. Nevertheless, in some cancer type-based subgroups, all of the studies were conducted in Asians, so that the association of rs2910164 with these specific cancer types in Caucasians and the influence of ethnicity on the results of the meta-analysis in these subgroups could not be assessed. This could also influence the results of an ethnicity-based stratified meta-analysis of an association between rs2910164 and cancer risk in general. For African populations, the effect of rs2910164 alleles and genotypes on cancer risk remains unknown, since studies with this subject were not performed in populations of African descent. In the present study, we found evidence of an association between rs2910164 and overall cancer in a hospital-based subgroup of studies. These results need to be interpreted with caution, since hospital-based studies are considered less representative and more prone to selection bias than population-based studies.

The results of a meta-analysis could also be influenced by differences in the recruitment of study participants, mainly in the selection of patients and controls and in the characteristics of control groups. In several studies, only a specific subgroup of cancer patients was included, such as elderly subjects [79], patients with a familial form of cancer [21, 25], or mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes [29]. Therefore, the inclusion of the results obtained in these studies could lead to a lack of statistical significance in quantitative data synthesis. Furthermore, possible confounders, like age, gender, smoking status, and others, being specific to a certain cancer type, could affect the results of the meta-analysis. These factors were not uniformly assessed among the studies on the same cancer type, and were, therefore, not included in this study.

In order to confirm the assessed association between rs2910164 and susceptibility to bladder, cervical, liver,

gastric, lung and nasopharyngeal cancer and OSCC, as well as to further evaluate the effect of this genetic variant on the risk of developing other types of cancer, additional studies in multiple populations and different ethnic groups are required. This mainly refers to African and additional Caucasian populations. Inclusion of these future replication studies in meta-analyses could lead to a better evaluation of the potential influence of the genetic background on the obtained results regarding the association of rs2910164 with cancer risk in general and the risk of developing certain cancer types. Also, for every specific type of cancer, inclusion of data on possible confounders could lead to a more precise estimation of the effects of rs2910164, as well as to the potential association of the SNP-environment interaction with cancer risk.

In conclusion, the genetic variant rs2910164, located in the *hsa-miR-146a* gene, could represent a potentially valuable genetic biomarker associated with the susceptibility to specific types of cancer. Nevertheless, these findings need to be further evaluated by performing additional replication studies in multiple populations with different ethnic backgrounds.

Acknowledgments

The research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Serbia (Project No. 173016). Furthermore, the scientific work of Zorana Nikolić was supported by a scholarship for PhD students granted by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Serbia.

Disclosure Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- 1 Stewart BW, Wild CP (eds): World Cancer Report 2014. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2014.
- 2 Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D: Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 2012; 13:790–801.
- 3 Shen MM, Abate-Shen C: Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010;24:1967–2000.
- 4 Lee SK, Calin GA: Non-coding RNAs and cancer: new paradigms in oncology. *Discov Med* 2011;11:245–254.
- 5 Gibb EA, Vucic EA, Enfield KSS, Stewart GL, Lonergan KM, Kennett JY, Becker-Santos DD, MacAulay CE, Lam S, Brown CJ, Lam WL: Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLoS One* 2011;6:e25915.
- 6 Jansson MD, Lund AH: MicroRNA and cancer. *Mol Oncol* 2012;6:590–610.
- 7 Wilson RC, Doudna JA: Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biochem* 2013;42:217–239.
- 8 Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T: MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol* 2013;774:1–20.
- 9 Mishra PJ, Bertino JR: MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009;10:399–416.
- 10 Ryan BM, Robles AI, Harris CC: Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010;10:389–402.

- 11 Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A: Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:7269–7274.
- 12 Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, de la Chapelle A: Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:1502–1505.
- 13 Xu B, Feng NH, Li PC, Tao J, Wu D, Zhang ZD, Tong N, Wang JF, Song NH, Zhang W, Hua LX, Wu HF: A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate* 2010;70:467–472.
- 14 Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, Lin J, Habuchi T, Wu X: Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:7956–7962.
- 15 Xu T, Zhu Y, Wei QK, Yuan Y, Zhou F, Ge YY, Yang JR, Su H, Zhuang SM: A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2008;29:2126–2131.
- 16 Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X: Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res* 2008;68:2530–2537.
- 17 Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, Wu X: Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)* 2008;1:460–469.
- 18 Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, Zhang Y, Paranjape T, Zhu Y: microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res* 2009;69:5970–5977.
- 19 Hu Z, Liang J, Wang Z, Tian T, Zhou X, Chen J, Miao R, Wang Y, Wang X, Shen H: Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum Mutat* 2009;30:79–84.
- 20 Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, Jin G, Liang J, Liu P, Zhou X, Miao R, Ma H, Chen Y, Shen H: A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:1183–1187.
- 21 Catucci I, Yang R, Verderio P, Pizzamiglio S, Heesen L, Hemminki K, Sutter C, Wappenschmidt B, Dick M, Arnold N, Bugert P, Niederacher D, Meindl A, Schmutzler RK, Bartram CC, Ficarazzi F, Tizzoni L, Zaffaroni D, Manoukian S, Barile M, Pierotti MA, Radice P, Burwinkel B, Peterlongo P: Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as low-penetrance alleles in German and Italian familial breast cancer cases. *Hum Mutat* 2010;31:E1052–E1057.
- 22 Guo H, Wang K, Xiong G, Hu H, Wang D, Xu X, Guan X, Yang K, Bai Y: A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Fam Cancer* 2010;9:599–603.
- 23 Liu Z, Li G, Wei S, Niu J, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q: Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2010;116:4753–4760.
- 24 Okubo M, Tahara T, Shibata T, Yamashita H, Nakamura M, Yoshioka D, Yonemura J, Ishizuka T, Arisawa T, Hirata I: Association between common genetic variants in pre-microRNAs and gastric cancer risk in Japanese population. *Helicobacter* 2010;15:524–531.
- 25 Pastrello C, Polesel J, Della Puppa L, Viel A, Maestro R: Association between hsa-miR-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis* 2010;31:2124–2126.
- 26 Srivastava K, Srivastava A, Mittal B: Common genetic variants in pre-microRNAs and risk of gallbladder cancer in North Indian population. *J Hum Genet* 2010;55:495–499.
- 27 Zeng Y, Sun QM, Liu NN, Dong GH, Chen J, Yang L, Wang B: Correlation between pre-miR-146a C/G polymorphism and gastric cancer risk in Chinese population. *World J Gastroenterol* 2010;16:3578–3583.
- 28 Akkız H, Bayram S, Bekar A, Akgöllü E, Usküdar O, Sandıkçı M: No association of pre-microRNA-146a rs2910164 polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish population: a case-control study. *Gene* 2011;486:104–109.
- 29 Garcia AI, Cox DG, Barjhoux L, Verny-Pierre C, Barnes D; Gemo Study Collaborators, Antoniou AC, Stoppa-Lyonnet D, Sinilnikova OM, Mazoyer S: The rs2910164:G>C SNP in the MIR146A gene is not associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Hum Mutat* 2011;32:1004–1007.
- 30 George GP, Gangwar R, Mandal RK, Sankhwar SN, Mittal RD: Genetic variation in microRNA genes and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Biol Rep* 2011;38:1609–1615.
- 31 Hishida A, Matsuo K, Goto Y, Naito M, Wakai K, Tajima K, Hamajima N/C: Combined effect of miR-146a rs2910164 G/C polymorphism and Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism on the risk of severe gastric atrophy in Japanese. *Dig Dis Sci* 2011;56:1131–1137.
- 32 Mittal RD, Gangwar R, George GP, Mittal T, Kapoor R: Investigative role of pre-microRNAs in bladder cancer patients: a case-control study in North India. *DNA Cell Biol* 2011;30:401–406.
- 33 Permeth-Wey J, Thompson RC, Burton Nabors L, Olson JJ, Browning JE, Madden MH, Ann Chen Y, Egan KM: A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma. *J Neurooncol* 2011;105:639–646.
- 34 Vinci S, Gelmini S, Pratesi N, Conti S, Malentacchi F, Simi L, Pazzagli M, Orlando C: Genetic variants in miR-146a, miR-149, miR-196a2, miR-499 and their influence on relative expression in lung cancers. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:2073–2080.
- 35 Yue C, Wang M, Ding B, Wang W, Fu S, Zhou D, Zhang Z, Han S: Polymorphism of the pre-miR-146a is associated with risk of cervical cancer in a Chinese population. *Gynecol Oncol* 2011;122:33–37.
- 36 Zhang XW, Pan SD, Feng YL, Liu JB, Dong J, Zhang YX, Chen JG, Hu ZB, Shen HB: Relationship between genetic polymorphism in microRNAs precursor and genetic predisposition of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2011;45:239–243.
- 37 Zhou B, Wang K, Wang Y, Xi M, Zhang Z, Song Y, Zhang L: Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs and risk of cervical squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2011;50:499–505.
- 38 Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Al-Hazzani AA, Alsaif MA, Alsaif AA: Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients. *PLoS One* 2012;7:e30049.
- 39 Chu YH, Tzeng SL, Lin CW, Chien MH, Chen MK, Yang SF: Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer. *PLoS One* 2012;7:e39777.
- 40 Esteban Cardénosa E, de Juan Jiménez I, Palanca Suela S, Chirivella González I, Segura Huerta A, Santaballa Beltran A, Casals El Busto M, Barragán González E, Fuster Lluch O, Bermúdez Edo J, Bolufer Gilabert P: Low penetrance alleles as risk modifiers in familial and sporadic breast cancer. *Fam Cancer* 2012;11:629–636.
- 41 Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Redova M, Vasku A, Svoboda M, Radova L, Kiss I, Vyzula R, Slaby O: Evaluation of SNPs in miR-196a-2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18:2827–2831.
- 42 Jones AM, Howarth KM, Martin L, Gorman M, Mihai R, Moss L, Auton A, Lemon C, Mehanha H, Mohan H, Clarke SE, Wadsley J, Macias E, Coatesworth A, Beasley M, Roques T, Martin C, Ryan P, Gerrard G, Power D, Bremner C; TCUKIN Consortium, Tomlinson I, Carvajal-Carmona LG: Thyroid cancer susceptibility polymorphisms: confirmation of loci on chromosomes 9q22 and 14q13, validation of a recessive 8q24 locus and failure to replicate a locus on 5q24. *J Med Genet* 2012;49:158–163.
- 43 Kim WH, Min KT, Jeon YJ, Kwon CI, Ko KH, Park PW, Hong SP, Rim KS, Kwon SW, Hwang SG, Kim NK: Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population. *Gene* 2012;504:92–97.

- 44 Mihalache F, Hoblinger A, Acalovschi M, Sauerbruch T, Lammert F, Zimmer V: A common variant in the precursor miR-146a sequence does not predispose to cholangiocarcinoma in a large European cohort. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012;11:412–417.
- 45 Min KT, Kim JW, Jeon YJ, Jang MJ, Chong SY, Oh D, Kim NK: Association of the miR-146aC>G, 149C>T, 196a2C>T, and 499A>G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. *Mol Carcinog* 2012; 51:E65–E73.
- 46 Wang M, Chu H, Li P, Yuan L, Fu G, Ma L, Shi D, Zhong D, Tong N, Qin C, Yin C, Zhang Z: Genetic variants in miRNAs predict bladder cancer risk and recurrence. *Cancer Res* 2012;72:6173–6182.
- 47 Xiang Y, Fan S, Cao J, Huang S, Zhang LP: Association of the microRNA-499 variants with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Mol Biol Rep* 2012;39:7019–7023.
- 48 Zhou J, Lv R, Song X, Li D, Hu X, Ying B, Wei Y, Wang L: Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population. *DNA Cell Biol* 2012;31:524–530.
- 49 Zhou F, Zhu H, Luo D, Wang M, Dong X, Hong Y, Lu B, Zhou Y, Zhou J, Zhang Z, Gong W: A functional polymorphism in Pre-miR-146a is associated with susceptibility to gastric cancer in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2012;31:1290–1295.
- 50 Ahn DH, Rah H, Choi YK, Jeon YJ, Min KT, Kwack K, Hong SP, Hwang SG, Kim NK: Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. *Mol Carcinog* 2013; 52:E39–E51.
- 51 Chae YS, Kim JG, Lee SJ, Kang BW, Lee YJ, Park JY, Jeon HS, Park JS, Choi GS: A miR-146a polymorphism (rs2910164) predicts risk of and survival from colorectal cancer. *Anticancer Res* 2013;33:3233–3239.
- 52 Lung RW, Wang X, Tong JH, Chau SL, Lau KM, Cheng SH, Woo JK, Woo J, Leung PC, Ng MH, Tang NL, To KF: A single nucleotide polymorphism in microRNA-146a is associated with the risk for nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog* 2013;52:E28–E38.
- 53 Lv M, Dong W, Li L, Zhang L, Su X, Wang L, Gao L, Zhang L: Association between genetic variants in pre-miRNA and colorectal cancer risk in a Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013;139:1405–1410.
- 54 Ma L, Zhu L, Gu D, Chu H, Tong N, Chen J, Zhang Z, Wang M: A genetic variant in miR-146a modifies colorectal cancer susceptibility in a Chinese population. *Arch Toxicol* 2013; 87:825–833.
- 55 Marino M, Cirello V, Gnarini V, Colombo C, Pignatti E, Casarini L, Diazzi C, Rochira V, Cioni K, Madeo B, Carani C, Simoni M, Fuggazzola L: Are pre-miR-146a and PTTG1 associated with papillary thyroid cancer? *Endocr Connect* 2013;2:178–185.
- 56 Orsós Z, Szanyi I, Csejtei A, Gerlinger I, Ember I, Kiss I: Association of pre-miR-146a rs2910164 polymorphism with the risk of head and neck cancer. *Anticancer Res* 2013; 33:341–346.
- 57 Pavlakis E, Papaconstantinou I, Gazouli M, Theodosopoulos T, Karamanolis G, Genatas K, Ladas SD: MicroRNA gene polymorphisms in pancreatic cancer. *Pancreatol* 2013;13:273–278.
- 58 Shan YF, Huang YH, Chen ZK, Huang KT, Zhou MT, Shi HQ, Song QT, Yu ZP, Deng AM, Zhang QY: miR-499A>G rs3746444 and miR-146aG>C expression and hepatocellular carcinoma risk in the Chinese population. *Genet Mol Res* 2013;12:5365–5371.
- 59 Song X, Sturgis EM, Liu J, Jin L, Wang Z, Zhang C, Wei Q, Li G: MicroRNA variants increase the risk of HPV-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never smokers. *PLoS One* 2013;8:e56622.
- 60 Vinci S, Gelmini S, Mancini I, Malentacchi F, Pazzagli M, Beltrami C, Pinzani P, Orlando C: Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. *Methods* 2013;59:138–146.
- 61 Wei WJ, Wang YL, Li DS, Wang Y, Wang XF, Zhu YX, Yang YJ, Wang ZY, Ma YY, Wu Y, Jin L, Ji QH, Wang JC: Association between the rs2910164 polymorphism in pre-Mir-146a sequence and thyroid carcinogenesis. *PLoS One* 2013;8:e56638.
- 62 Wei J, Zheng L, Liu S, Yin J, Wang L, Wang X, Shi Y, Shao A, Tang W, Ding G, Liu C, Chen S, Gu H: MiR-196a2 rs11614913 T>C polymorphism and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Hum Immunol* 2013;74:1199–1205.
- 63 Yamashita J, Iwakiri T, Fukushima S, Jinnin M, Miyashita A, Hamasaki T, Makino T, Aoi J, Masuguchi S, Inoue Y, Ihn H: The rs2910164 G>C polymorphism in microRNA-146a is associated with the incidence of malignant melanoma. *Melanoma Res* 2013;23:13–20.
- 64 Zhang J, Wang R, Ma YY, Chen LQ, Jin BH, Yu H, Wang JC, Gao CF, Liu J: Association between single nucleotide polymorphisms in miRNA196a-2 and miRNA146a and susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:6427–6431.
- 65 Chu YH, Hsieh MJ, Chiou HL, Liou YS, Yang CC, Yang SF, Kuo WH: MicroRNA gene polymorphisms and environmental factors increase patient susceptibility to hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2014;9:e89930.
- 66 Cong N, Chen H, Bu WZ, Li JP, Liu N, Song JL: miR-146a G>C polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Tumour Biol* 2014;35:5669–5673.
- 67 Dikeakos P, Theodoropoulos G, Rizos S, Tzanakis N, Zografos G, Gazouli M: Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, and miR-196a2T>C polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Greek population. *Mol Biol Rep* 2014;41:1075–1080.
- 68 Du M, Lu D, Wang Q, Chu H, Tong N, Pan X, Qin C, Yin C, Wang M, Zhang Z: Genetic variations in microRNAs and the risk and survival of renal cell cancer. *Carcinogenesis* 2014;35:1629–1635.
- 69 Hu X, Li L, Shang M, Zhou J, Song X, Lu X, Wang J, Ying B, Wang L: Association between microRNA genetic variants and susceptibility to colorectal cancer in Chinese population. *Tumour Biol* 2014;35:2151–2156.
- 70 Huang GL, Chen ML, Li YZ, Lu Y, Pu XX, He YX, Tang SY, Che H, Zou Y, Ding C, He Z: Association of miR-146a gene polymorphism with risk of nasopharyngeal carcinoma in the central-southern Chinese population. *J Hum Genet* 2014;59:141–144.
- 71 Jeon HS, Lee YH, Lee SY, Jang JA, Choi YY, Yoo SS, Lee WK, Choi JE, Son JW, Kang YM, Park JY: A common polymorphism in pre-microRNA-146a is associated with lung cancer risk in a Korean population. *Gene* 2014; 534:66–71.
- 72 Jia Y, Zang A, Shang Y, Yang H, Song Z, Wang Z, Ren L, Wei Y, Hu L, Shi H, Li H: MicroRNA-146a rs2910164 polymorphism is associated with susceptibility to non-small cell lung cancer in the Chinese population. *Med Oncol* 2014;31:194.
- 73 Kupcinskas J, Wex T, Link A, Leja M, Bruzaite I, Steponaitiene R, Juzenas S, Gyvyte U, Ivanauskas A, Ancans G, Petrenkiene V, Skieceviciene J, Kupcinskas L, Malfertheiner P: Gene polymorphisms of microRNAs in *Helicobacter pylori*-induced high risk atrophic gastritis and gastric cancer. *PLoS One* 2014;9:e87467.
- 74 Kupcinskas J, Bruzaite I, Juzenas S, Gyvyte U, Jonaitis L, Kiudelis G, Skieceviciene J, Leja M, Pauzas H, Tamelis A, Pavalkis D, Kupcinskas L: Lack of association between miR-27a, miR-146a, miR-196a-2, miR-492 and miR-608 gene polymorphisms and colorectal cancer. *Sci Rep* 2014;4:5993.
- 75 Mao Y, Li Y, Jing F, Cai S, Zhang Z, Li Q, Ma X, Wang J, Jin M, Chen K: Association of a genetic variant in microRNA-146a with risk of colorectal cancer: a population-based case-control study. *Tumour Biol* 2014;35:6961–6967.
- 76 Nikolić ZZ, Savić Pavičević DLj, Vukotić VD, Tomović SM, Cerović SJ, Filipović N, Romac SP, Brajušković GN: Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control* 2014;25:1571–1575.
- 77 Omrani M, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Hasani SS, Mashhadi MA, Arbabi F, Taheri M: hsa-mir-499 rs3746444 gene polymorphism is associated with susceptibility to breast cancer in an Iranian population. *Biomark Med* 2014;8:259–267.
- 78 Palmieri A, Carinci F, Martinelli M, Pezzetti F, Girardi A, Cura F, Rubini C, Scapoli L: Role of the MIR146A polymorphism in the origin and progression of oral squamous cell carcinoma. *Eur J Oral Sci* 2014;122:198–201.

- 79 Parlayan C, Ikeda S, Sato N, Sawabe M, Muramatsu M, Arai T: Association analysis of single nucleotide polymorphisms in miR-146a and miR-196a2 on the prevalence of cancer in elderly Japanese: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:2101–2107.
- 80 Pu JY, Dong W, Zhang L, Liang WB, Yang Y, Lv ML: No association between single nucleotide polymorphisms in pre-mirnas and the risk of gastric cancer in Chinese population. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17:128–133.
- 81 Qi JH, Wang J, Chen J, Shen F, Huang JT, Sen S, Zhou X, Liu SM: High-resolution melting analysis reveals genetic polymorphisms in microRNAs confer hepatocellular carcinoma risk in Chinese patients. *BMC Cancer* 2014;14:43.
- 82 Qu Y, Qu H, Luo M, Wang P, Song C, Wang K, Zhang J, Dai L: MicroRNAs related polymorphisms and genetic susceptibility to esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Genet Genomics* 2014;289:1123–1130.
- 83 Zhou B, Dong LP, Jing XY, Li JS, Yang SJ, Wang JP, Zhao LF: Association between miR-146aG>C and miR-196a2C>T polymorphisms and the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Tumour Biol* 2014;35:7775–7780.
- 84 Cohen J: A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960;20:37–46.
- 85 Stang A: Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. *Eur J Epidemiol* 2010;25:603–605.
- 86 Wallace BC, Dahabreh IJ, Trikalinos TA, Lau J, Trow P, Schmid CH: Closing the gap between methodologists and end-users: R as a computational back-end. *J Stat Softw* 2012;49:1–15.
- 87 Mantel N, Haenszel W: Statistical aspects of the analysis of data from the retrospective analysis of disease. *J Natl Cancer Inst* 1959;22:719–748.
- 88 DerSimonian R, Laird N: Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986;7:177–188.
- 89 Mah SM, Buske C, Humphries RK, Kuchenbauer F: miRNA*: a passenger stranded in RNA-induced silencing complex? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010;20:141–148.
- 90 Khoury MJ, Bowen S, Bradley LA, Coates R, Dowling NF, Gwinn M, Kolor K, Moore CA, St Pierre J, Valdez R, Yoon PW: A decade of public health genomics in the United States: centers for disease control and prevention 1997–2007. *Public Health Genomics* 2009;12:20–29.
- 91 Ma XP, Zhang T, Peng B, Yu L, Jiang de K: Association between microRNA polymorphisms and cancer risk based on the findings of 66 case-control studies. *PLoS One* 2013;8:e79584.
- 92 Tian T, Xu Y, Dai J, Wu J, Shen H, Hu Z: Functional polymorphisms in two pre-microRNAs and cancer risk: a meta-analysis. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2010;1:358–366.
- 93 Xu W, Xu J, Liu S, Chen B, Wang X, Li Y, Qian Y, Zhao W, Wu J: Effects of common polymorphisms rs11614913 in miR-196a2 and rs2910164 in miR-146a on cancer susceptibility: a meta-analysis. *PLoS One* 2011;6:e20471.
- 94 Wang J, Bi J, Liu X, Li K, Di J, Wang B: Has-miR-146a polymorphism (rs2910164) and cancer risk: a meta-analysis of 19 case-control studies. *Mol Biol Rep* 2012;39:4571–4579.
- 95 Qiu LX, He J, Wang MY, Zhang RX, Shi TY, Zhu ML, Mao C, Sun S, Lv FF, Zheng CL, Zhu XD: The association between common genetic variant of microRNA-146a and cancer susceptibility. *Cytokine* 2011;56:695–698.
- 96 Wang J, Wang Q, Liu H, Shao N, Tan B, Zhang G, Wang K, Jia Y, Ma W, Wang N, Cheng Y: The association of miR-146a rs2910164 and miR-196a2 rs11614913 polymorphisms with cancer risk: a meta-analysis of 32 studies. *Mutagenesis* 2012;27:779–788.
- 97 Wang AX, Xu B, Tong N, Chen SQ, Yang Y, Zhang XW, Jiang H, Liu N, Liu J, Hu XN, Sha GZ, Chen M: Meta-analysis confirms that a common G/C variant in the pre-miR-146a gene contributes to cancer susceptibility and that ethnicity, gender and smoking status are risk factors. *Genet Mol Res* 2012;11:3051–3062.
- 98 Srivastava K, Srivastava A: Comprehensive review of genetic association studies and meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk. *PLoS One* 2012;7:e50966.
- 99 Yin Z, Yan L, Cui Z, Li X, Ren Y, Zhou B: Effects of common polymorphisms rs2910164 in miR-146a and rs3746444 in miR-499 on cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2013;40:3003–3013.
- 100 Manna I, Labate A, Mumoli L, Pantusa M, Ferlazzo E, Aguglia U, Quattrone A, Gambardella A: Relationship between genetic variant in pre-microRNA-146a and genetic predisposition to temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Gene* 2013;516:181–183.
- 101 Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, Villa C, Comi C, Monaco F, Mellesi L, Valzelli S, Bresolin N, Galimberti D, Scarpini E: Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2011;504:9–12.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Зорана Николић _____

Број индекса _____ М3003/2012 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Студија асоцијације варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и прогресију карцинома простате код болесника из Србије“

-
- резултат сопственог истраживачког рада;
 - да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
 - да су резултати коректно наведени и
 - да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____ 25.10.2016 _____

_____ *Зоран Николић* _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Зорана Николић _____

Број индекса _____ М3003/2012 _____

Студијски програм _____ Молекуларна биологија _____

Наслов рада _____ „Студија асоцијације варијанти у генима за микроРНК и за
протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и прогресију карцинома
простате код болесника из Србије“ _____

Ментор _____ Проф. др Горан Брајушковић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____ 25.10.2016. _____

Зорана Николић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Студија асоцијације варијанти у генима за микроРНК и за протеине утишавајућег комплекса са ризиком за развој и прогресију карцинома простате код болесника из Србије“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____ 25.10.2016.

Зоран Никодић

1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.