

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Katarina V. Kopčalić

**PREDIKTIVNI ZNAČAJ KLINIČKIH
KARAKTERISTIKA I MOLEKULARNIH
BIOMARKERA ZA NASTANAK TOKSIČNOSTI
TOKOM I NAKON ZRAČNE TERAPIJE
BOLESNIKA SA KARCINOMOM PROSTATE**

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Katarina V. Kopčalić

**PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF CLINICAL
CHARACTERISTICS AND MOLECULAR
BIOMARKERS FOR THE OCCURRENCE OF
TOXICITY DURING AND AFTER RADIO
THERAPY IN PROSTATE CANCER PATIENTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

MENTORI:

- 1. Prof. dr Marina Nikitović**, redovni profesor, šef katedre predmeta Klinička onkologija sa radioterapijom, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 2. VNS dr sc. Ivana Matić**, viši naučni saradnik, molekularni biolog, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

ČLANOVI KOMISIJE:

- 1. Akademik prof. dr Tatjana Simić**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
- 2. N. Sav. dr sc. Tatjana Stanojković**, naučni savetnik, molekularni biolog, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije
- 3. Prof. dr Ljiljana Mijatović**, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA:

Najpre se zahvaljujem svojim mentorima:

Prof. dr Marini Nikitović, na svim smernicama koje mi je davala tokom mog evolutivnog puta, još od Specijalističkih akademskih studija, kako u kliničkom tako i u naučno-istraživačkom radu. Veliko hvala što je bila vizionar i prepoznala potencijal da naša saradnja može rezultovati uspehom koji nas je doveo do ovog svečanog momenta. I posebno hvala što je profesorka uvek potencirala na iskrenim i prijateljskim odnosima unutar našeg tima, zahvaljujući kojima su već postignuti značajni timski uspesi, a takođe je prisutan entuzijazam za dalja istraživanja i ispunjenje novih ciljeva.

VNS dr sc. Ivani Matić, koju ja zovem “silent authority”, jer i pored svoje pristupačnosti za konsultacije i sugestije u svakom momentu, uvek teži perfekcionizmu i ne zadovoljava se prosekom, zbog čega je meni kao njenom kandidatu pravi primer. Hvala na učestvovanju u kreiranju teme disertacije i zajedničkom istraživanju tokom skoro decenije timskog rada koje nas je dovelo do ovog cilja, ali uz puno novih ideja za postavljanje i ostvarivanje istih.

Takođe se zahvaljujem:

Članovima komisije **Akademiku prof. dr Tatjani Simić, prof. dr Ljiljani Mijatović i N. Sav. dr sc. Tatjani Stanojković** na pozitivnoj oceni doktorske disertacije.

N. Sav. dr sc. Tatjani Stanojković, koja je od starta bila uključena u razvijanje ove disertacije i koja je zahvaljujući svom velikom naučnom iskustvu, zajedno sa profesorkom Nikitović, nepresušan izvor ideja čijim realizacijama ostvarujemo timske uspehe.

NS dr sc. med Vesni Stanković, mom prvom šefu na radioterapiji, učitelju i, možda ne mentoru na papiru, ali u praksi svakako, kako u kliničkom, tako i u naučnom smislu.

VNS dr sc. Nini Petrović, čije je drugo ime “mikro RNK” jer zbog istraživanja mehanizama njihovog dejstva u organizmu, često “hoda po tankoj zici” u cilju nauke i razjašnjavanju njihove uloge u patogenezi karcinoma i razvoja radijacione toksičnosti.

Prof. dr Zoranu Bukumiriću, na velikoj pomoći prilikom obrade statističkih podataka ove disertacije.

Medicinskim fizičarima, pre svega Borku i Vladi, ali i ostalima, na ogromnoj pomoći kako u planiranju zračne terapije, tako i u obezbeđivanju svih neophodnih dozimetrijskih parametara koji su bili potrebni za analizu.

Svim medicinskim sestrama sa odeljenja urologije na pomoći u tehničkom prikupljanju uzoraka krvi, radiološkim tehničarima kao i laboratorijskim tehničarima sa eksperimentalne onkologije koji su učestvovali na tehničkoj obradi uzoraka.

Svim pacijentima koji su učestvovali u ovom istraživanju, spremni da daju svoj doprinos nauci u borbi da u budućnosti budemo još uspešniji u lečenju karcinoma prostate i održavanju boljeg kvaliteta života lečenih pacijenata.

Svim mojim prijateljima i kolegama, pre svega Aleksandru, Bojani i kumi Ivani o čijoj podršci bi mogla posebna disertacija da se napiše, ali i mnogim drugim kolegama koji su me podržavali u stručnom i naučnom radu svih ovih godina rada na Institutu.

Mojoj porodici, pre svega bakama i dekama na velikoj logističkoj podršci bez koje se “slobodno” vreme za bavljenje naukom ne bi moglo naći.

Svom suprugu na pomoći oko svih IT poteškoća tokom pisanja disertacije. I na kraju, ali nikako manje važno, mojim devojčicama Anji i Mili koje su na svoj način pružale mami podršku i razumevanje za sve vreme koje nije bilo posvećeno direktno njima, ali će doći trenutak kada će shvatiti da je sve rađeno zbog njih.

Zahvalnost dugujem i svim koautorima radova objavljenih kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, jer su učestvovali u:

- 1.** Kreiranju ideje i koncepta teze: prof. dr Marina Nikitović, VNS dr sc. Ivana Matić
- 2.** Prikupljanju podataka: NS dr sc. med Vesna Stanković, dr sci. med Aleksandar Stepanović
- 3.** Formalnoj i statističkoj analizi: Prof. dr Zoran Bukumirić, N. Sav. dr sc. Tatjana Stanojković, VNS dr sc. Ivana Matić, VNS dr sc. Nina Petrović
- 4.** Istraživanju: Prof. dr Marina Nikitović, NS dr sc. med Vesna Stanković, VNS dr sc. Ivana Matić, VNS dr sc. Nina Petrović, N. Sav. dr sc. Tatjana Stanojković, dr sc. Irina Besu, dr sc. Marija Đorđić Crnogorac, dr sc. Emina Mališić, dr sc. Katarina Mirjačić – Martinović, dr sc. Ana Vuletić, dr sc. Željko Žižak, Marlon Veldwijk, Phd, Carrsten Herskind, Phd, dr sc. Jelena Roganović
- 5.** Metodologiji: Prof. dr Marina Nikitović, VNS dr sc. Ivana Matić, VNS dr sc. Nina Petrović, N. Sav. dr sc. Tatjana Stanojković, NS dr sc. med Vesna Stanković
- 6.** Superviziji: Prof. dr Marina Nikitović, VNS dr sc. Ivana Matić, NS dr sc. med Vesna Stanković
- 7.** Pisanju - originalni nacrt: Prof. dr Marina Nikitović, VNS dr sc. Ivana Matić, VNS dr sc. Nina Petrović
- 8.** Pisanju – recenzija i uređivanje: Prof. dr Marina Nikitović, VNS dr sc. Ivana Matić, NS dr sc. med Vesna Stanković, N. Sav. dr sc. Tatjana Stanojković, VNS dr sc. Nina Petrović.

PREDIKTIVNI ZNAČAJ KLINIČKIH KARAKTERISTIKA I MOLEKULARNIH BIOMARKERA ZA NASTANAK TOKSIČNOSTI TOKOM I NAKON ZRAČNE TERAPIJE BOLESNIKA SA KARCINOMOM PROSTATE

Sažetak

Uvod: U multidisciplinarnom lečenju karcinoma prostate, radioterapija igra važnu ulogu. Međutim, neki pacijenti sa ovom dijagnozom koji se leče radioterapijom, mogu razviti ozbiljne neželjene efekte koji narušavaju njihov kvalitet života. Radijaciona toksičnost može se manifestovati u donjem gastrointestinalnom (GI) traktu i genitourinarnom (GU) traktu.

Cilj: Cilj istraživanja bio je da se ispita značaj individualnih, kliničkih, dozimetrijskih parametara i molekularnih biomarkera za nastanak toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom.

Materijal i metode: Istraživanje je bilo dizajnirano po tipu prospektivne, kohortne studije u koju je uključeno 90 pacijenata sa patohistološki potvrđenim adenokarcinomom prostate, lečenih u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije od januara 2016. do februara 2020.godine, bilo u radikalnom pristupu ili u nekom momentu nakon prostatektomije. Ispitivane su individualne, kliničke i terapijske karakteristike, zatim nivoi citokina IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ i TGF- β 1 u serumu, nivoi mikro RNK (miR-21, miR-146a i miR-155) u limfocitima pacijenata, kao i uticaj ovih parametara na razvoj akutne i kasne genitourinarne (GU) i gastrointestinalne (GI) radijacione toksičnosti. Akutna i kasna radijaciona toksičnost ispitivana je primenom RTOG/EORTC kriterijuma modifikovanih po Peeters-u, a nivoi citokina u serumu određivani su pomoću ELISA testa.

Rezultati: U ispitivanoj grupi zračenih pacijenata, pokazana je značajna asocijacija između višeg gradusa akutne GU toksičnosti tokom radioterapije i prisustva Diabetes mellitusa ($p < 0,007$). U grupi radikalno zračenih pacijenata, veći stepen kasne GU toksičnosti imali su ispitanici sa prethodnim operacijama ($p = 0,019$). Pokazano je da bi praćenje izmena u nivoima cirkulišućih citokina tokom radioterapije, više nego njihovih apsolutnih nivoa, moglo biti značajno za predviđanje radijacione toksičnosti. Povećanje koncentracije IL-6 tokom vremena u serumu pacijenata sa karcinomom prostate lečenih radioterapijom, statistički značajno je povezano sa višim stepenom akutne GU toksičnosti tokom terapije ($p = 0,039$). Nivoi IL-6 i IFN- γ značajno su bili viši u grupi pacijenata tretiranih radikalno nego u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna zračna terapija ($p = 0,001$; $p = 0,020$, redom). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da cirkulišući nivoi IL-6 i TGF- β 1 mogu imati uticaja na nastanak akutne GU toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom. Pokazane su izmene nivoa miR-21, miR-146a i miR-155 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi tokom radioterapije.

Zaključak: Integracija individualnih, kliničkih i dozimetrijskih parametara i bioloških faktora poput izmena nivoa citokina u serumu tokom radioterapije i ekspresije miRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, može biti od značaja za razvoj modela za predikciju radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate.

Ključne reči: karcinom prostate, radioterapija, citokini, mikro RNK, toksičnost

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Biologija tumora i oksidativna oboljenja

UDK broj: _____

PREDICTIVE SIGNIFICANCE OF CLINICAL CHARACTERISTICS AND MOLECULAR BIOMARKERS FOR THE OCCURRENCE OF TOXICITY DURING AND AFTER RADIO THERAPY IN PROSTATE CANCER PATIENTS

Abstract

Introduction: In the multidisciplinary treatment of prostate cancer, radiotherapy plays a significant role. However, some patients with this diagnosis who undergo radiotherapy may experience serious side effects that negatively impact their quality of life. Radiation toxicity can manifest in the lower gastrointestinal (GI) and genitourinary (GU) tract.

Aims: This study aimed to investigate the importance of individual, clinical, dosimetric parameters and molecular biomarkers for the occurrence of radiotoxicity in prostate cancer patients.

Methods: The research was designed according to the type of prospective cohort study in which 90 patients with pathohistologically confirmed adenocarcinoma of the prostate were included and treated at the Institute of Oncology and Radiology of Serbia from January 2016 to February 2020, either in a radical approach or at some point after prostatectomy. Individual, clinical, and therapeutic characteristics were examined, as well as levels of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , and TGF- β 1 in serum and microRNA levels (miR-21, miR-146a, and miR-155) in the patients' peripheral blood mononuclear cells, and also the influence of these parameters on the development of acute and late genitourinary (GU) and gastrointestinal (GI) radiation toxicity. Acute and late radiation toxicity was investigated using RTOG/EORTC criteria modified by Peeters. Serum cytokine levels were determined by ELISA test.

Results: In the examined group of irradiated patients, a significant association was shown between a higher degree of acute GU toxicity during radiotherapy and the presence of diabetes mellitus ($p < 0.007$). In the group of radically irradiated patients, subjects with previous operations had a higher degree of late GU toxicity ($p = 0.019$). It has been shown that monitoring changes in the levels of circulating cytokines during radiotherapy, rather than their absolute levels, could be significant for predicting radiation toxicity. The increase in IL-6 concentration over time in the serum of patients with prostate cancer treated with radiotherapy was statistically significantly associated with a higher degree of acute GU toxicity during therapy ($p = 0.039$). The levels of IL-6 and IFN- γ were significantly higher in the group of patients treated with definitive radiotherapy than in the group of patients who underwent postoperative radiotherapy ($p = 0.001$; $p = 0.020$, respectively). The results of our study showed that circulating levels of IL-6 and TGF- β 1 may have an impact on the development of acute GU toxicity in prostate cancer patients treated with radiotherapy. Changes in the levels of miR-21, miR-146a, and miR-155 in peripheral blood mononuclear cells during radiotherapy have been shown.

Conclusions: Integration of individual, clinical, and dosimetric parameters and biological factors, such as changes in serum cytokine levels during radiotherapy and miRNA expression in peripheral blood mononuclear cells, may be important for the development of models for predicting radiation toxicity in prostate cancer patients.

Key words: prostate cancer, radiotherapy, cytokines, micro RNA, radiotoxicity

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Tumor biology and oxidative diseases

UDK number: _____

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Topografija i funkcija prostate	1
1.2. Etiologija i epidemiologija karcinoma prostate	2
1.3. Klinička slika karcinoma prostate	4
1.4. Klasifikacija i stadiranje karcinoma prostate.....	5
1.5. Dijagnostička evaluacija karcinoma prostate	5
1.5.1. Skrining i rana detekcija	5
1.5.2. Klinička dijagnoza karcinoma prostate	6
1.5.3. Digitorektalni pregled prostate.....	8
1.5.4. Biopsija prostate	8
1.6. Lečenje karcinoma prostate.....	10
1.6.1. Aktivno praćenje	12
1.6.2. Pažljivo čekanje	12
1.6.3. Hirurško lečenje karcinoma prostate	13
1.6.4. Radioterapija.....	13
1.6.5. Hormonska terapija	23
1.6.6. Imunoterapija	25
1.6.7. Hemioterapija i Lutetium-177 PSMA terapija	25
1.6.8. Toksični efekti radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate	26
1.7. Potencijalni prediktori radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate.....	28
1.7.1. Individualne i kliničke karakteristike kao prediktori radijacione toksičnosti.....	28
1.7.2. Biološki faktori kao prediktori toksičnosti	28
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	33
3. MATERIJAL I METODE	34
3.1. Selekcija pacijenata.....	34
3.2. Ispitivane varijable i instrumenti merenja	34
3.3. Istraživanje na prvoj grupi ispitanika	36
3.3.1. Selekcija pacijenata	36
3.3.2. Ispitivanje akutne radijacione toksičnosti i kvaliteta života	36
3.3.3. Planiranje i sprovođenje zračne terapije.....	36
3.3.4. Određivanje koncentracije citokina u serumu	37
3.4. Istraživanje na drugoj grupi ispitanika	38
3.4.1. Određivanje koncentracije IL-6 i TGF-β1 u serumu	38
3.5. Određivanje ekspresije mikroRNK	39
3.6. Statistička analiza podataka	40
4. REZULTATI	41
4.1. Karakteristike ispitivane grupe pacijenata sa karcinomom prostate	41

4.2. Ispitivanje prediktivne vrednosti individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika za nastanak toksičnosti za celu grupu ispitanika	50
4.2.1. Ispitivanje akutne toksičnosti.....	50
4.2.2. Ispitivanje kasne toksičnosti	55
4.3. Rezultati istraživanja na prvoj grupi ispitanika.....	59
4.4. Rezultati istraživanja na drugoj grupi ispitanika	62
4.5. Ispitivanje veze između promene nivoa miR-21/146a/155 i razvoja genitourinarne toksičnosti	70
4.5.1. Individualne i kliničke karakteristike i akutna GU toksičnost	72
4.5.2. Nivoi ekspresije miR-21, miR-146a i miR-155 pre, nakon radioterapije i na prvoj kontroli	73
4.5.3. Korelacija između nivoa miR-21, miR- 146a i miR-155.....	75
5. DISKUSIJA	77
6. ZAKLJUČCI	90
7. LITERATURA.....	92

1. UVOD

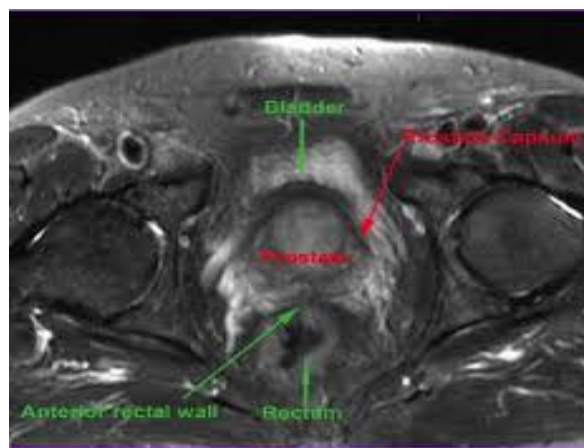
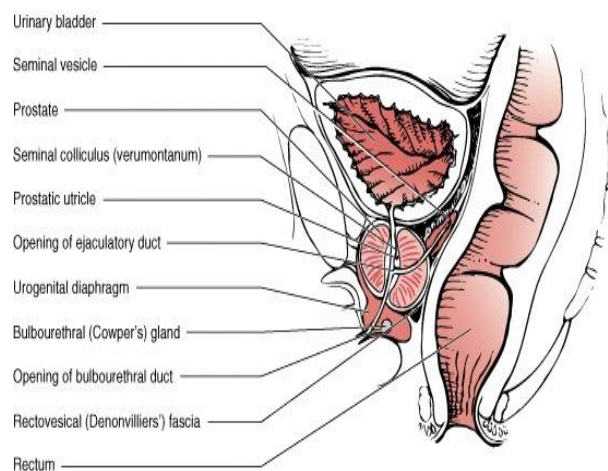
1.1. Topografija i funkcija prostate

Prostata je mišićno žlezdani organ koji predstavlja deo muškog reproduktivnog sistema. Njena osnovna funkcija je da proizvodi materije koje ulaze u sastav semene tečnosti koja potpomaže kretanje spermatozoida i štiti ih od kiselog okruženja ženskog reproduktivnog sistema.

Smeštena je u karlici, kestenastog je oblika i na njoj se razlikuju: **prednja strana** koja se nalazi na 2 cm od pubične simfize, a u prostoru između njih smešten je bogat venski plexus (Santorini's plexus), **zadnja strana** koja je u odnosu sa rektumom od koga je odvojena kapsulom prostate i Denonvilijerovom fascijom, a u bliskom je kontaktu i sa semenim vezikulama i ampulom duktus deferensa, **vrh prostate** koji dopire do urogenitalne dijafragme i **baza prostate** na kojoj leži dno mokraćne beške (**slika 1**) (1) Podeljena je na 5 režnjeva: prednji, dva bočna, zadnji i srednji režanj. Kroz nju prolazi mokraćna cev (uretra), zbog čega svaka znatnija promena u prostati (zapaljenje, benigna hiperplazija ili karcinom prostate) može dovesti do smetnji sa mokrenjem.

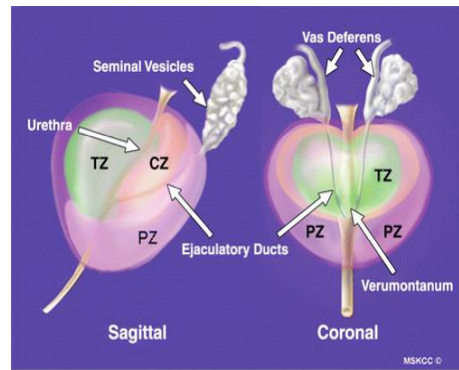
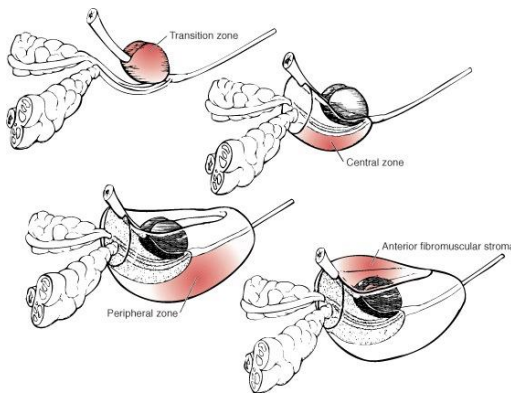
Prosečne dimenzije prostate su 3,5 x 4,5 x 2,5 cm. Njena uobičajena težina iznosi 16 do 22g.

Histološki, sastoji se od razgranatih žlezda, sa kanalima koji su obloženi sekretornim epitelnim ćelijama i bazalnim ćelijama. Sekretorne epitelne ćelije predstavljaju glavni tip ćelija, njihov rast je androgen zavistan i imaju ulogu u proizvodnji prostate specifičnog antigena (eng. prostate specific antigen - PSA) i prostatične kisele fosfataze (eng. prostate acid phosphatase - PAP) (2).



Slika 1. Topografija prostate

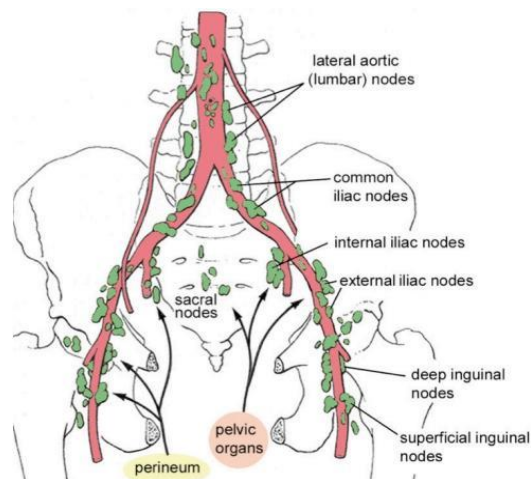
Mc Neal i saradnici definisali su koncept anatomije zona prostate na osnovu kojeg se razlikuju četiri zone: 1. periferna zona koja čini preko 70% ukupnog volumena prostate, okružuje apikalni, lateralni i posterioriorni deo prostate i u kojoj se karcinom prostate najčešće razvija (70-85% zavisno od literature) 2. Centralna zona koja čini 25% volumena prostate, lokalizovana je između tranzicione i periferne zone i kroz koju prolazi duktus ejakulatorius (karcinom se javlja u oko 5% slučajeva) 3. tranziciona zona koja čini 5-10% volumena prostate, okružuje uretru između kolikulusa i vrata mokraćne beške i predstavlja najčešće mesto javljanja benigne hipertrofije prostate (eng. benign prostatic hypertrophy - BPH), a karcinom se javlja u oko 15-20% 4. Prednja fibromuskularna stroma koju čine fibroblasti, glatki mišići, nervi i limfni kanali (**slika 2**) (3).



Slika 2. Anatomija zona prostate

Vaskularizacija prostate potiče iz inferioranih vesikalnih krvnih sudova, koji nastaju iz unutrašnje ilijačne arterije. Kapsularne grane donje vesikalne arterije su od pomoći pri identifikaciji karličnog plexusa koji potiče iz S2- S4 i Th10 - Th12 nervnih korenova. Neurovaskularni snop leži sa obe strane prostate, posterolateralno, izveden je iz karličnog plexusa i važan je za erektilnu funkciju.

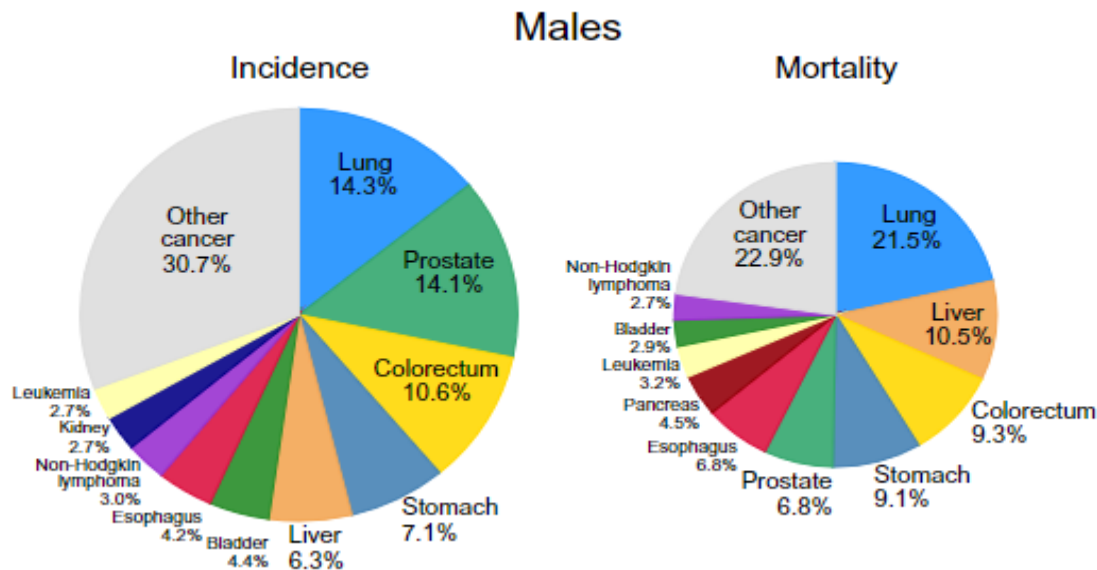
Limfa se iz prostate drenira u obturatorne, presakralne, interne, eksterne i zajedničke ilijačne limfne čvorove, tako da oni predstavljaju puteve širenja bolesti kod karcinoma prostate (**slika 3**).



Slika 3. Limfna drenaža prostate

1.2. Etiologija i epidemiologija karcinoma prostate

Karcinom prostate (eng. Prostate cancer-PCa) je drugi po učestalosti javljanja i peti uzročnik smrti u muškoj populaciji širom sveta prema Globalnoj kancer statistici iz 2020 (Global Cancer Statistics 2020 report) (**slika 4**) (4). Podaci Instituta za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanovic - Batut” ukazuju da je u Srbiji karcinom prostate treći po učestalosti javljanja svih karcinoma u 2018.godini (10,5%) i treći uzročnik smrti u muškoj populaciji (8,6%) (5).



Slika 4. Incidencija i mortalitet karcinoma prostate prema Globalnoj kancer statistici iz 2020.

Izvor : Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.(4)

Učestalost karcinoma prostate je u neprekidnom porastu, kako zbog povećanog broja starijeg stanovništva, tako i kao rezultat otkrivanja i rutinskog korišćenja Prostata specifičnog antigena - PSA, koji je najvažniji tumor marker za rano dijagnostikovanje i praćenje karcinoma prostate

Učestalost karcinoma prostate raste sa starošću i prosečna starost pacijenata pri postavljanju dijagnoze je između 60-te i 70-te godine (oko 2/3 iznad 65. godine) (6). Očekuje se da će se u 1 od 6 muškaraca karcinom prostate dijagnostikovati tokom života (7), i to kod 1 od 350 muškaraca starosti ispod 50 godina, 1 u 52 sa starosnom dobi između 50 i 59 godina i u oko 60% kod muškaraca preko 65 godina starosti (8).

Osim godina starosti, drugi jasno ustanovljen faktor rizika za nastanak PCa je nasledni faktor. Ako jedan član u prvoj liniji srodstva ima PCa, rizik za pojavu je najmanje dvostruk, a ako je dva ili više srodnika obolelo od ove bolesti, rizik za pojavu je najmanje četvorostuk, pa i veći ukoliko se karcinom prostate javi pre 65. godine.

Treći značajan faktor rizika za nastanak PCa je etničko poreklo, sa najvećom stopom incidencije u crnoj populaciji, naročito među Afroamerikancima. Najmanja stopa incidencije utvrđena je među Azijatima, ne samo zbog genetske osnove, već i zbog stila života i ishrane (9).

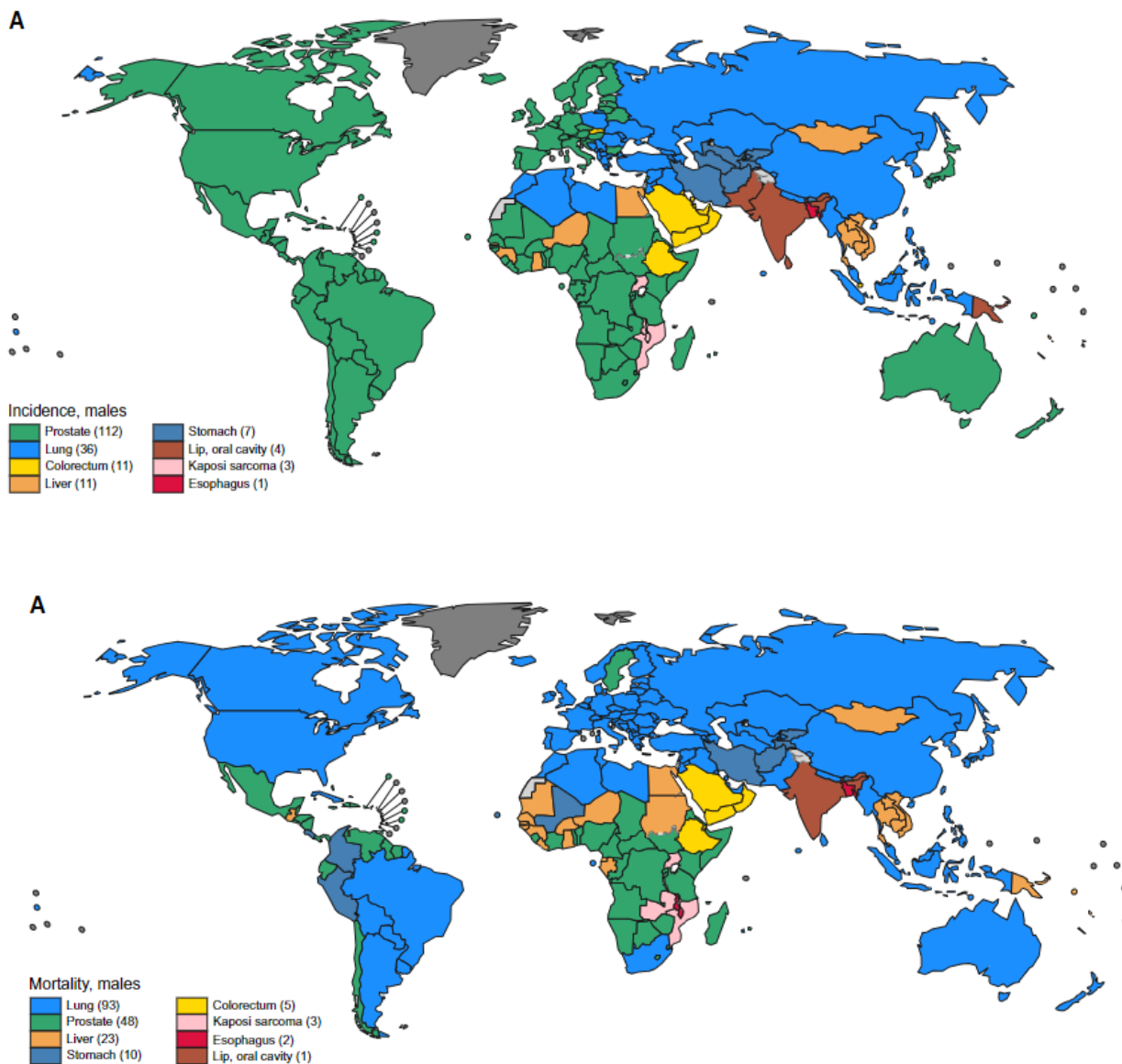
Ostali potencijalni faktori rizika uključuju stil života kao što je ishrana (životinjska mast, meso, mleko, mlečni proizvodi), Insulinu sličan faktor rasta (eng. Insulin-like growth factor -IGF-I), unos suplemenata (Kalcijum), polno prenosive infekcije, profesionalna izloženost hemikalijama, pušenje, gojaznost, konzumacija alkohola, nedovoljna fizička aktivnost, muškarci sa istorijom vazektomije, kao i socioekonomski faktori (7,8).

Smatra se da u prevenciji karcinoma prostate ulogu mogu imati upotreba soje, likopena, zelenog čaja, pojedinih suplemenata poput selena i vitamina E kao i redovna fizička aktivnost (7,8).

Ipak, za sigurnu potvrdu značaja faktora rizika ili prevencije u nastanku karcinoma prostate, potrebna su dalja ispitivanja.

Mortalitet karcinoma prostate takođe varira u različitim delovima sveta sa najvećom učestalošću 2018. god u Centralnoj Americi (10,7 na 100 000), potom u Australiji i Novom Zelandu (10,2), a onda u Zapadnoj Evropi (10,1). Najniža stopa zabeležena je u Aziji i Severnoj Africi (10).

Global Cancer Statistic 2020 procenjuje da od 36 ispitivanih karcinoma u 185 zemalja, karcinom prostate je najučestaliji po incidenciji u čak 112 zemalja, dok je po mortalitetu na drugom mestu nakon karcinoma pluća sa najvećim mortalitetom u 48 zemalja (slika 5) (4).



Slika 5. Prikaz ispitivanih karcinoma po incidenciji i mortalitetu u različitim delovima sveta.

(Obojena područja predstavljaju regije gde je tip karcinoma označen određenom bojom najučestaliji)

Izvor: Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.* *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.(4)

1.3. Klinička slika karcinoma prostate

Rani karcinom prostate je ograničen na prostatu i obično je duži vremenski period asimptomatsko oboljenje i najčešće se otkiva uzgredno ili u toku skrining pregleda, pri kojem se detektuju povišene vrednosti PSA.

Simptomi se obično javljaju kod lokalno uznapredovale bolesti kada tumor infiltrira i probije kapsulu prostate i tada se mogu javiti smetnje sa mokrenjem, otežano započinjanje mokrenja, učestalo mokrenje, kao i nokturija (**11**). Daljim napredovanjem, bolest se širi prema zadnjem zidu mokraćne bešike i semenim kesicama ili prema prednjem zidu rektuma, što se pored dizuričnih smetnji može manifestovati i pojavom krvi u mokraći i spermi, erektilnom disfunkcijom, osećajem pritiska u perinealnoj regiji i otežanim pražnjenjem debelog creva. Širenjem bolesti (metastaziranje) u regionalne limfne čvorove i udaljene organe (najčešće u kosti, jetru i pluća), dolazi do pojave simptoma čija manifestacija zavisi od mesta pojave metastaza.

1.4. Klasifikacija i stadiranje karcinoma prostate

Za stadiranje karcinoma prostate koristi se TNM klasifikacija (Tumor Nodus Metastaza). Osmo izdanje ove klasifikacije objavljeno je 2016.god i dato u **tabeli 1 (12)**.

Tabela 1: TNM klasifikacija karcinoma prostate (12)

Primarni tumor (T)	
Tx	Primarni tumor ne može biti procenjen
T0	Nema dokaza o postojanju primarnog tumora
T1	Klinički nevidljiv tumor, nijepalpabilan, ne vidi se na imidžingu
T1a	Incidentalni tumor potvrđen u $\leq 5\%$ resekovanog tkiva
T1b	Incidentalni tumor potvrđen u $> 5\%$ resekovanog tkiva
T1c	Tumor dokazan iglenom biopsijom iz jednog ili oba lobusa, ali nepalpabilan
T2	Palpabilan tumor ograničen na prostate
T2a	Tumor zahvata \leq polovine jednog lobusa
T2b	Tumor zahvata $>$ polovine jednog lobusa, ali ne oba lobusa
T2c	Tumor zahvata oba lobusa
T3	Tumor se širi izvan prostate, ali bez zahvatanja okolnih struktura
T3a	Unilateralo ili bilateralno ekstraprostatično širenje
T3b	Tumor zahvata jednu ili obe semene vezikule
T4	Tumor zahvata spoljašnji sfinkter, rectum, mokraćnu bešiku, mišiće levatore i/ili karlični zid
Regionalni limfni nodusi (N)	
Nx	Regionalni limfni nodusi ne mogu biti procenjeni
N0	Bez zahvatanja regionalnih limfnih čvorova
N1	Zahvatanje regionalnih limfnih zvorova
Udaljene metastaze (M)	
Mx	Udaljene metastaze ne mogu biti procenjene
M0	Bez udaljenih metastaza
M1a	Zahvatanje neregionalnih limfnih čvorova
M1b	Zahvatanje kostiju
M1c	Zahvatanje ostalih lokalizacija sa ili bez zahvatanja kostiju

1.5. Dijagnostička evaluacija karcinoma prostate

1.5.1. Skrining i rana detekcija

Široka primena skrininga sa merenjem vrednosti PSA u cilju ranog otkrivanja karcinoma prostate, dovela je do značajne redukcije dijagnostikovanja ove bolesti u metastatskoj fazi i značajne

redukcije smrtnosti od ove bolesti. Međutim, PSA skining ostaje kontraverzno pitanje zbog svoje niske specifičnosti za karcinom prostate, što može dovesti do nepotrebnih biopsija i lečenja pacijenata sa indolentnim tumorom koji se ne bi klinički manifestovao tokom života.

1.5.2. Klinička dijagnoza karcinoma prostate

Dijagnoza karcinoma prostate postavlja se na osnovu povišene vrednosti tumor markera za karcinom prostate - PSA, digitorektalnim pregledom (eng. Digital rectal examination - DRE), pomoću imidžing metoda (kompjuterizovana tomografija (eng. Computer tomography – CT) ili magnetna rezonanca (eng. Magnetic resonance - MR), a definitivna dijagnoza postavlja se patohistološkom (eng. Pathohistological – PH) verifikacijom nakon biopsije prostate ili nakon prostatektomije učinjene zbog benigne hiperplazije prostate.

Prostata specifični antigen (PSA), otkriven 1979.god, je protein koji proizvode prostaticke epitelijalne ćelije. On sadrži jedan glikoproteinski lanac od 237 aminokiselina i sa četiri strane karbohidratne lance, uključujući sulfidne veze. Njegova uloga je u likvefakciji semene tečnosti. Predstavlja najvažniji tumor marker za karcinom prostate i ima veoma bitnu ulogu, kako za rano otkrivanje bolesti, tako i za praćenje bolesnika obolelih od karcinoma prostate, jer pokazuje kako reaguju na različite vidove terapije. Poluživot PSA je oko 2,2 - 3,2 dana i dostiže najniži nivo 2-3 nedelje posle radikalne prostatektomije. Njegova prihvaćena vrednost u serumu iznosi do 4 ng/ml. Međutim 20% slučajeva karcinoma prostate ima nivo PSA ispod 4 ng/ml, a samo u oko 25% slučajeva sa serumskim PSA od 4-10 ng/ml nađen je karcinom u biopsatu (13).

Prostata specifični antigen je organ specifičan, ali ne i kancer specifičan i njegovo povišenje ne znači da osoba boluje od karcinoma prostate. Bilo kakva iritacija ovog organa može dovesti do povišenja njegove vrednosti. Tako PSA može biti povišen posle digitorektalnog pregleda, nakon biopsije prostate, posle uroloških endoskopskih pregleda i manipulacija (cistoskopija), u okviru prostatitisa i benigne hiperplazije prostate (14).

Zato su uvedeni novi pojmovi u cilju rane dijagnoze karcinoma prostate i njegovog diferenciranja od benignih stanja, ali je i njihova upotrebna vrednost ograničena. Tu spadaju: starosno i rasno specifična referentna vrednost PSA (Age and race-specific PSA) (tabela 2), gustina PSA (PSA density-PSAD), brzina promene vrednosti PSA (PSA velocity-PSAV) i slobodan i vezan PSA (Free and complex PSA) (15, 13).

Tabela 2. Starosno i rasno specifična referentna vrednost PSA (15, 13)

Starosni interval (godine)	Azijati	Afro Amerikanci	Belci
40-49	0-2	0-2	0-2,5
50-59	0-3	0-4	0-3,5
60-69	0-4	0-4,5	0-4,5
70-79	0-5	0-5,5	0-6,5

Gustina PSA (PSA density-PSAD)

Određivanje gustine PSA je od velike važnosti naročito kod osoba koje imaju vrednost PSA između 4-10 ng/ml u cilju diferenciranja karcinoma prostate od benignih stanja, prvenstveno BPH. Izračunava se tako što se vrednost ukupnog PSA podeli sa zapreminom prostate. Vrednost od 0,15 i

više upućuje na karcinom prostate, dok vrednosti ispod ove upućuju na benignu bolest. Glavni problem u određivanju PSAD može postojati zbog grešaka u određivanju zapremine prostate i promenama vrednosti PSA sa godinama.

Brzina promene vrednosti PSA (PSA velocity-PSAV)

To je promena vrednosti PSA u određenom vremenu. Ovaj koncept je uveden sa ciljem ranog dijagnostikovanja nepalpabilnog kancera ograničenog na prostatu.

Njegovo izračunavanje vrši se pomoću sledeće formule za koju su potrebne najmanje tri vrednosti PSA merene u intervalu od šest meseci ili dužem.

$$PSAV = \frac{1}{2} \times [(PSA2-PSA1)/Time + (PSA3-PSA2)/Time]$$

Ukoliko je povišenje PSA veće od 0,75mg/ml za godinu dana, to može uputiti da se radi o karcinomu prostate.

Slobodan i vezan PSA (Free and complex PSA)

Samo mali deo PSA se nalazi u svom slobodnom obliku označen kao free PSA (f-PSA), a veći deo je vezan za alpha 2 makroglobulin (AMG) i alpha 1-antichymotrypsin (ACT).

Određivanjem slobodnog PSA u odnosu na ukupni PSA (eng. Free/total-F/T) dobijamo vrednosti koje nam mogu pomoći u boljoj diferencijalnoj dijagnozi karcinoma prostate prema drugim oboljenjima prostate. Ako je odnos slobodnog prema ukupnom PSA preko 0,20 – smatra se da je mala mogućnost da osoba boluje od raka prostate (oko 10%), a ukoliko je pak taj odnos ispod 0,10 – mogućnost je velika (oko 90%). F/T PSA procenjuje rizik od PCa kod muškaraca sa ukupnim PSA od 4-10ng/ml i negativnim DRP, ali on nema kliničku vrednost ako je ukupni serumski PSA > 10 ng/ml ili u toku follow up-a već dijagnostikovanog PCa.

PCA3 marker

Prostata cancer antigen 3 (PCA3) je mRNK biomarker specifičan za prostatu koji se može detektovati u sedimentu urina pacijenata sa karcinomom prostate. Test je minimalno invazivan i ima značaja pre svega da se utvrdi da li je potrebno ponoviti biopsiju nakon prethodno jedne ili više negativnih biopsija. Kombinacija različitih tumor markera biće trend u budućnosti u cilju procene agresivnosti kancera i istovremeno smanjenja broja nepotrebnih biopsija (16).

Prostate Health Index (PHI) test

PHI je matematička formula koja kombinuje ukupan PSA, Slobodan PSA i [-2] pro PSA ('p2PSA').

Test se radi iz uzorka krvi, a PHI se izračunava po formuli $([-2]proPSA/free PSA) \times \sqrt{PSA}$.

Mnoge internacionalne studije su pokazale da PHI prevazilazi značaj svojih individualnih komponenti za predikciju ukupnog i klinički značajnog karcinoma prostate na biopsiji (17, 18). Primena ovog testa je najznačajnija kod pacijenata sa PSA između 2 i 10 ng/ml. PHI takođe predviđa verovatnoću progresije bolesti kod pacijenata koji su na režimu aktivnog praćenja. Njegov cilj je, da kao neinvazivna metoda, smanji broj nepotrebnih biopsija prostate (19).

Ipak, za utvrđivanje njegovog značaja za kliničku upotrebu, potrebna su dalja ispitivanja.

Prostate Health Index density (PHID)

PHID predstavlja još jedan korak napred u cilju predikcije dijagnoze karcinoma prostate (PCa) i klinički značajnog karcinoma prostate (eng. clinical significant prostate cancer- csPCa) koji

je potencijalno letalna bolest i zahteva ranu dijagnozu i lečenje. Kriterijumi za csPCa su: Glison skor (Gleason score-GS) 6 sa ≥ 3 pozitivnih jezgara i/ili maksimalna zahvaćenost jezgra (eng. maximum core participation) $\geq 50\%$ ili GS ≥ 7 po Epstein kriterijumima **(20)**.

PHID se izračunava kao PHI podeljeno sa volumenom prostate izmerenim na transrektalnom ultrazvuku.

U odnosu na druge PSA povezane parametre za predikciju PCa, odnosno csPCa (tPSA, %fPSA, %p2PSA, PSAD, PHI), PHID pokazuje veću senzitivnost i specifičnost uz pomoć kojeg se znatno može redukovati broj nepotrebnih biopsija i u najmanjem procentu propustiti detekcija csPCa **(21)**.

1.5.3. Digitorektalni pregled prostate

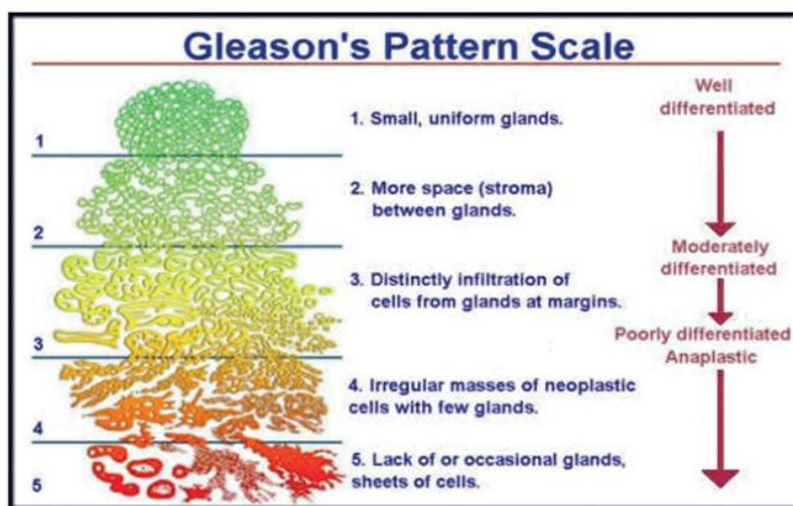
S obzirom da je većina karcinoma prostate lokalizovana u perifernoj zoni koja je palpatorno dostupna digitorektalnim pregledom (eng. Digital rectal Examination-DRE), nalaz DRE koji odstupa od normalnog predstavlja indikaciju za biopsiju **(22)**. Ovaj pregled može otkriti karcinome visokog gradusa kod pacijenata koji imaju vrednost PSA u referentnom opsegu.

1.5.4. Biopsija prostate

Definitivna dijagnoza karcinoma prostate postavlja se nakon patohistološke verifikacije bolesti posle biopsije koja se izvodi pod kontrolom ultrazvuka (UZ), bilo transrektalnim (eng. Transrectal ultrasound-TRUS) ili transperinealnim pristupom. Neophodno je uzeti 10-12 uzoraka iz oba lobusa duž cele prostate od vrha do baze, sa posebnim osvrtom na perifernu zonu gde je karcinom najčešći, a broj uzoraka je nekada zavistan i od veličine prostate **(23)**. U 95% slučajeva patohistološka forma karcinoma prostate je adenokarcinom. Komplikacije biopsije mogu biti: hematospermija, hematurija, rektalno krvarenje, prostatitis, urinarna retencija, epididimitis...

Tumačenje rezultata biopsije podrazumeva da se za svaki uzorak biopsije opiše histološki tip tumora ako je pronađeno maligno tkivo u uzorku i Glison skor definisan prema modifikaciji iz 2005. Međunarodnog udruženja za urološku patologiju (eng. International Society of Urological Pathology - ISUP) **(24)**.

Stepen diferentovanosti karcinoma prostate određuje se pomoću Glisonovog sistema gradiranja, a na osnovu strukture tumorskih žlezda pod mikroskopom **(slika 6)**. Gradiranje se vrši od 1 do 5, pri čemu 1 označava najbolju diferentovanost, a 5 nediferentovanost ćelija. Zbog heterogenosti karcinoma prostate u praksi se koristi Glisonov skor (GS). Kod tumačenja patohistološkog nalaza uzoraka biopsije, GS predstavlja zbir najzastupljenijeg gradusa u uzorku i najvišeg gradusa, nezavisno od njegove zastupljenosti, dok se kod uzoraka nakon prostatektomije GS određuje na osnovu zbira dva najzastupljenija gradusa, uz napomenu ako postoji i treći, viši gradus. Dakle, GS može imati vrednost od 2 (1+1) do 10 (5+5) i predstavlja najznačajniji prognostički faktor **(25)**.



Slika 6. Određivanje Glison skora na osnovu patohistološke slike

Od 2014. godine, pored GS koristi se i novi sistem gradiranja podržan od strane Međunarodnog udruženja za urološku patologiju (eng. International Society of Urological Pathology- ISUP). Postoji 5 gradus grupa (GG) koji se dobijaju grupisanjem različitih GS, pri čemu grupa 1 ima najbolju, dok grupa 5 ima najlošiju prognozu bolesti (**tabela 3**) (**26**).

Tabela 3. Gradus grupe karcinoma prostate (**26**)

Glisonov skor	Gradus grupa
≤6	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4 ili 3+5 ili 5+3)	4
9-10	5

U patohistološkom izveštaju nakon prostatektomije treba da se nađu sledeći podaci: histološki tip tumora, GS, status operativnih margina R0/R1, veličina dominantnog tumorskog čvora ako postoji, histološki gradus, tumorski volumen (TV), definisan pT/pN status, prisustvo invazije semenih vezikula, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima i broj pozitivnih lgl (da bi status lgl bio N0 potrebno je da u najmanje 8 lgl nisu nađene maligne ćelije), PNI, LVI.

U cilju određivanja stadijuma bolesti i kliničke procene raširenosti karcinoma prostate primenjuju se radiološke metode, bilo morfološke poput radiografije (RTG), ultrazvuka (UZ), CT, MR pregleda ili funkcionalne: scintigrafija skeleta (Sci), pozitronska emisiona tomografija (PET) sa CT-om (PET/CT), multiparametrijski MR prostate (eng. Multiparametric magnetic resonance imaging - mpMRI) (**27**).

Najkorisniji metod za određivanje lokalnog stadijuma bolesti na MR pregledu karlice, tj utvrđivanje lokalne proširenosti bolesti u smislu postojanja ekstraprostatične ekstenzije ili invazije semenih vezikula je tumačenje nalaza na T2 sekvencama. Ipak, senzitivnost je niska (oko 60%) dok je specifičnost oko 90%. Senzitivnost se povećava dodavanjem funkcionalnih sekvenci, difuzioni imidžing (eng. diffusion weighted imaging-DWI) ili dinamičko pojačanje kontrasta (eng. dynamic contrast enhancement-DCE), kada je reč o mpMRI, ali je senzitivnost i dalje relativno niska, te se ne preporučuje za određivanje lokalnog stadijuma bolesti kod pacijenata koji pripadaju grupi niskog rizika (**22**).

Multiparametrijski MR prostate ima značajnu ulogu u detekciji slabo diferentovanih karcinoma (Grade Group ≥ 2). Takođe, on ima ulogu u MRI-TRUS vođenoj biopsiji prostate koja

dovodi do povećanja postavljanja dijagnoze visokogradusnih karcinoma u manjem broju uzoraka sa redukcijom detekcije niskogradusnih i klinički neznačajnih karcinoma. Za detekciju pelvičnih limfnih nodusa, mpMRI je ekvivalentan CT pregledu, a prevazilazi senzitivnost i specifičnost Sci skeleta kod detekcije koštanih metastaza. mpMRI je savetno uraditi na megnetu snage od 3 Tesla (3T) (28).

Pozitron emisiona tomografija sa CT-om sa fluciklovinom i PSMA PET/CT (eng. prostate-specific membrane antigen PET/CT) imaju značaja u detekciji koštanih i nodalnih metastaza uz veću senzitivnost i specifičnost u odnosu na PET CT sa holinom. PSMA PET/CT sa 68 Ga ima takođe značaja u detekciji metastaza na kostima i limfnim nodusima. Njihova primena ima značaja u dijagnostikovanju relapsa bolesti nakon sprovedenog inicijalnog lečenja.

Pacijenti se prema riziku za biohemijski relaps bolesti nakon lokalne terapije grupišu u grupu niskog, srednjeg i visokog rizika. Ova podela preporučena je od strane evropskog udruženja urologa (eng. European Association of Urology-EAU) (tabela 4) (23).

Tabela 4. Rizične grupe karcinoma prostate (23)

Nizak rizik	Srednji rizik	Visok rizik	Visok rizik
PSA<10ng/ml	PSA 10-20ng/ml	PSA >20ng/ml	Bilo koji PSA
i GS < 7 (GG1)	Ili GS 7 (GG2/3)	Ili GS>7 (GG4/5)	Bilo koji GS (GG)
i cT1c-T2a	Ili cT2b	Ili T2c	cT3-4 ili cN+
Lokalizovan	Lokalizovan	Lokalizovan	Lokalno uznapredovali

U kliničkoj praksi, određivanje verovatnoće širenja bolesti izvan prostate (ekstraprostatična invazija-EPE, invazija semenih vezikula-SVI, rizik za postojanje limfonodalnih metastaza- LNM) određuje se pomoću Roach formula, a na osnovu vrednosti PSA, GS i T stadijuma bolesti (29).

$$\text{Capsule Invasion Risk} = (3/2) \times \text{PSA} + [(GS-3) \times 10]$$

$$\text{Seminal vesicle Invasion Risk} = \text{PSA} + [(GS-6) \times 10]$$

$$\text{Lymph Node Metastasis Risk} = (2/3) \times \text{PSA} + [(GS-6) \times 10]$$

1.6. Lečenje karcinoma prostate

Karcinom prostate može biti **lokalizovan** kada je bolest samo unutar prostate i **lokalno uznapredovali** ukoliko je došlo do lokoregionalnog širenja, a takođe i **metastatski** ukoliko je bolest zahvatila udaljene organe, odnosno neregionalne limfne čvorove.

Lečenje karcinoma prostate je multidisciplinarno i uključuje čitav tim stručnjaka u kojem radijacioni onkolog ima značajnu ulogu. Lokalizovani karcinomi prostate se u najvećem broju slučajeva leče hirurgijom i/ili radioterapijom (RT) kao lokalnim terapijskim procedurama, uz eventvano uvođenje antiandrogene hormonske terapije (eng. androgen deprivation therapy-ADT) ako za to postoje indikacije. Isto tako, u određenim slučajevima, lečenje lokalizovanog karcinoma prostate može biti odloženo bilo kao aktivno praćenje (eng. active surveillance-AS) ili pažljivo čekanje (eng. Watchful waiting-WW). Lokalno uznapredovali karcinomi leče se uglavnom radioterapijom uz ADT, dok se metastatska bolest leči hemioterapijom, hormonskom terapijom ili palijativnom radioterapijom.

Algoritam lečenja karcinoma prostate prema National Comprehensive Cancer Network-NCCN prikazan je u **tabeli 5**.

Tabela 5. NCCN protokol za lečenje karcinoma prostate (28)

<p>Nizak rizik (PSA <10ng/ml i GS≤6 i cT1-cT2a): <u>Procenjeno preživljavanje više od 10 godina</u> - praćenje (preferirano) - definitivna RT (TRT ili BT) - RP <u>Procenjeno preživljavanje manje od 10 godina</u> -observacija</p> <p>Srednji rizik sa povoljnim prognostičkim parametrima (PSA od 10-20 ng/ml i/ili GS 7 (3+4) / G2 sa manje od 50% HP pozitivnih bioptičkih uzoraka i/ili T2b do T2c): <u>Procenjeno preživljavanje više od 10 godina</u> - aktivno praćenje - TRT ili BT - RP +/- disekcija pelvičnih limfatika <u>Procenjeno preživljavanje manje od 10 godina</u> -Observacija (preferirano) -TRT ili BT</p> <p>Srednji rizik sa nepovoljnim prognostičkim parametrima (PSA od 10-20 ng/ml i/ili GS 7 (3+4) sa više od 50% HP pozitivnih bioptičkih uzoraka ili GS 7 (4+3) / G3 i/ili T2b do T2c): <u>Procenjeno preživljavanje više od 10 godina</u> - RP +/- disekcija pelvičnih limfatika - TRT sa ADT (4-6 meseci) ili TRT + BT +/- ADT (4-6 meseci) <u>Procenjeno preživljavanje manje od 10 godina</u> - TRT sa ADT (4-6 meseci) ili TRT + BT +/- ADT (4-6 meseci) -Observacija</p> <p>Visok rizik (PSA >20ng/ml ili GS između 8 i 10 ili T stage T3a i veci): <u>Procenjeno preživljavanje više od 5 godina</u> -TRT + dugotrajna ADT (1,5-3 godine) -TRT + BT + dugotrajna ADT (1,5-3 godine) -TRT + ADT (2 godine) + Abirateron (za veoma visok rizik) -RP + disekcija pelvičnih limfatika <u>Procenjeno preživljavanje manje od 5 godina</u> - Observacija - ADT - TRT</p> <p>Lokalno uznapredovala bolest (cT3-4 ili N1, M0) <u>Procenjeno preživljavanje više od 5 godina</u> -TRT + ADT+Abirateron (preferirano) -TRT + ADT -ADT +/- Abirateron -RP + disekcija pelvičnih limfatika kod selektovanih pacijenata <u>Procenjeno preživljavanje manje od 5 godina</u> - Observacija - ADT</p> <p>*ako je + hirurška margina posle RP-adjuvantna TRT +/-ADT ili praćenje sa razmatranjem ranog uvođenja terapije već kod PSA > 0,1 ng/ml *ako su + ln posle RP-ADT +/-TRT ili praćenje sa razmatranjem ranog uvođenja terapije već kod PSA > 0,1ng/ml</p> <p>Metastatska bolest -Androgena ablacija +/- paliјativna TRT +/-bisfosfonati/ Docetaxel/Cabazitaxel</p>
--

1.6.1. Aktivno praćenje

S obzirom da veliki broj karcinoma prostate ima indolentni tok, cilj aktivnog praćenja je izbeći nepotrebno lečenje kod pacijenata koji pripadaju grupi niskog rizika, ali bez kompromitovanja lečenja ukoliko za to bude bilo potrebe. Stoga su ti pacijenti pod redovnim nadzorom lekara i u slučaju ranih znakova progresije bolesti, pribegava se aktivnom lečenju.

Pacijenti koji zadovoljavaju kriterijum za ovakav vid lečenja su oni kod kojih je očekivano vreme preživljavanja duže od 10 godina, koji pripadaju GG 1, manje od 3 pozitivna biopsijska uzorka sa minimalnom invazijom uzorka (< 50% po uzorku), klinički stadijum T1c ili T2a, PSA < 10ng/ml i gustina PSA < 0,15 (30). U slučaju prisustva ekstraprostatične ekstenzije (eng. extraprostatic extension - EPE) i limfovaskularne invazije (eng. limfovacular invasion - LVI) na uzorcima dobijenim biopsijom AS se ne savetuje (23).

Program aktivnog praćenja podrazumeva:

- PSA ne češće od svakih 6 meseci, osim kliničkih indikacija kada se radi ranije
- DRP ne češće od svakih 12 meseci, osim kliničkih indikacija
- Ponavljanje biopsije, ne češće od 12 meseci, osim kliničkih indikacija
- Razmotriti ponavljanje mpMRI ne češće od 12 meseci, osim kliničkih indikacija. Kod pacijenata sa suspektom lezijom na mpMRI, biopsija uz fuziju MRI- Ultrazvuk omogućava detekciju viših gradusa (GG ≥ 2) tumora
- Ukoliko je očekivano preživljavanje kraće od 10 godina, pacijenti mogu biti prevedeni na WW režim, odnosno opservaciju (28).

Prelazak sa režima aktivnog praćenja na aktivno lečenje, vrši se u uslovima:

- Kada je na ponavljanoj biopsiji dobijena viša GG patohistološkom analizom
- Povećanje tumorskog volumena, povećanje gustine PSA kao i strah pacijenta

Utvrđeno je da između 50 i 68% pacijenata koji su na režimu aktivnog praćenja mogu izbeći nepotrebno aktivno lečenje, a time i izbeći potencijalne komplikacije definitivnog tretmana. Iako je rizik veoma mali (manje od 0,5%) za nastanak lokoregionalne ili metastatske bolesti tokom aktivnog praćenja, ipak je moguće da dođe do progresije bolesti.

1.6.2. Pažljivo čekanje

Pristup WW podrazumeva pribegavanje aktivnom lečenju tek kada dođe do ispoljavanja simptoma bolesti kao posledica lokalne ili sistemske progresije i lečenje se sprovodi u palijativne svrhe. WW se preporučuje kod pacijenata koji pripadaju grupi niskog, srednjeg ili visokog rizika, sa očekivanim preživljavanjem kraćim od 10 godina, a koji nisu kandidati za lokalnu terapiju u kurativne svrhe (23). Prednosti WW pristupa su u izbegavanju potencijalnih štetnih efekata aktivnog lečenja, a nedostatak je rizik od nastanka lokalnih ili sistemskih simptoma (urinarna retencija, patološka fraktura), bez prethodnih simptoma i nezavisno od vrednosti PSA.

Razlika između aktivnog praćenja i pažljivog čekanja, prikazana je u tabeli 6.

Tabela 6. Aktivno praćenje i pažljivo čekanje (23)

	Aktivno praćenje	Pažljivo čekanje
Cilj lečenja	Kurativno	Palijativno
Praćenje	Prema definisanom protokolu	Individually prema pacijentu
Procena/korišćeni marker	DRE,PSA,rebopsija,mpMRI	Nije definisano unapred
Očekivano vreme preživljavanja	>10 godina	< 10 godina
Cilj	Minimalizovanje toksičnosti izazvane terapijom bez kompromitacije preživljavanja	Minimalizovanje toksičnosti izazvane terapijom
Komentar	Odnosi se na pacijente iz grupe niskog rizika	Može se primeniti na pacijente u svim stadijumima bolesti

1.6.3. Hirurško lečenje karcinoma prostate

Hirurgija se u lečenju karcinoma prostate primenjuje kao radikalna i palijativna. Kada je reč o radikalnoj hirurgiji, najčešće se izvodi radikalna retropubična prostatektomija (RRP) sa ciljem izlečenja kod pacijenata sa klinički lokalizovanim karcinomom prostate, čije je očekivano vreme preživljavanja ≥ 10 godina i koji nemaju teže pridružene bolesti. Ovom metodom odstranjuje se cela prostata sa semenim vezikulama, a obično podrazumeva i disekciju karličnih limfnih čvorova (eng. pelvic lymph node dissection-PLND) s obzirom da PLND pruža važne informacije o stažiranju bolesti i predstavlja značajan prognostički faktor. Savetuje se proširena PLND (eng. extended PLND-ePLND) koja podrazumeva uklanjanje limfatika oko spoljašnjih i unutrašnjih ilijačnih krvnih sudova kao i limfatika oko obturatornih jama. PLND se može izostaviti kod pacijenata sa niskim rizikom za postojanje metastaza u limfnim čvorovima, ali sa rizikom da se postojanje metastaza može propustiti kod izvesnih pacijenata. Nema jasnog praga za rizik od postojanja metastaza u limfnim čvorovima kada PLND treba sprovoditi, ali se uzima da je to između 2% i 7% **(31,32,33,34)**. Pacijenti koji imaju viši rizik za postojanje metastaza u limfnim čvorovima od navedenog praga, treba biti podvrgnuti PLND čak i sa negativnim nalazom PSMA PET skena, jer je njegova senzitivnost za pelvične nodalne metastaze niska (oko 40%) **(35,36)**.

Prednost retropubičnog pristupa operaciji u odnosu na transperinealni je u tome što se njome bolje štede neurovaskularne strukture koje su odgovorne za mokrenje i erekciju, tako da su komplikacije u smislu inkontinencije i impotencije ređe **(37)**.

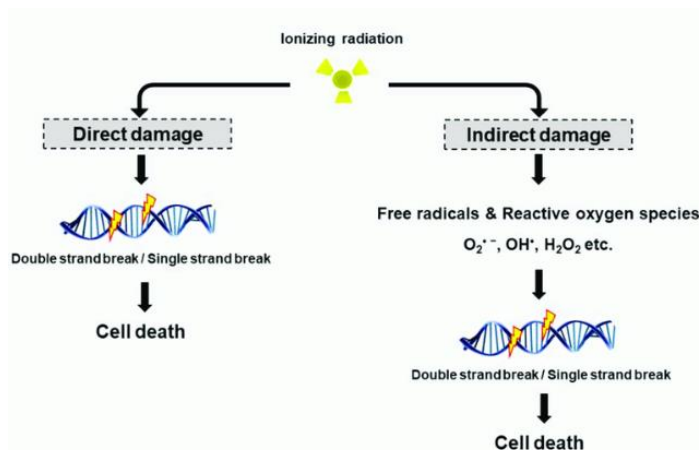
Radikalna prostatektomija sa PLND može se sprovoditi kao otvorena, laparaskopska i robotska hirurgija. Druge dve metode imaju značajnu prednost u brzini oporavka pacijenta nakon operacije. Glavna mana hirurgije su komplikacije u smislu urinarnе inkontinencije i impotencije koja značajno narušava kvalitet života pacijenta.

Palijativna hirurgija se može primeniti kod uznapredovale bolesti, kada je kompromitovano pražnjenje urina od strane tumora, pa se transuretralnom resekcijom odstrani deo prostate i tumora. Kod strogo selektovanih pacijenata, moguće je sprovesti Salvage radikalnu prostatektomiju kod razvoja lokalnog recidiva u odsustvu metastaza nakon transkutane radioterapije (eng. External beam radiotherapy - EBRT) ili brahiterapije (eng. Brachytherapy - BT), ali sa visokom stopom morbiditeta u smislu inkontinencije, gubitka erekcije, strikture na anastomozi.

1.6.4. Radioterapija

Radioterapija ima značajno mesto u lečenju karcinoma prostate u svim stadijumima bolesti. Oko 2/3 pacijenata sa karcinomom prostate će u nekom momentu biti tretirani radioterapijom bilo kao inicijalni tretman ili kasnije usled recidiva ili progresije bolesti **(38)**.

Jonizujuće zračenje može delovati na ćeliju direktnim mehanizmima jednostrukim ili dvostrukum oštećenjem DNA, ali još češće indirektnim mehanizmima, preko slobodnih radikala. **(39)**. Slobodni radikali su molekuli reaktivog kiseonika koji mogu izazvati mnoga oštećenja ćelija i tkiva, a mehanizam njihovog nastanka je različit. U interakciji jonizujućeg zračenja i ćelije, dolazi do njegove interakcije sa vodom i drugim ćelijskim molekulima i nastaju slobodni radikali, od kojih je najznačajniji Superoksid (O_2^-) koji nastaje redukcijom jednog elektrona kiseonika iz molekularnog kiseonika **(40)**. Na **slici 7** šematski je prikazan mehanizam jonizujućeg zračenja na ćeliju.



Slika 7. Šematski prikaz mehanizma jonizujućeg zračenja na ćeliju.

Izvor: Gomes ER, Franco MS. Combining Nanocarrier-Assisted Delivery of Molecules and Radiotherapy. Pharmaceutics. 2022 Jan 3;14(1):105.(39)

U slučaju lokalizovane bolesti, rezultati lečenja primenom hirurgije i radioterapije su slični, sa razlikama u komplikacijama nakon sprovedenog lečenja (41). Kod pacijenata koji pripadaju grupi srednjeg rizika u slučaju lokalizovane bolesti, radioterapija se kombinuje sa antideprivacionom terapijom (eng. Antideprivation therapy – ADT) u trajanju od 4-6 meseci, dok kod pacijenata iz grupe visokog rizika za relaps bolesti, ADT treba primeniti u trajanju 2-3 godine. Kod pacijenata iz grupe niskog rizika, primena ADT nije potrebna (23,27). Dok se kod lokalnog i lokalno uznapredovalog karcinoma prostate radioterapija primenjuje u kurativne svrhe, u metastatskom stadijumu bolesti, njena primena je prvenstveno u palijativne svrhe, sa ciljem smanjivanja simptoma bolesti, gde najveću ulogu ima u postizanju antidoloroznog efekta kod koštanih metastaza.

Ako je lečenje započeto radikalnim hirurškim lečenjem, radioterapija se, u slučaju postojanja loših patohistoloških karakteristika nakon operacije, i pored nedetektibilne bolesti, sprovodi kao postoperativna (adjuvantna), a u cilju smanjenja rizika za pojavu relapsa bolesti. Lošim patohistološkim karakteristikama nakon operacije, smatra se pT3 stadijum bolesti, R1 resekcija ili detektibilan PSA. Ovi pacijenti mogu biti i podvrgnuti monitoringu redovnim kontrolisanjem PSA, ali sa razmatranjem rane radioterapije kod rastućeg PSA ili pri vrednosti PSA >0,1 ng/ml (28).

Radioterapija spasa (eng. Salvage RT) se sprovodi nakon neuspeha sprovedenog lečenja, odnosno u slučaju pojave lokalnog recidiva ili biohemijskog relapsa (22, 27). Biohemijskim relapsom smatra se porast PSA preko 0,2ng/ml. Već pri toj vrednosti, savetno je sprovesti Salvage RT, a svakako pri vrednosti PSA manjoj od 1 ng/ml (42).

U odnosu na način sprovođenja, radioterapija se može primeniti kao **transkutana (TRT)**, **brahiterapija (BT)** ili kombinacija ova dva pristupa.

1.6.4.1. Transkutana radioterapija

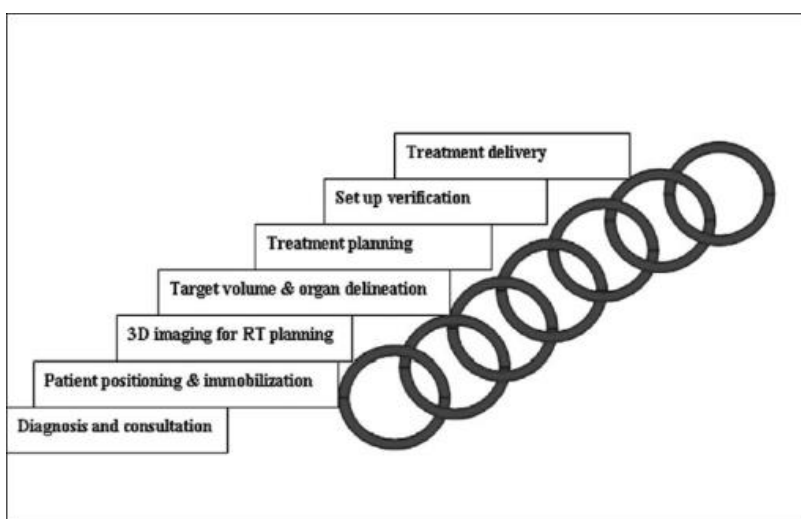
Kada je reč o transkutanoj radioterapiji, savremene radioterapijske tehnike, kao što su 3 D konformalna radioterapija (eng. 3-D Conformal Radiotherapy-3D-CRT), Intenzitetom modulirana radioterapija (eng. Intensity Modulated Radiotherapy - IMRT) i Volumetrijski modulirana lučna terapija (eng. Volumetric Modulated Arc Therapy – VMAT) omogućavaju mogućnost eskalacije doze zračenja i preko 80Gy, uz adekvatniju poštedu okolnih zdravih tkiva, pre svega organa gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta u odnosu na ranije primenjivane konvencionalne tehnike zračenja (43,44,45). Slikom vođena radioterapija (eng. image-guided radiotherapy- IGRT) omogućava precizno sprovođenje radioterapijskog tretmana (46,47,22). Neka istraživanja su pokazala da eskalacija doze zračenja omogućava bolju biohemijsku kontrolu bolesti uz zadržavanje jednakog

nivoa toksičnosti zahvaljujući primeni novih radioterapijskih tehnika, a kod pacijenata iz grupe srednjeg i visokog rizika, primena većih doza dovodi i do dužeg ukupnog preživljavanja (41, 27).

The NRG Oncology/RTOG 0126 klinički trajal pratio je rezultate lečenja kod 1499 pacijenata koji su pripadali grupi srednjeg rizika za relaps bolesti. Period praćenja bio je 8,4 godine. Pacijenti su bili podeljeni u dve grupe, kod prve grupe pacijenata aplikovana je doza 79,2 Gy u 44 frakcije, a druga grupa je primila dozu 70,2 Gy u 39 frakcija (u obe grupe 1,8Gy po frakciji). Uprkos prednostima u postizanju biohemijske kontrole bolesti kao i manje verovatnoće nastanka udaljenih metastaza, u grupi pacijenata koji su primili dozu 79,2Gy, nisu uočene značajne razlike u dužini ukupnog preživljavanja. Više doze rezultirale su izraženijom kasnom toksičnošću, ali manjom stopom potrebe za salvage terapijom (48).

Procedure sprovođenja transkutane radioterapije

Na slici 8 šematski su predstavljeni koraci u planiranju transkutane radioterapije.



Slika 8. Koraci u izvođenju transkutane radioterapije

Pozicioniranje, imobilizacija i CT simulacija

Za CT simulaciju kao i tokom sprovođenja radioterapijskog tretmana, neophodno je da pacijent adekvatno prazni debelo crevo i komforno puni mokraćnu bešiku, u cilju preciznijeg zračenja i adekvatnije zaštite okolnih zdravih tkiva, pre svega rektuma, mokraćne bešike i tankih creva.

CT simulacija se izvodi u supinacionom položaju, jer se na taj način smanjuje pokretljivost prostate, redukuje doza na organe od rizika i obezbeđuje komforniji položaj za pacijenta. Mogu se koristiti podmetači za kolena i fiksatori za stopala u cilju adekvatne reproducibilnosti položaja pacijenta (slika 9) (49). Primenjuje se kontrastno sredstvo u cilju bolje vizuelizacije krvnih sudova, creva i mokraćne bešike. Skenira se regija od interesa, od nivoa L1/L2 do 5cm ispod ishiadične kosti, sa preseccima na 3-5mm.

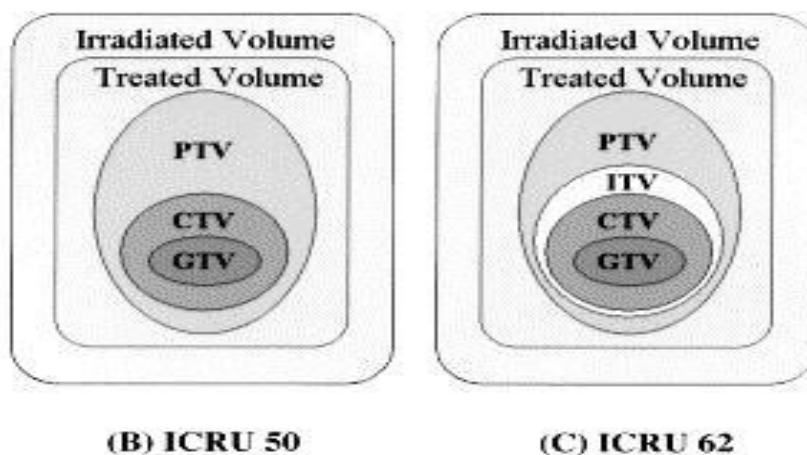


Slika 9. Podmetač za kolena i stopala

Definisanje volumena od interesa

Konturisanje referentnih struktura izvodi se na osnovu preporuka Međunarodne komisije za radijacione jedinice i merenja (engl. International Commission on Radiation Units and Measurements-ICRU i to ICRU 50, ICRU 62, kao i najnovije ICRU 83 (50,51,52).

Šematski prikaz referentnih volumena zračenja prikazan je na slici 10.



Slika 10. Referentni volumeni zračenja- ICRU 50, ICRU 62

Volumen tumora (eng. Gross Tumor Volume - GTV): To je makroskopski vidljiv tumor, ali je sama lokalizacija tumora u prostati manje važna, pa je GTV zapravo cela prostata.

Klinički volumen mete (eng. Clinical target Volume - CTV): To je zapravo mikroskopski tumor i predstavlja zonu verovatnog lokalnog ili regionalnog mikroskopskog širenja bolesti oko GTV-a. U CTV treba uključiti deo ili cele semene kesice, konturu tumorskog ležišta nakon operacije, konturu regionalnih limfnih čvorova koji nisu uvećani, ali postoji povećan rizik za postojanje mikrometastaza izračunatog pomoću Roach formula.

Planirani ciljni volumen (eng. Planning Target Volume - PTV): konturisanje margine oko CTV-a, koja svojom širinom obuhvata:

- zonu fiziološkog pokreta organa unutar koga se nalazi CTV
- moguće varijacije u obliku i veličini organa koji u sebi sadrži CTV

- moguću nepreciznost repositioniranja pacijenta tokom izvođenja frakcionisanog zračenja. Margina PTV-a na CTV kod planiranja radioterapije karcinoma prostate iznosi najčešće 5-10 mm.

Tretirani volumen (eng. Treatment volume - TV): predstavlja ukupni volumen koji primi propisanu dozu zračenja.

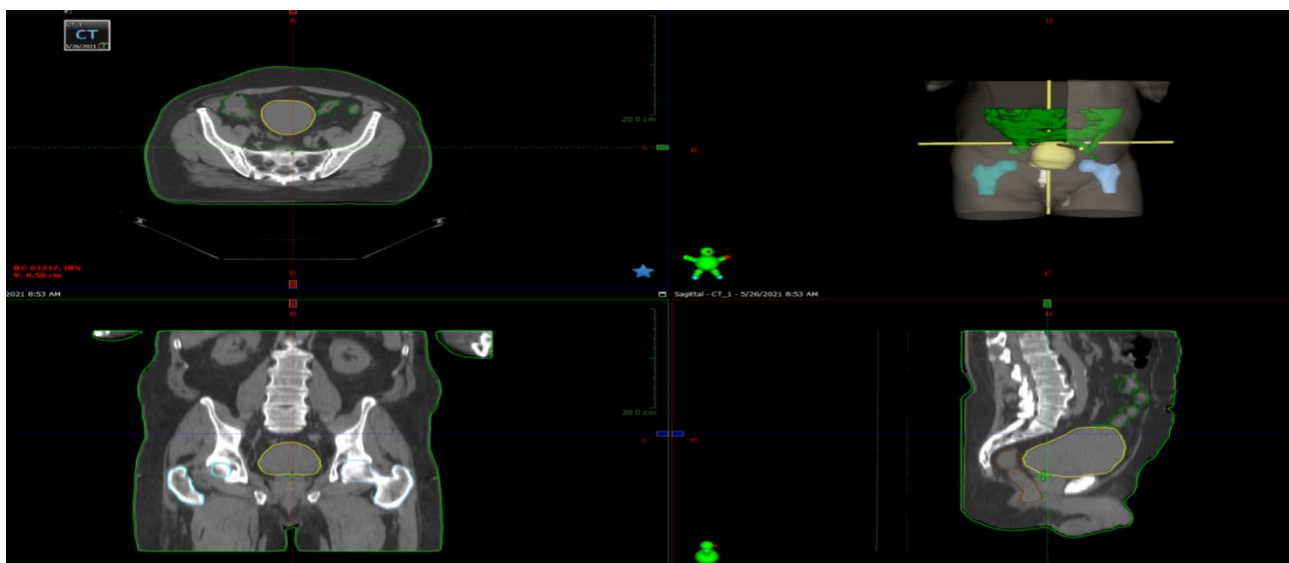
Iradijacioni volumen (eng. Irradiated volume - IV): Volumen koji prima značajnu dozu (više od 50% target doze).

Kao dodatak volumenima definisanih prema ICRU 50, u ICRU 62 dodata su još dva volumena. To su Unutrašnji target volumen (**eng. Internal target volume - ITV**) i Planirani volumen organa od rizika (**eng. Planning organ and risk volume - PRV**). Takođe su definisane Unutrašnja margina (**eng. Internal margin - IM**), setup margin (**SM**), organi od rizika (**OAR**) i konformacioni index (**Conformity index - CI**). Internal margin (IM) je definisana fiziološkim pokretima organa (usled respiracija, zevanja, pokreta pluća, srca, creva, stepena napunjenosti mokraćne bešike). Setup margina (SM) je definisana pokretima koji su u vezi sa tehnikom zračenja.

Internal target volume (ITV) je kombinacija volumena CTV i IM. Planning organ and risk volume (PRV) definiše volumen organa od rizika koji su u okviru PTV-a. Konformacioni index je odnos Treatment volume i PTV ($CI=TV/PTV$).

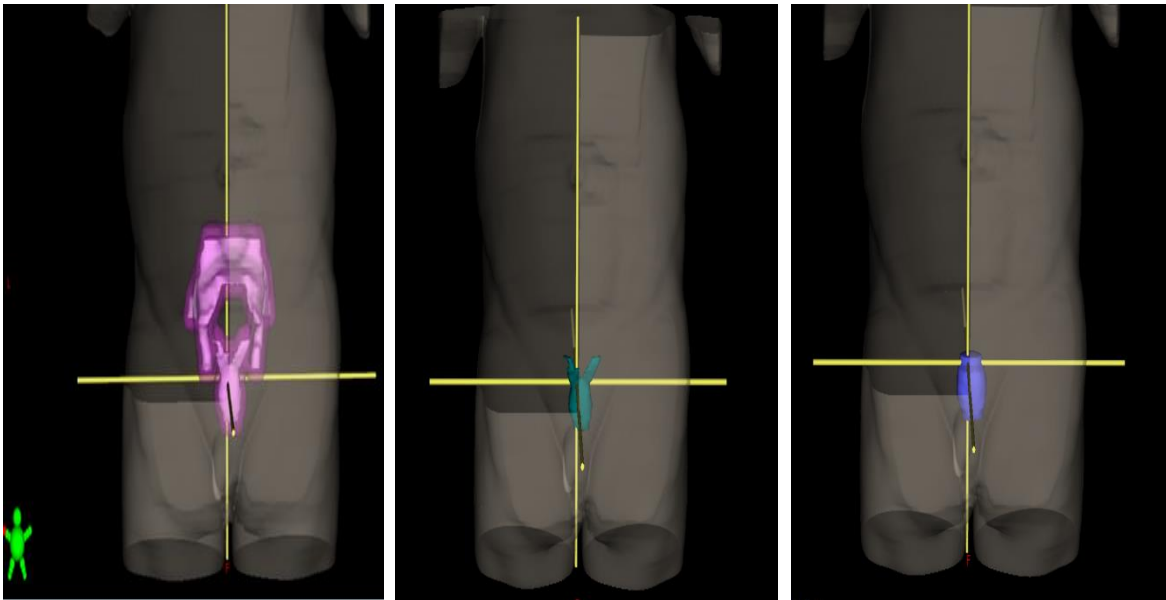
Organi od rizika (Organs at risk - OAR): Organi od rizika predstavljaju zdrava tkiva/organe koji se nalaze u blizini ciljnih volumena, a o čijoj radiosenzitivnosti se mora voditi računa pri planiranju radioterapije, jer prekomernim ozračivanjem ovih organa može doći do njihovog oštećenja sa nastankom radijacionih komplikacija. Kod karcinoma prostate u rizične organe spadaju mokraćna bešika, debelo i tanko crevo, rektum i glave femura.

Delineacijom organa od rizika i ciljnih volumena (**slika 11 a i b**), omogućeno je precizno planiranje radioterapije sa ciljem uništavanja tumorskih ćelija uz minimalno oštećenje okolnih normalnih struktura (**53, 54**).



Slika 11a. Delineacija organa od rizika i slika virtuelnog pacijenta

Izvor: Materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

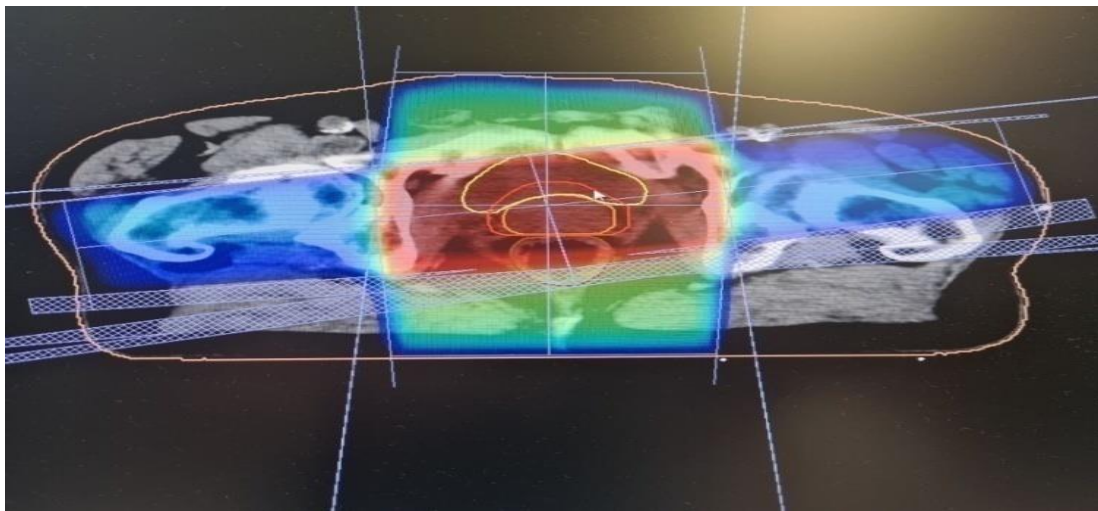


Slika 11b. Ciljni volumeni (PTV 1, 2, 3)

Izvor: Materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

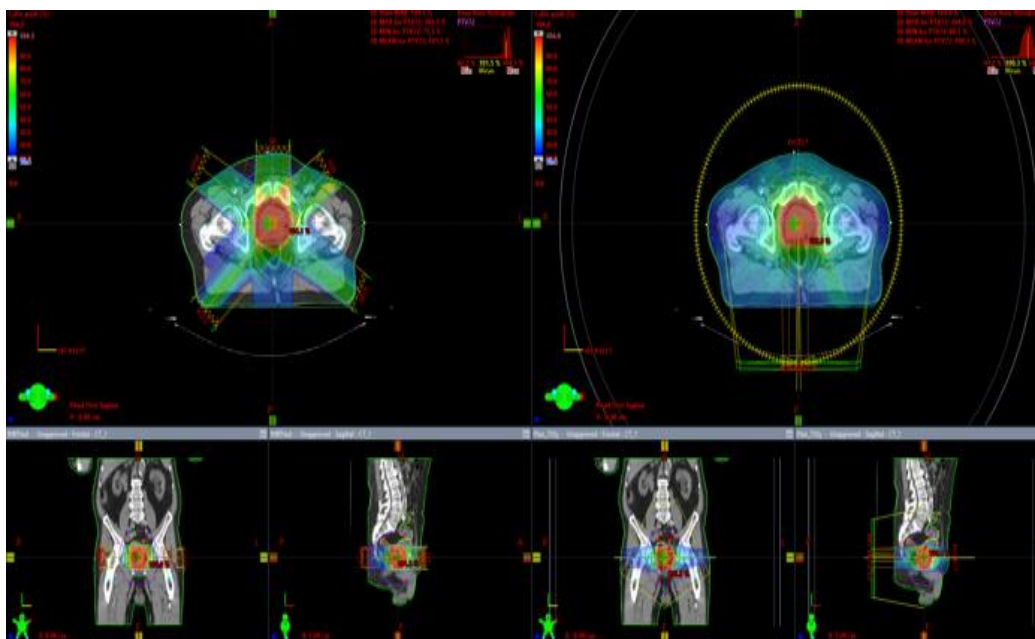
Preskripcija doze zračenja, planiranje i sprovođenje radioterapije

Preskripcija podrazumeva propisivanje doze koju treba isporučiti na ciljni volumen i definisanje parametara koje je potrebno ispuniti u cilju dobijanja adekvatnog plana. Planiranje zračne terapije od strane medicinskih fizičara može se sprovesti različitim radioterapijskim tehnikama (**slika 12 i slika 13**).



Slika 12. Planiranje zračne terapije pacijenta sa karcinomom prostate 3D CRT tehnikom

Izvor: Materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije



Slika 13. Planiranje zračne terapije pacijenta sa karcinomom prostate IMRT i VMAT tehnikom
Izvor: Materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

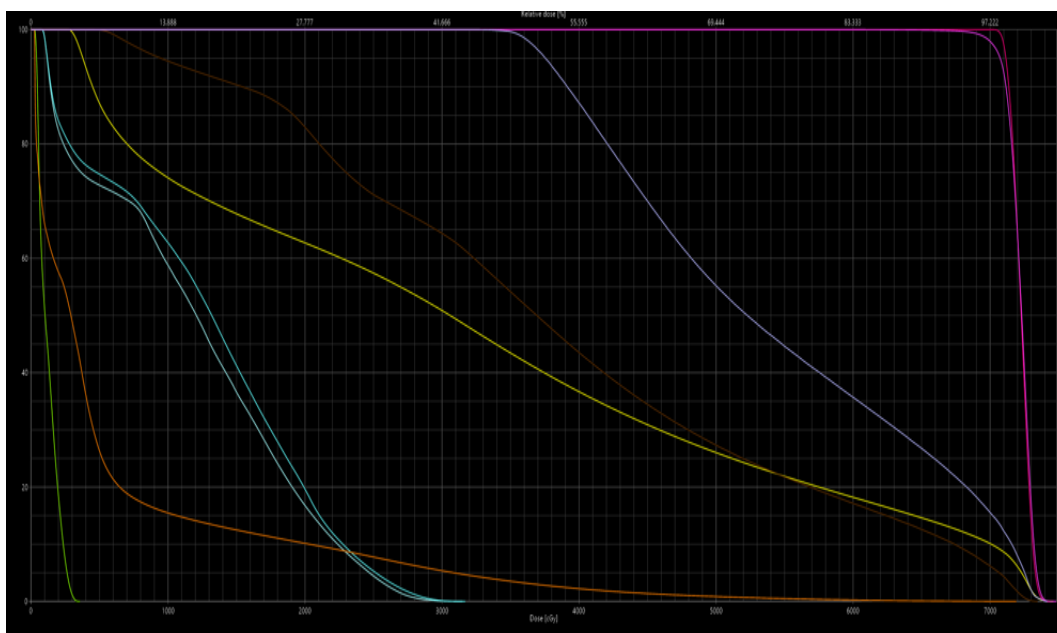
Dozna ograničenja za organe od rizika, definisana su pomoću The Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic summary (Quantec), čiji je deo prikazan u **tabeli 7 (55)**.

Tabela 7. Quantec ograničenja za organe od rizika (55)

Organ	Radioterapijski tretman	Krajnji ishod	Volumen organa koji primi datu dozu (Gy)	Stopa razvoja krajnjeg ishoda (%)
Rektum	3D-CRT	Kasna rektalna toksičnost Gr \geq 2 Gr \geq 3 Gr \geq 2 Gr \geq 3 Gr \geq 2 Gr \geq 3 Gr \geq 2 Gr \geq 3 Gr \geq 2 Gr \geq 3	V50 \leq 50% V60 \leq 35% V65 \leq 25% V70 \leq 20% V75 \leq 15%	\leq 15 \leq 10 \leq 15 \leq 10 \leq 15 \leq 10 \leq 15 \leq 10 \leq 15 \leq 10
Mokraćna bešika	3D-CRT	Gr \geq 3 kasne toksičnosti	V65 \leq 50%, V70 \leq 35% V75 \leq 25% V80 \leq 15%	
Glave femura	3D-CRT		50Gy<5% (srednja doza za glave femura treba da je manja od 50 Gy)	

Pomoću histograma volumene doze (eng. Dose Volume Histogram- DVH) vrši se analiza radioterapijskog plana, odnosno proverava se da li je adekvatna pokrivenost ciljnih volumena 95%

dozom zračenja kao i da li su ispoštovana dozna ograničenja organa od rizika definisana Quantecom (slika 14).



Slika 14. Analiza DVH

Izvor: Materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Nakon završenog planiranja zračenja i prihvatanja radioterapijskog plana od strane radijacionog onkologa, iradijacija se izvodi tokom nedelje svakoga dana, izuzev vikenda, a provera preciznosti zračenja vrši se pregledom portal grafija ili uz pomoć Cone Beam CT-a makar jednom nedeljno. Provera preciznosti pri svakoj frakciji omogućena je primenom IGRT uz pomoć koje se redukuju greške pri pozicioniranju, što omogućava i manje margine.

1.6.4.1.1. Radikalna radioterapija

Grupa niskog rizika

Primenom savremenih tehnika, može se propisati doza i preko 80Gy standardnim režimom frakcionisanja (1,8-2 Gy dnevno).

GTV odgovara CTV-u i oni se definišu kao volumen prostate.

PTV margina 5-10 mm, posteriorno se daje manja margina, da bi se smanjio volumen rektuma koji primi visoku dozu zračenja (56,57). U slučaju primene IGRT, margina se može smanjiti na 3 mm (56).

Kod pacijenata koji pripadaju grupi niskog rizika, ADT se ne preporučuje.

Grupa srednjeg rizika

Kod ove grupe pacijenata, propisuje se doza kao i kod pacijenata iz grupe niskog rizika, ali se savetuje i primena ADT u trajanju 4-6 meseci.

U cilju eskalacije doze zračenja koja dovodi do boljih rezultata lečenja, može se preporučiti kombinacija TRT i Brahiterapije (BT) koja se propisuje u vidu boost-a, odnosno nakon primljenih 46-50,4 Gy transkutano, standardnim režimom frakcionisanja (23,27). Nakon pauze od 2 nedelje, aplikuje se brahiterapija.

GTV-prostata i makroskopska EPE i SVI.

CTV-GTV i proksimalnih 1-2cm ili cele semene kesice (SVI).

PTV-5-10 mm margina, kao kod grupe pacijenata sa niskim rizikom.

Ako je rizik za infiltraciju semenih vezikula prema Roach formuli veći od 15%, radioterapija se izvodi u dve faze.

Faza 1:

PTV1-Prostata i semene vezikule sa odgovarajućom marginom (66-70 Gy)

Faza 2:

PTV 2-Prostata sa odgovarajućom marginom (dodatnih 6-10 Gy)

Ako je rizik za infiltraciju semenih vezikula prema Roach formuli manji od 15%, radioterapija se izvodi u jednoj fazi, kada se propisuje ukupna doza na PTV od 72-80 Gy.

Grupa visokog rizika-lokalizovana bolest

U zračni volumen uključuju se prostata i semene vezikule. Može se kombinovati TRT i BT (56, 57). Primena ADT preporučuje se 2-3 godine.

Grupa visokog rizika- lokalno uznapredovala bolest

To su pacijenti koji pripadaju cT3-T4 ili N+ stadijumu bolesti. Ako je rizik za infiltraciju limfnih čvorova određenog pomoću Roach formule $\geq 15\%$, u CTV je neophodno uključiti pelvične lgl sa marginom 0,7 mm oko krvnog suda i to distalne zajedničke ilijačne, spoljašnje i unutrašnje ilijačne, presakrane i obturatorne. Delineacija CTV lgl obično počinje od nivoa L5/S1 do gornje ivice pubičnih kostiju. Kod ove grupe pacijenata zračenje se sprovodi u tri faze, u prvoj su u zračni volumen pored CTV lgl uključeni i prostata i semene vezikule, a u narednim fazama, nakon 45-50 Gy limfatici se isključuju (23). Primena ADT preporučuje se 2-3 godine.

1.6.4.1.2. Radioterapija nakon radikalne prostatektomije

Pacijenti koji su pod rizikom za relaps bolesti nakon RRP su oni koji u svom patohistološkom izveštaju imaju GG ≥ 3 , pT3, pN0, R1. Ako je nivo PSA nakon operacije iznad 0,1 ng/ml, može se primeniti adjuvantna zračna terapija dozom od 64-72 Gy unutar 6 meseci. Ovi pacijenti mogu biti podvrgnuti i rigoroznim kontrolama uz uvođenje rane Salvage terapije pre nego vrednost PSA pređe 0,2 ng/ml.

Ako postoji N1 bolest, savetuje se primena adjuvantne RT sa ADT ili samo ADT, a ako su manje od 3 mikroskopski pozitivna limfna čvora nakon ePLND, bez ektranodalne bolesti i PSA nakon operacije manji od 0,1ng/ml, može se pribeći samo praćenju.

Pri delineaciji CTV-a, uključuje se loža prostate i ostaci semenih vezikula ako one nisu radikalno odstranjene, odnosno njihova loža sa ili bez delineacije lgl u zavisnosti od N statusa bolesti (58).

1.6.4.2. Brahiterapija

S obzirom da karcinom prostate ima nizak α/β odnos (oko 1,5), ovi pacijenti su kandidati za hipofrakcionisani režim sprovođenja radioterapije.

Intersticijalna brahiterapija kao monoterapija primenjuje se kod pacijenata koji pripadaju grupi niskog rizika i selektovanih pacijenata koji pripadaju srednjoj rizičnoj grupi. Kod većine pacijenata iz grupe srednjeg, a u ređim slučajevima i grupi visokog rizika, ona se primenjuje u kombinaciji sa transkutanom radioterapijom i hormonskom terapijom.

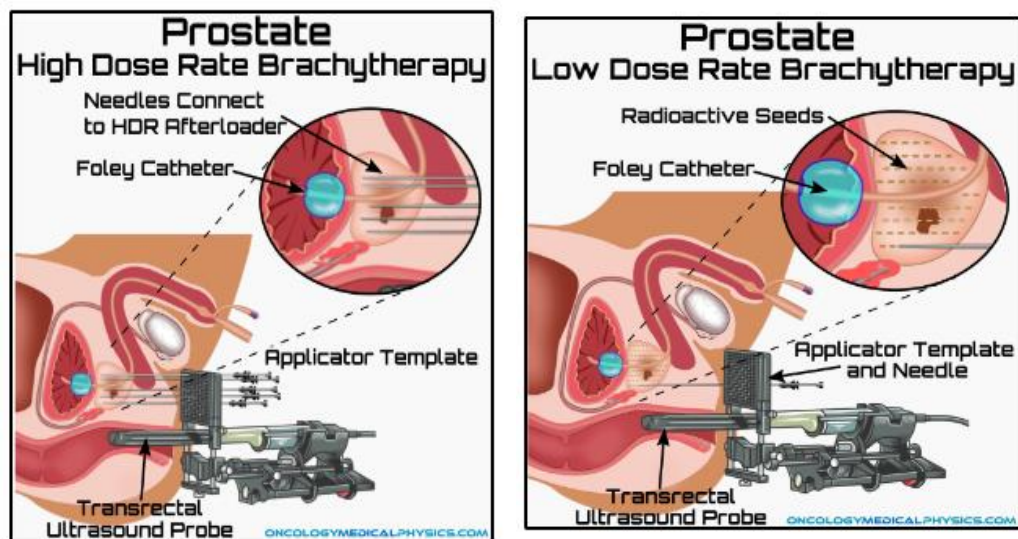
Intersticijalna brahiterapija prostate sprovodi se u high dose rate - HDR režimu sa privremenim radioaktivnim izvorom, najčešće Iridijum 192 (Ir 192), ili u low dose rate - LDR režimu primenom permanentnog izvora niske aktivnosti, najčešće jod 125 (I 125) i Paladij 103 (Pd 103).

Privremeni izvori visoke aktivnosti Ir 192 koriste se najčešće radi eskalacije doze u kombinaciji sa transkutanom zračnom terapijom. Mnogobrojna istraživanja su potvrdila da se bolji rezultati lečenja postižu kombinacijom TRT i BT nego samo TRT IMRT tehnikom, pa čak i ako se IMRT tehnikom isporuči doza od 86,4 Gy (59,60). Benefiti koje obezbeđuje primena HDR BT u odnosu na druge načine sprovođenja radioterapijskog lečenja kod pacijenta sa karcinomom prostate su planiranje u realnom vremenu, ubrzo nakon plasiranja vodiča kao i omogućavanje optimizacije distribucije doze zahvaljujući mogućnošću promene pozicije vodiča kao i vremena zadržavanja izvora u njima (61).

Procedura se izvodi u opštoj ili spinalnoj anesteziji tako što se pacijent postavlja u litotomni položaj, u kome se vrši aplikacija vodiča implanata (slika 12). Vodiči izvora zračenja (igle, kateteri) se precizno pozicioniraju u prostatu, pod kontrolom endorektalne ultrazvučne sonde. Nakon plasiranja vodiča, sledi planiranje zračenja koje se vrši na osnovu UZ, CT i MR. Po završenom snimanju, lekar definiše interesne volumene, nakon čega fizičar rekonstruiše vodiče i proračunava plan zračenja. Prednosti planiranja na magnetu su dobijanje boljeg kvaliteta slike uz mogućnost bolje vizuelizacije EPE kao i tumorske promene u samoj prostati. Zbog stabilne pozicije volumena nije potrebna margina između CTV i PTV, a od organa od rizika, potrebno je delinearati rektum, mokraćnu bešiku i uretru. Nakon završenog planiranja, na osnovu plana zračenja, naknadnim punjenjem vodiča sa distance, izvor se dovodi u precizno definisanu poziciju u vodiču i prema tumoru. Nakon sprovedenog zračenja, izvor se uklanja iz pacijenta uz deplasiranje vodiča.

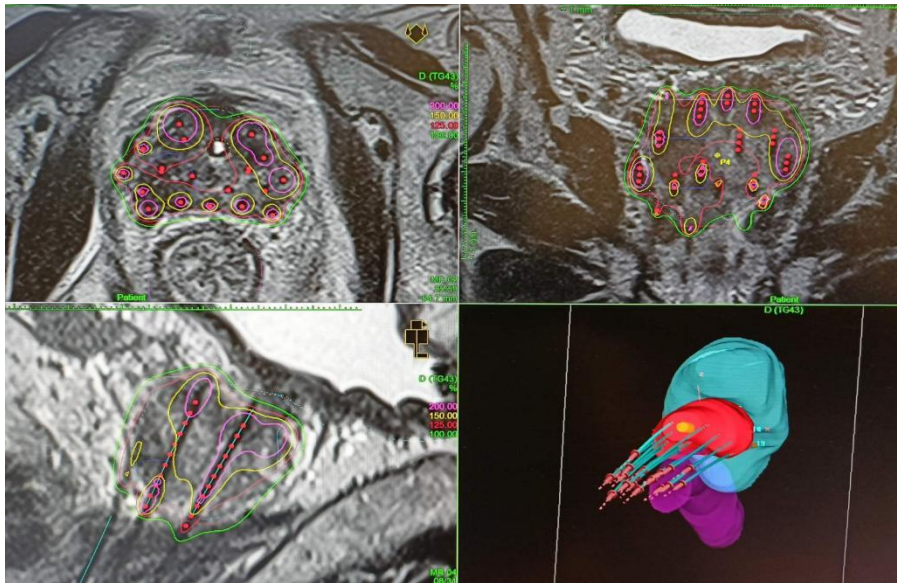
Indikacija za primenu permanentnih izvora niske aktivnosti su dobro ograničeni tumori sa povoljnim prognostičkim faktorima. Invazija kapsule je kontraindikacija za ovaj vid lečenja. Najčešće korišćeni izvori su 125 I ili 103 Pd.

Procedura sprovođenja brahiterapije privremenim i trajnim izvorima, šematski je prikazana na slici 15.



Slika 15. Intersticijalna brahiterapija karcinoma prostate (privremeni i trajni izvori)

Na slici 16 prikazan je plan za brahiterapiju prostate pacijenta lečenog u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije



Slika 16. Planiranje zračenja lokalnog recidiva u prostati
Izvor: Materijal Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Doze i frakcionisanje brahiterapije

Monoterapija: LDR: 145 Gy (I 125), 125 Gy (Pd 103)

HDR: (Ir 192): 34-38 Gy / 4 frakcije, 31,5 Gy / 3 frakcije i 26 Gy / 2 frakcije **(61)**.

Kombinovana nakon TRT sa 45 Gy/25 frakcija: LDR: 110 Gy (I 125), 90 Gy (Pd 103)

HDR (Ir 192): 15 Gy / 3 frakcije, 11-22 Gy / 2 frakcije ili 12-15 Gy u 1 frakciji **(61)**.

Brahiterapija se može primeniti kao Salvage BT kod pojave lokalnog recidiva u prostati nakon sprovedenog lečenja. Mogući su različiti režimi frakcionisanja HDR brahiterapije: 15- 19 Gy u 1 frakciji, 26 Gy u 2 frakcije, 31,5 Gy u 3 frakcije **(62)**.

1.6.5. Hormonska terapija

S obzirom da je karcinom prostate zavistan od muških polnih hormona, primena ADT ima značajno mesto u inhibiciji rasta ćelija karcinoma prostate. Androgen deprivaciona terapija može delovati centralnim mehanizmom, sprečavajući produkciju androgena ili blokadom dejstva androgena na nivou receptora, kada je reč o perifernoj blokadi. Kombinacijom ova dva mehanizma postiže se totalna androgena blokada (eng. Total androgen blockade - TAB).

Cilj ADT je postizanje kastracionog nivoa testosterona u krvi (< 50 ng/dl, odnosno < 1,7 nmol/l). Ovaj cilj se može postići izvođenjem bilateralne orhiektomije kada je reč o hirurškoj kastraciji ili medikamentozno, primenom agonista oslobađajućeg hormona za lutenizirajući hormon (eng. lutenizing-hormone-releasing hormone - LHRH) ili LHRH antagonista koji se uglavnom ordiniraju u vidu depo injekcija što podrazumeva hemijsku kastraciju. Kastracioni nivo testosterona postiže se za 2-4 nedelje **(22)**.

Faza bolesti u kojoj primena ADT ima efekta, bilo primenom hirurške ili medikamentozne kastracije, naziva se **androgen senzitivna faza karcinoma prostate**. Kada ova terapija više ne daje rezultate, pacijent ulazi u fazu bolesti koja se naziva **kastraciono rezistentni karcinom prostate**. U ovoj fazi bolesti ćelije karcinoma prostate su i dalje osetljive na androgene hormone, ali za njihov rast i umnožavanje su dovoljne sasvim male količine androgena koji se uglavnom proizvode u

nadbubrežnim žlezdama ili samim ćelijama prostate. Lekovi koji se koriste u cilju prekidanja sinteze androgenih hormona u nadbubrežnim žlezdama i u ćelijama karcinoma prostate nazivaju se **inhibitori sinteze androgenih hormona**. Njihov efekat nastaje kao rezultat blokade enzima koji se naziva Cyp 17, a koji ima glavnu ulogu u stvaranju testosterona iz holesterola u testisima, nadbubrežnim žlezdama i samim ćelijama karcinoma prostate. Predstavnik ove grupe lekova je **Abirateron**. Njegova indikacija je uznapredovali (metastatski) kastraciono-rezistentni karcinom prostate koji je progredirao na prethodnu hormonsku terapiju. Primenjuje se u obliku tableta, a dnevna doza je 1000 mg dnevno, obavezno uz niske doze kortikosteroida u cilju smanjivanja neželjenih efekata leka. Njegova neželjena dejstva su periferni otoci, nizak nivo kalijuma u krvi i porast krvnog pritiska.

Druga vrsta lekova može delovati time što blokira slanje signala kontrolnom centru ćelija karcinoma prostate da otpočnu sa deobom i rastom posle vezivanja testosterona za androgeni receptor. Predstavnik ove grupe lekova je **Enzalutamid**. On deluje kao antiandrogen, jer kompetitivno blokira vezivanje androgena za androgeni receptor, a takođe blokira signalne puteve nakon vezivanja testosterona za androgeni receptor. Dnevna doza je 160 mg, a najčešća neželjena dejstva su talasi vrućine i glavobolja, a najozbiljnija neželjena dejstva su epi napadi.

Faza bolesti u kojoj je karcinom prostate postao otporan na primenu i ovih lekova, naziva se **hormonski rezistentna faza bolesti**. To znači da je bolest postala otporna na sve vidove hormonske terapije.

Hormonska terapija, u zavisnosti od vremena primene u odnosu na radioterapiju, može biti neoadjuvantna, konkomitantna i adjuvantna. Njenom primenom povećava se lokalna kontrola bolesti kao i ukupno preživljavanje pacijenata sa karcinomom prostate. Neoadjuvantna, konkomitantna i adjuvantna androgena deprivacija se primenjuje sa radioterapijom kod pacijenata sa niskim i srednjim rizikom u trajanju 6 meseci sa ciljem redukcije target volumena i omogućavanja eskalacije doze. Njihovu primenu treba započeti najmanje 2 meseca pre radioterapije. Kod pacijenata sa visokim rizikom, adjuvantna androgena deprivacija se primenjuje 2-3 godine.

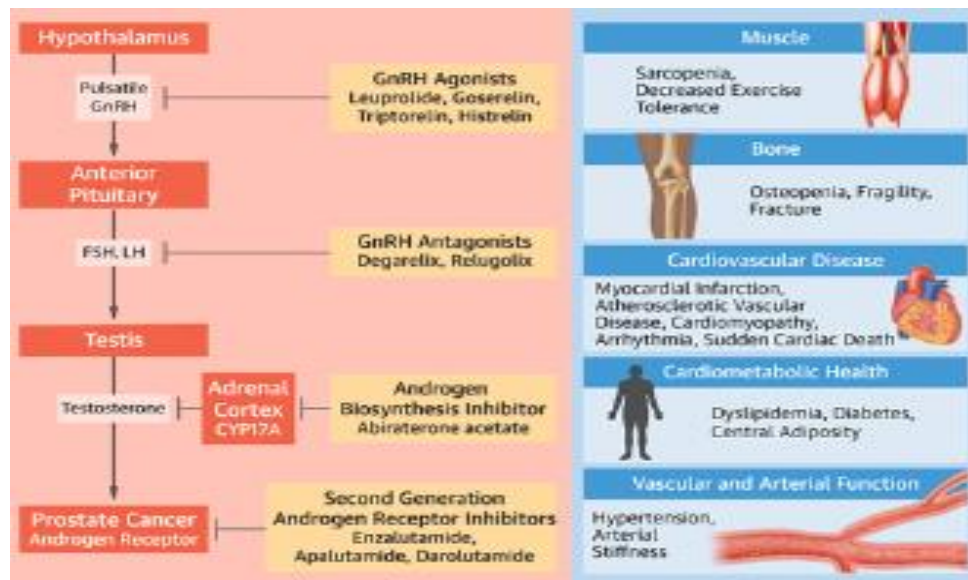
Hormonska terapija ne može da izleči karcinom prostate, ali se razvoj bolesti može usporiti. Koliko će ova terapija biti uspešna i koliko će dugo trajati uspeh u kontroli bolesti je individualno. Pre ili kasnije, kod svih pacijenata koji primaju hormonsku terapiju, karcinom prostate postaje otporan na ovu vrstu lečenja i bolest počinje da napreduje.

Da bi se lakše razumeo cilj sa kojim se primenjuje hormonska terapija, karcinom prostate se deli na fazu **nemetastatske** i na fazu **metastatske** bolesti.

Nemetastatski karcinom prostate je faza u kojoj ne postoje kliničkim i dijagnostičkim pregledima utvrđene metastaze u kostima, limfnim žlezdama i/ili drugim organima. U ovoj fazi bolesti hormonska terapija se primenjuje u ograničenom trajanju i to kao:

- Hormonska terapija u kombinaciji sa radikalnom radioterapijom prostate. Postoje čvrsti dokazi da primena hormonske terapije pre, za vreme i posle radikalne radioterapije karcinoma prostate značajno produžava preživljavanje i odlaže napredovanje bolesti.
- Hormonska terapija u kombinaciji sa radikalnom operacijom prostate se ne primenjuje, s obzirom da nema dokaza da utiče na ukupno preživljavanje i dalje napredovanje bolesti.
- Hormonska terapija kod biohemijskog relapse posle radikalne operacije ili radioterapije prostate. Biohemijski relaps znači da postoji samo povećanje vrednosti PSA posle radikalne operacije ili radioterapije, ali bez kliničkim pregledom utvrđenih metastaza. Postoje različita mišljenja kada treba uvesti hormonsku terapiju kod pojave biohemijskog relapse. Dok jedni smatraju da je to potrebno učiniti odmah, drugi smatraju da ne treba lečiti PSA, već bolest ukoliko se pojavi.
- Hormonska terapija kod de novo dijagnostikovanih pacijenata koji nisu kandidati za radikalnu operaciju ili radioterapiju usled postojećih komorbiditeta.

Metastatski karcinom prostate je faza bolesti u kojoj postoje kliničkim i dijagnostičkim pregledima utvrđene metastaze u kostima, limfnim žlezdama i/ili drugim organima. Jednom započeta hormonska terapija u ovoj fazi bolesti traje doživotno. Na **slici 17** prikazan je mehanizam delovanja ADT i njihovo dejstvo na različite sisteme u organizmu (**63**).



Slika 17. Mehanizam delovanja ADT

Izvor: Narayan V, Ross AE, Parikh RB, Nohria A, Morgans AK. How to Treat Prostate Cancer With Androgen Deprivation and Minimize Cardiovascular Risk: A Therapeutic Tightrope. JACC CardioOncol. 2021 Dec 21;3(5):737-741. (63)

1.6.6. Imunoterapija

Imunoterapija podstiče imuni sistem u borbi protiv bolesti. Na taj način deluju vakcine. Pacijenti koji su u metastatskoj kastracino rezistentnoj fazi bolesti koji nemaju izraženije simptome bolesti ili su oni minimalni, može se primeniti vakcina Sipuleucel-T, odobrena od strane Američke agencije za hranu i lekove. Uništavanje tumorskih ćelija omogućava se pomoću aktivacije CD4+ i CD8+ T limfocita (64).

1.6.7. Hemioterapija i Lutetium-177 PSMA terapija

Hemioterapija se primenjuje u lečenju uznapredovale metastatske bolesti, kada hormonska terapija više nije efikasna, tj u kastraciono rezistentnoj ili hormon rezistentnoj fazi metastatske bolesti, najčešće kod postojanja visceralnih metastaza. Najčešće korišćeni protokoli su Decetaxel (Taxotera) koja se primenjuje 1 u 3 nedelje i.v uz kortiko th i Kabazitaksel (Jevtana) na 21 dan uz primenu kortikoterapije. Neželjena dejstva hemioterapije su: pad u krvnoj slici (najozbiljnije neželjeno dejstvo je febrilna neutropenija), opadanje kose, mučnina, povraćanje, ranice u ustima, proliv, iscrpljenost.

Kod uznapredovalog metastatskog karcinoma prostate, može se primeniti Lutetium-177 PSMA terapija, gde se za PSMA molekul koji se nalazi na površini ćelija karcinoma prostate vezuje Lutetium-177 i na taj način uništava tumorske ćelije prostate. Preduslov za primenu ove terapije je posedovanje PSMA PET skenera sa Galijumom-68 kojim se detektuju tumorske ćelije prostate, odnosno PSMA molekul za koji se Lutetium-177 vezuje.

1.6.8. Toksični efekti radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate

Iako je primarni cilj radioterapije apilikovati odgovarajuću dozu na ciljni volumen, okolna zdrava tkiva takođe prime izvesnu dozu zračenja, sa potencijalnim razvojem radijacione toksičnosti.

Nakon primene radioterapije u lečenju karcinoma prostate, 5 do 10% pacijenata može očekivati ozbiljne neželjene efekte koji mogu uticati na njihov kvalitet života (eng. Quality of Life-QOL) (65,66).

Toksičnost radioterapije kod lečenja karcinoma prostate može se manifestovati u donjem gastrointestinalnom traktu kao posledica oštećenja rektuma i creva, što predstavlja gastrointestinalnu (GI) toksičnost. Takođe, komplikacije radioterapije se mogu manifestovati u genitourinarnom traktu prouzrokujući simptome kao posledicu oštećenja uretre, bešike i prostate, što predstavlja genitourinarnu (GU) toksičnost (67).

Radijaciona toksičnost može biti akutna i kasna.

U osnovi nastanka akutnih neželjenih dejstava leži inflamacija, dok je fibroza glavni razlog nastanka kasnih neželjenih dejstava radioterapije (67,68).

1.6.8.1. Akutna radijaciona toksičnost kod karcinoma prostate

Akutna radijaciona toksičnost obično predstavlja privremeno stanje i zahvata tkiva koja se brzo dele, uzrokujući dermatitis, cistitis, dijareju, u toku ili ubrzo nakon sprovođenja radioterapijskog tretmana (69).

Podaci iz literature govore da se akutna radijaciona toksičnost manifestuje do 120 dana od početka radioterapijskog tretmana, dok se kasna radijaciona toksičnost ispoljava nakon toga (70, 71).

Neki autori akutnu toksičnost definišu kao onu koja se ispolji tokom tretmana, odnosno unutar 90 dana nakon završenog radioterapijskog lečenja, dok se kasnom radijacionom toksičnošću smatra ona koja se javlja nakon 90 dana ili pak u toku lečenja, ali koja traje i posle 90 dana od početka lečenja (72).

Takođe, drugi autori GI i GU radijacionu toksičnost dele na akutnu i subakutnu koja se javlja u toku radioterapije, odnosno unutar 3, odnosno 6 meseci, dok se kasna toksičnost ispoljava 6 meseci nakon tretmana i može trajati godinama (73).

1.6.8.2. Kasna radijaciona toksičnost kod karcinoma prostate

Kasna radijaciona toksičnost se javlja nakon završetka radioterapijskog tretmana. U zavisnosti od podataka iz literature, ona se može javiti 3 odnosno šest meseci nakon završenog lečenja radioterapijom, a nekada i posle mnogo godina. Rektalno krvarenje, urinarna oštećenja, erektilna disfunkcija i fibroza su primeri kasne toksičnosti koja može perzistirati dugo nakon tretmana (74).

Simptomi koji se javljaju kao rezultat toksičnosti GI trakta mogu varirati od blažih tegoba poput učestalog pražnjenja creva do znatno ozbiljnijih koji uključuju rektalno krvarenje, bolove u predelu čmara ili pojavu fistule.

Genitourinarna toksičnost se može ispoljiti u vidu učestalog mokrenja, pojave hematurije, dizuričnih smetnji, inkontinencije, strikture uretre. Vaskularna ishemija, celularna destrukcija i edem dovode do proliferacije fibroblasta i oštećenja glatkoće sluznice mokraćne bešike, što za posledicu ima redukciju kapaciteta bešike i obstrukciju lumena uretre (73).

Iako su brojni protokoli koji se koriste u kliničkoj praksi za gradiranje akutne i kasne radijacione toksičnosti, uniformni sistem još uvek nije ustanovljen. Najčešće korišćene šeme za procenu neželjenih efekata radioterapije su EORTC (eng. European Organization for Research and Treatment of Cancer) i RTOG (eng. Radiation Therapy Oncology Group) skala čiji je deo prikazan u tabelama 8 i 9. Procena morbiditeta se vrši na osnovu četiri parametra-SOMA (eng. Subjective, Objective, Management, Analitic) koji se odnose na subjektivne tegobe, objektivne znake bolesti,

način sprovedenog lečenja i analizu funkcije tkiva koje se leči uz pomoć objektivnih dijagnostičkih procedura (75).

Tabela 8: RTOG kriterijumi za akutna radijaciona oštećenja

Organ	Gr I	Gr II	Gr III	Gr IV
Genitourinarni trakt	Učestalo mokrenje i nokturija do 2x češće nego pre tretmana, dizurične smetnje koje ne zahtevaju lečenje	Učestalo mokrenje i nokturija koja nije češća od 1x/1h, dizurija i/ili urgencija, spazam bešike koji zahteva lokalni anestetik	Učestalo mokrenje i nokturija koja je češća od 1x/1h, dizurija, urgencija, spazam bešike, karlični bol koji zahteva analgetike	Hematurija koja zahteva transfuziju, opstrukcija bešike, ulceracije ili nekroza
Gornji gastrointestinalni trakt	Gubitak težine do 5% u odnosu na pre tretmana, mučnina koja ne zahteva antiemetike, abdominalni diskomfor koji ne zahteva lekove	Gubitak težine do 15% u odnosu na pre tretmana, mučnina sa povraćanjem koja zahteva antiemetike, abdominalni bol koji zahteva lekove	Gubitak težine više od 15% u odnosu na pre tretmana, mučnina sa povraćanjem i pored antiemetika, abdominalni bol i pored lekova, hematemeza, melena, abdominalna distenzija	Ileus, perforacija, GI krvarenje koje zahteva transfuziju
Donji gastrointestinalni trakt	Učestale stolice koje ne zahtevaju terapiju, abdominalni diskomfor koji ne zahteva lečenje	Učestale stolice koje zahtevaju terapiju, abdominalni bolovi koji zahtevaju lečenje	Dijareja koja zahteva parenteralnu nadoknadu, pojava krvi i sluzi u stolici, distenzija trbuha	Akutna i subakutna opstrukcija, fistula i perforacija, GI krvarenje koje zahteva transfuziju

Tabela 9. RTOG kriterijumi za kasna radijaciona oštećenja

Organ	Gr I	Gr II	Gr III	Gr IV
Genitourinarni trakt	Minorne telangiectazije, mikroskopska hematurija	Generalizovane telangiectazije, intermitentna makroskopska hematurija	Učestalo mokrenje i dizurija, telangiectazije, često sa petehijama, česta hematurija, kapacitet bešike manji od 150ccm ³	Nekroza, kapacitet bešike manji od 100ccm ³ , ozbiljan hemoragični cystitis
Gastrointestinalni trakt	Blage dijareje, do 5 stolica dnevno blagi grčevi, blago krvarenje i smetnje pražnjenja	Umerene dijareje, više od 5 stolica dnevno, umereno krvarenje	Opstrukcija ili krvarenje koji zahtevaju hirurgiju	Nekroza, perforacija, fistula

S obzirom da većina pacijenata sa lokalizovanim karcinomom prostate ima indolentni tumor sa petogodišnjim preživljavanjem skoro 100%, mora se voditi računa o komplikacijama radioterapije koje značajno mogu narušiti kvalitet života lečenih pacijenata (76).

Brojni su trajali koji pokazuju značaj eskalacije doze za kontrolu tumora (77,78). Verovatnoća nastanka komplikacija od strane okolnih zdravih tkiva takođe raste sa povećanjem doze zračenja.

Zato je tokom planiranja radioterapije neophodno slediti dozna ograničenja okolnih zdravih tkiva koristeći QUANTEC (eng. Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic).

Međutim, postoje pacijenti koji imaju zadovoljavajuće dozimetrijske parametre, a ipak razvijaju radijacionu toksičnost, a sa druge strane, kod određenih pacijenata sa manje povoljnim dozimetrijskim parametrima, radijaciona toksičnost je manje izražena. Iz toga proizilazi da i drugi parametri koji mogu biti od značaja za predikciju razvoja radijacione toksičnosti moraju biti ustanovljeni.

Predpostavlja se da je osnovni mehanizam nastanka radijacione toksičnosti baziran na gubitku stem ćelija i progenitornih ćelija kao i oštećenju vaskularnih endotelnih mikro krvnih sudova.

Smatra se da su oporavak i repulacija stromalnih stem ćelija hronično narušeni nakon primene radioterapije delovanjem slobodnih radikala, reaktivnih oksigenih grupa ili proinflamatornih molekula sa posledičnim oštećenjem tkiva (40).

Kliničari bi trebalo da procene verovatnoću pojave GI i GU oštećenja pre tretmana sa identifikovanjem varijabli koje se mogu korigovati sa ciljem redukovanja razvoja neželjenih efekata radioterapije.

Predikcioni modeli koji uzimaju u obzir dodatne parametre za identifikaciju pacijenata koji imaju veliku verovatnoću za razvoj toksičnosti mogu poslužiti kao esencijalni faktor za primenu personalizovane radioterapije čiji je glavni cilj pored postizanja kontrole bolesti, redukcija komplikacija i unapređenje kvaliteta života (79).

1.7. Potencijalni prediktori radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate

1.7.1. Individualne i kliničke karakteristike kao prediktori radijacione toksičnosti

Faktori koji utiču na radiosenzitivnost su individualni (uzrast, pušački status, konzumacija alkohola i drugi), klinički (stadijum bolesti, prethodne operacije abdomena i male karlice, prisustvo komorbiditeta i drugi) i dozimetrijski parametri. Međutim, samo oni nisu dovoljni za razumevanje mehanizma nastanka radijacione toksičnosti. Jedan od glavnih izazova u savremenoj radioterapiji je identifikacija biomarkera povezanih sa nastankom radijacione toksičnosti i njihova integracija sa individualnim, kliničkim i dozimetrijskim parametrima, u cilju formiranja predikcionih modela radijacione toksičnosti.

1.7.2. Biološki faktori kao prediktori toksičnosti

U savremenoj onkologiji vlada sve veće interesovanje u polju istraživanja bioloških faktora koji mogu uticati na nastanak radijacione toksičnosti. Izmene u nivou citokina mogu biti povezane sa pojavom akutne GI i GU toksičnosti (80,81). Drugi biološki faktori, kao što su nivoi ekspresije različitih gena, nivo miRNK (eng.miRNA) poput miR-21, 146a, 155, SNPs (eng. single nucleotide polymorphisms) u *TGF-β1* (eng. transforming growth factor β1) genu mogu takođe biti povezani sa nastankom radijacione toksičnosti (82).

Održavanje kvaliteta života lečenih pacijenata je od izuzetne važnosti, s obzirom da je karcinom prostate visoko kurabilno oboljenje sa očekivanim dugogodišnjim preživljavanjem (83).

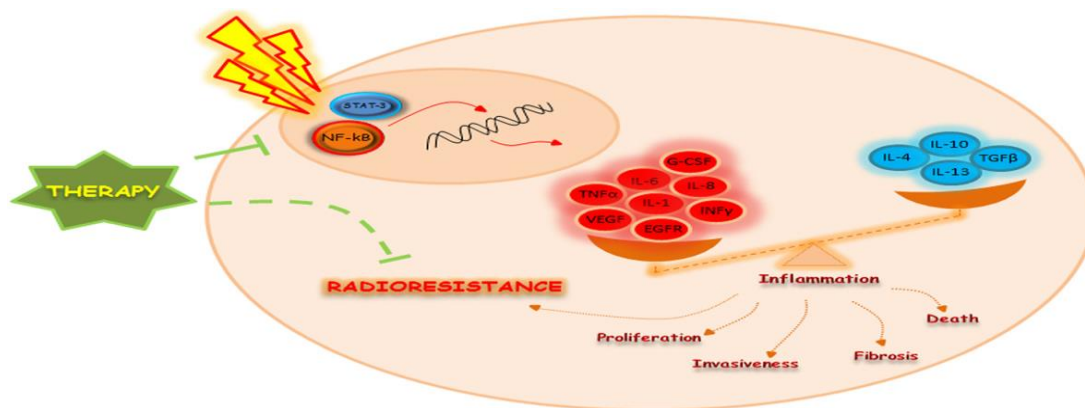
Sa tim u vezi, može se zaključiti da bi ispitivanje većeg broja različitih bioloških faktora trebalo sprovoditi u daljim istraživanjima u cilju procene individualne radiosenzitivnosti.

1.7.2.1. Citokini i njihova uloga u nastanku radijacione toksičnosti

Citokini su hidrosolubilni proteini male molekulske mase koji imaju ulogu u transportu signala između ćelija (84). Oni kontrolišu rast i aktivnost drugih ćelija imunskog sistema i ćelija krvi i na taj način pomažu u nastanku imunskog i inflamacijskog odgovora tela.

Smatra se da oni mogu imati ulogu u patogenezi kancera, ali takođe i u povećanju antikancerskog dejstva slanjem signala koji pomažu da dođe do smrti abnormalnih ćelija i produžavanja života zdravih ćelija. Specifična vrsta citokina, zovu se hemokini. Oni mogu omogućiti imunskim ćeljama da se kreću ka meti. Postoje različite vrste hemokina, uključujući interleukine, interferone, faktore tumorske nekroze i faktore rasta.

Jonizujuće zračenje indukuje ekspresiju velikog broja proinflamatornih i antiinflamatornih citokina i faktora rasta: Faktor tumorske nekroze alfa (eng. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin 1 α (IL-1 α), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), tip I interferon (type I IFN), faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (eng. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor - GM-CSF), Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 5 (IL-5), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 12 (IL-12), Interleukin 18 (IL-18), Transformišući faktor rasta beta (eng. Transforming growth factor β - TGF- β , (slika 18) (85,86).



Slika 18. Imunološki odgovor tkiva na jonizujuće zračenje

Izvor: Di Maggio FM, Minafra L, Forte GI, Cammarata FP, Lio D, Messa C, Gilardi MC, Bravatà V. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J Inflamm (Lond)*. 2015 Feb 18;12:14.(86)

Veliki je interes za identifikovanje biomarkera koji su povezani sa individualnom radiosenzitivnošću. Prema podacima iz literature, Rubin i saradnici bili su među prvima koji su ispitali povezanost nivoa citokina sa toksičnošću izazvane radioterapijom (87). Ekspresija citokina povezana je sa oštećenjem tkiva radioterapijom i inflamacijom i može poslužiti kao indikator toksičnosti ćelije i tkiva tokom radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate (80,86). Smatra se da inflamacija igra ključnu ulogu u odgovoru malignog tkiva na radioterapiju. Studije pokazuju povećanje cirkulišućih nivoa proinflamatornih citokina tokom radioterapije, kao što su IFN- γ , IL-6, TNF- α i IL-4 (88). Pokazano je da postoji razlika u nivou citokina kod pacijenata sa karcinomom prostate u poređenju sa pacijentima sa benignim lezijama u prostati ili kod zdravih pojedinaca, kao i promene u nivoima citokina nakon radioterapije i/ili androgene terapije (89,90). Dirksen i saradnici su pokazali da kod pacijenata sa karcinomom prostate, radioterapija uzrokuje inflamaciju dovodeći do povećanja cirkulišućih nivoa IL-6, IL-8, TNF- α i TGF- β (88). Christensen i saradnici pokazali su značajno povećanje nivoa IFN- γ i IL-6 tokom radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate

(80). Takođe su pokazali da su povišeni nivoi IL-1 i IL-2 povezani sa razvojem genitourinarne i gastrointestinalne toksičnosti prostate **(80).**

Ubrzo nakon izloženosti tkiva zračenju, dolazi do oslobađanja brojnih citokina sa posledičnim nastajanjem inflamatornog odgovora i potencijalnim oštećenjem tkiva. Produkcija citokina javlja se brzo nakon ozračivanja tkiva sa pikom unutar 4-24h, dok se nakon 24h-nekoliko dana vraća na bazalni nivo **(91).**

Budući da se smatra da inflamacija leži u osnovi nastanka akutne radijacione toksičnosti, može se zaključiti da inflamatorni faktori poput citokina kao što su IL-1, TGF- β , IL-2, IL-6, IL-8 i IFN- γ mogu imati značajno mesto u pojavi GI i GU toksičnosti kod pacijenata koji se leče radioterapijom.

Stoga određivanje nivoa citokina u serumu pacijenata tokom radioterapije može imati kliničku vrednost u predikciji radiosenzitivnosti zdravih tkiva sa težnjom ka personalizovanom pristupu u radioterapiji.

Među brojnim citokinima koji se oslobađaju ubrzo nakon ekspozicije tkiva radioterapiji, IL-1, IL-6, TNF i TGF- β 1 značajni su citokini koji su uključeni u odgovor kože, pluća i mozga na jonizujuće zračenje **(40).**

Transformišući faktor rasta β 1, koji proizvode endotelne i hematopoetske ćelije, kodiran je od strane *TGF- β 1* gena. On kontrološe različite procese u ćeliji, uključujući angiogenezu, diferencijaciju, imunski odgovor **(92).** Smatra se da je TGF- β 1 važan medijator fibroze koji stimuliše fibroblaste da generišu ekstraćelijski matriks i angažuju inflamatorne ćelije. Čak i u malim dozama, radioterapija se smatra značajnim spoljašnjim faktorom koji aktivira TGF- β 1. Viši nivo TGF- β 1 povezan je sa višim stepenom fibroze nakog radioterapije torakalne i abdominopelvične regije **(93).** Vezivanje TGF- β 1 za komplekse receptora tipa I/II dovodi do aktivacije Smad proteina. Smad proteine čini familija strukturno sličnih proteina koji su uključeni u signalne puteve TGF- β superfamilije koji su važni za regulisanje ćelijskog rasta i razvoja. Skraćenica Smads, odnosi se na homologe *Caenorhabditis elegans* Sma i "mothers against decapentaplegic" (Mad) familiju gena u *Drosophili* (*Drosophila*). Smatra se da je aktivacija Smad 3 povezana sa razvojem radijacijom indukovane fibroze **(94).** Rezultati različitih studija ukazuju da IL-6 i TGF- β 1 mogu imati ulogu u pojavi akutne genitourinarne toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom. Pokazano je da prethodne hirurške intervencije mogu imati udela u razvoju radijacione toksičnosti daleko od mesta operativnog reza, upravo preko TGF- β 1 **(95).**

Literaturni podaci ukazuju da je IL-6 jedan od najznačajnijih imunskih markera za predikciju radioterapijom indukovane toksičnosti normalnih tkiva **(96,97).**

Promene u nivoima proinflamatornih citokina nisu povezane samo sa radijacijom indukovanom toksičnošću, već i sa odgovorom na radioterapiju. Smatra se da su viši nivoi IL-6 povezani sa agresivnijim rastom tumora i većom rezistencijom na radioterapijski tretman. Imajući to u vidu, terapijske modulacije ovog citokina mogle bi da povećaju radioterapijsku senzitivnost tumora **(98).**

Faktor nekroze tumora (TNF), primarno produkovan od strane aktiviranih makrofaga, ali i drugih hematopoetskih i nehematopoetskih ćelija, jeste citokin koji ima ulogu u nastanku akutne i hronične inflamacije. Povećanje nivoa TNF pored IL-1 prouzrokuje značajne akutne reakcije na koži, dok IL-1 ima značajnu ulogu u nastanku inflamatornog odgovora **(99).** U prekliničkim studijama pokazano je da TNF inhibitori mogu redukovati radijacijom indukovano oštećenje kože kod miševa **(100).**

Neki citokini mogu biti napravljeni u laboratoriji i koristiti se u terapiji kancera. Drugi se mogu koristiti za prevenciju i rešavanje neželjenih dejstava hemioterapije. Mogu se aplikovati subkutano, intramuskularno, intravenski. Najčešće korišćeni su interleukini i interferoni. Interleukini deluju kao hemijski signali između belih krvnih zrnaca. Tako Interleukin 2 (IL-2) pomaže ćelijama imunskog sistema da rastu i da se brže dele. Verzija IL-2 napravljena u laboratoriji, odobrena je za lečenje uznapredovalog karcinoma bubrega i metastatskog melanoma. IL-2 može biti korišćen kao samostalni lek u lečenju ovih maligniteta, ili može biti kombinovan sa hemioterapijom ili sa drugim citokinima kao što je Interferon alfa (IFN- α). Interferoni pomažu telu da se odupre virusima i kanceru.

Postoji Interferon alfa, beta i gama (IFN- α , IFN- β , IFN- γ). Jedino IFN- α može biti korišćen za tretman kancera. On može povećati sposobnost imunih ćelija u borbi protiv ćelija kancera, bilo da direktno uspori rast ćelija kancera ili preko krvih sudova koji su neophodni za rast tumora.

1.7.2.2. Mikro RNK i njihova uloga u nastanku radijacione toksičnosti

Mikro RNK (eng. miRNA) pripadaju grupi malih, nekodirajućih RNK prigušivača, uključenih u translacionu represiju gena. Njihova osnovna uloga je da interferiraju sa informacionom RNK čime se utišava translacija RNK u proteine. One su stabilne u različitim biološkim uzorcima, kao što su plazma i serum, pod odgovarajućim uslovima i mogle bi biti korišćene kao efikasan dijagnostički marker iz telesnih tečnosti **(101)**. Mikro RNK molekuli su kodirane od strane mikro RNK gena lokalizovanih u intronima ili egzonomima kodirajućih gena **(102)**. Njih obično čini 21-25 nukleotida i one kontrolišu mnoge biološke funkcije kao što je diferencijacija, programirana ćelijska smrt po tipu apoptoze, angiogeneza, proliferacija, ćelijski ciklus, metabolizam, time što regulišu gensku ekspresiju na posttranskripcionom nivou **(103)**. Kada "seed" region molekula miRNK 'pronađe' inkompletnu komplemetarnu sekvencu u 3'netranslatirajućem regionu informacione RNK (eng. 3'-untranslated region- 3'UTR), to dovodi do translacione represije ili degradacije informacione RNK. Kao rezultat tog procesa, translacija i sinteza proteina prestaju **(104)**. Promene u nivou miRNK uzrokuju promene u nivoima proteina, dovodeći do razvoja brojnih fizioloških i patofizioloških procesa, uključujući malignu transformaciju. Kako je maligna transformacija složen proces, različite miRNK su značajne za različite faze razvoja i progresije kancera. Mikro RNK imaju mogućnost da utišavaju bilo tumor supresore ili onkogene ili jedna miRNK može imati dualnu ulogu **(105,106)**.

Određivanju profila ekspresije mikroRNK molekula pridaje se sve više važnosti zbog njihove koristi u dijagnostici, određivanju stadijuma bolesti, prognozi i odgovoru na terapiju kod pacijenata obolelih od karcinoma prostate. Mikro RNK imaju, dakle, potencijal da budu indikatori, budući biomarkeri kod donošenja odluke o lečenju, prediktori neželjenih efekata terapije (hemio i/ili radioterapije), mogu poslužiti kao terapijske mete ili pak i same mogu biti terapeutici **(107)**.

Aberantno eksprimirana miRNK, bilo u smislu povećane ili smanjene ekspresije, može poremetiti ekspresiju nekoliko informacionih RNK molekula i proteina i može biti uključena u patogenezu različitih karcinoma u humanoju populaciji **(108,109,110)**. Neravnoteža u nivou proteina uključenih u imunski odgovor uzrokuje inflamaciju u ozračenoj regiji. Odgovor na radioterapiju i nastanak radijacione toksičnosti su individualni procesi, što upućuje da je personalizovan pristup u radioterapiji od izuzetnog značaja kod pacijenata koji se tretiraju ovim modalitetom lečenja.

Mikro RNK mogu delovati kao protoonkogeni, ali i kao tumor supresorni geni, odnosno neke od njih mogu stimulisati proliferaciju tumorskih ćelija i angiogenezu, dok druge ove procese mogu inhibirati. Mikro RNK-34a može se smatrati tumor supresorom, jer je njena ekspresija u malignim bolestima često snižena **(111)**. miR-146 i miR-155 su imunomodulatorni miRNK molekuli. Njihova ekspresija je često uključena u imuski odgovor. miR-146a i miR-155 pokazuju pojačanu ekspresiju u odgovoru na različite inflamatorne stimulse i ona može biti indukovana od strane TNF, IL-1, IFN i Toll-like receptor (TLR) liganda u različitim tipovima ćelija, monocitima i T i B limfocitima **(112)**.

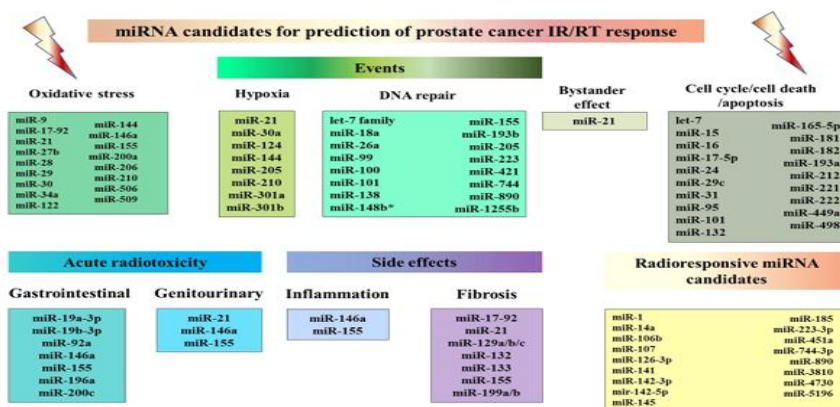
miR-21 je onkogeni miRNK (eng. oncomiR) koja je pojačano eksprimirana u brojnim malignim oboljenjima u humanoju populaciji **(113)**. Ona uslovljava proliferaciju i invazivnost ćelija karcinoma prostate, uključena je u apoptozu **(114)** i dokazana je kao radiosenzitivna miRNK **(115,116)**. miR-21 ima sposobnost da redukuje radiosenzitivnost malignih ćelija **(117)**, te bi redukcija nivoa miR-21 mogla biti od značaja za povećanu senzitivnost tumora na radioterapiju **(118)**. miR-21 je okarakterisana kao induktor radiorezistentnosti kod tumora dojke **(119)**.

Mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. peripheral blood mononuclear cells-PBMCs) predstavljaju značajan izvor različitih miRNK molekula **(120)**. Postoji hipoteza da određivanje profila miRNK može povećati šansu za predikciju razvoja radijacione toksičnosti **(121)**.

Brojne su studije koje su ispitivale izmene nivoa miRNA u tkivima i ćelijama tumora kao i u plazmi i serumu kao odgovor na radioterapiju i pratile njihovu povezanost sa nastankom neželjenih efekata radioterapije **(121,122,123)**.

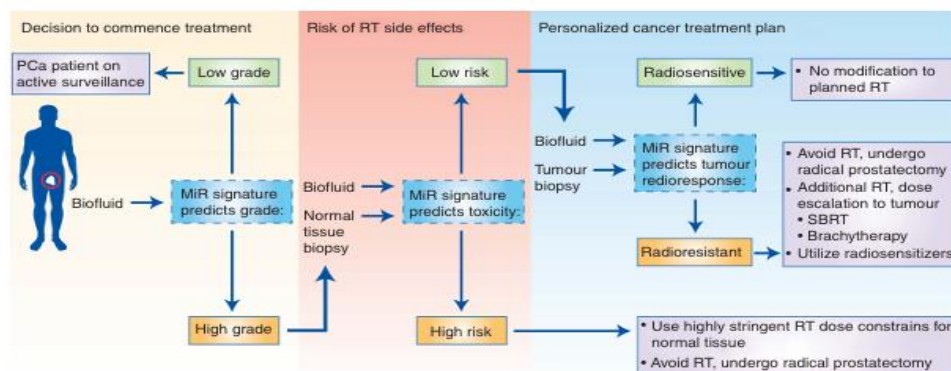
Izmene nivoa miRNK mogle bi imati veliki potencijal da posluže kao vodič kliničarima kako da modifikuju radioterapijsko planiranje ili da ga kombinuju, odnosno zamene sa drugim standardnim modalitetima lečenja, ukoliko je potrebno (121).

Na slici 19 prikazani su potencijalni kandidati mikroRNK za predikciju odgovora na radioterapiju i nastanak radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate (102), a na slici 20 i šematski prikaz vodiča, potencijalno primenljivog u kliničkoj praksi za personalizovano planiranje lečenja pacijenata obolelih od karcinoma prostate.



Slika 19. MikroRNK kandidati za predikciju odgovora na radioterapiju i nastanak toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate.

Izvor: Petrović N, Stanojković TP, Nikitović M. MicroRNAs in Prostate Cancer Following Radiotherapy: Towards Predicting Response to Radiation Treatment. *Curr Med Chem.* 2022;29(9):1543-1560.(102)



Slika 20. Predloženi vodič za personalizovan pristup radioterapiji u lečenju karcinoma prostate pomoću mikroRNK panela.

Izvor: Korpela E, Vesprini D, Liu SK. MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador? *Br J Cancer.* 2015 Mar 3;112(5):777-82. doi: 10.1038/bjc.2015.6. Epub 2015 Jan 22.(121)

Korišćenje ovih panela, može imati značaj u kliničkoj praksi za prevođenje pacijenata koji su pod aktivnim praćenjem na aktivni vid lečenja. Takođe, na osnovu mikroRNK panela, moguće je odrediti pacijente koji su pod većim rizikom za nastanak radijacione toksičnosti kao i one koji zahtevaju eskalaciju doze zračenja ili drugu modifikciju tretmana zbog radiorezistencije.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati prediktivne vrednosti individualnih karakteristika (uzrast, pušački status, konzumacija alkohola) osoba sa adenokarcinomom prostate u grupi radikalno zračenih i u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili Salvage zračna terapija za rizik za nastanak simptoma GU i GI toksičnosti.
2. Ispitati prediktivne vrednosti kliničkih karakteristika (stadijum bolesti, prethodne operacije abdomena i male karlice i prisustvo komorbiditeta) osoba sa adenokarcinomom prostate u grupi radikalno zračenih i u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili Salvage zračna terapija za rizik za nastanak simptoma GU i GI toksičnosti.
3. Ispitati prediktivne vrednosti dozimetrijskih parametara terapijskog plana (V50, V60, V65, V70, V72) i srednje i maksimalne doze na rektum i mokraćnu bešiku u osoba sa adenokarcinomom prostate u grupi radikalno zračenih i u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili Salvage zračna terapija za rizik za nastanak simptoma GU i GI toksičnosti.
4. Ispitati povezanost nivoa IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN-gama i TGF- β u serumu bolesnika sa adenokarcinomom prostate pre, tokom i nakon završetka radioterapije i nastanka akutne GU i GI toksičnosti u grupi radikalno zračenih i u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili Salvage zračna terapija.
5. Ispitati prediktivne vrednosti različitih vrsta mikroRNK u osoba sa adenokarcinomom prostate u grupi radikalno zračenih i u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili Salvage zračna terapija na rizik za nastanak simptoma akutne GU i GI toksičnosti.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Selekcija pacijenata

Istraživanje je bilo dizajnirano po tipu prospektivne, kohortne studije u koju je uključeno 90 pacijenata sa patohistološki potvrđenim adenokarcinomom prostate koji su lečeni u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Klinika za radiološku onkologiju i dijagnostiku od januara 2016. do februara 2020. godine, a koji su ispunjavali kriterijume za uključivanje u istraživanje. Za sprovođenje istraživanja dobijeno je odobrenje Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, broj 3348/1-01 kao i odobrenje Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanje je sprovedeno sledeći principe Helsinške deklaracije. Pacijentima su pre uključivanja u istraživanje detaljno objašnjeni principi istraživanja i svaki od njih je svojom voljom potpisao informisani pristanak u dva primerka, od kojih je jedan primerak dat pacijentu, dok je drugi sačuvan u dokumentaciji za istraživanje.

Kriterijume za uključivanje u studiju ispunjavali su pacijenti koji u trenutku postavljanja dijagnoze nisu imali potvrđenu lokoregionalnu proširenost bolesti (T3 i T4, N1 stadijum), niti metastatsku bolest (M1 stadijum), verifikovane dostupnim dijagnostičkim metodama (CT ili MR pregled abdomena i karlice, RTG/CT toraksa, scintigrafija skeleta), a takođe je uslov bio da nisu lečeni neoadjuvantnom niti konkomitantnom hormonoterapijom.

Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su pacijenti za koje su postojali podaci da su u trenutku dijagnoze imali inicijalno lokoregionalnu proširenost bolesti (T3 i T4 stadijum), ili N1 ili M1 stadijum bolesti, kao i oni koji su lečeni hormonskom terapijom.

Od 90 uključenih pacijenata koji su ispunjavali kriterijume za uključivanje, njih 51 činili su pacijenti sa inicijalno lokalizovanim stadijumom bolesti koji su lečeni radikalnom radioterapijom, savremenim radioterapijskim tehnikama, 3D konformalnom radioterapijom (3D-CRT) ili Volumetrijski modulisanom Ark terapijom (VMAT), koji nisu primali neoadjuvantnu ili konkomitantnu hormonoterapiju. Propisana doza bila je 72 Gy u 36 frakcija, dužina trajanja zračne terapije bila je 7 nedelja i 1 dan. Preostali broj bolesnika (njih 39) činili su pacijenti sa inicijalno lokalizovanim stadijumom bolesti koji su lečeni operativno, radikalnom prostatektomijom, a zračna terapija sprovedena je postoperativno, bilo kao adjuvantna, bilo kao Salvage zračna terapija. Propisana doza bila je 66 Gy u 33 frakcije, dužina trajanja zračne terapije bila je 6 nedelja i 3 dana.

3.2. Ispitivane varijable i instrumenti merenja

Ispitivane su individualne, kliničke i terapijske karakteristike, zatim određeni nivoi citokina u serumu, nivoi mikro RNK u limfocitima pacijenata, kao i uticaj ovih parametara na razvoj akutne i kasne genitourinarne (GU) i gastrointestinalne (GI) radijacione toksičnosti.

Akutna i kasna radijaciona toksičnost ispitivana je primenom RTOG/EORTC kriterijuma (eng. RTOG/EORTC Acute and Late Radiation Morbidity Scoring Criteria) modifikovanih po Peeters-u. Prema Peeters-u i saradnicima akutnom radijacionom toksičnošću smatrana je ona koja se javila unutar 120 dana od početka radioterapije, dok se kasnom toksičnošću smatrala ona koja se javila nakon tog vremena.

Akutna toksičnost bila je ispitivana jednom nedeljno tokom sprovođenja zračne terapije, a kasna toksičnost na redovnim kontrolama nakon završene zračne terapije, po sledećoj dinamici:

- tokom prve godine nakon terapije: svaka 3 meseca
- tokom druge godine nakon terapije: svaka 4 meseca
- tokom 3-5 godina nakon terapije: svakih 6 meseci
- posle 5 godina nakon terapije: jednom godišnje

U zavisnosti od težine simptoma i akutna i kasna radijaciona toksičnost gradirane su u 4 gradusa. Upitnik koji je popunjavao od strane pacijenata tokom sprovođenja radioterapije prikazan je na **slici 21**.

Akutna GI toksičnost

Gr I

- Promene u navikama pražnjenja creva – veći broj stolica ili promena konzistencije stolice koje ne zahtevaju lečenje
- rektalni diskomfor
- bolovi koji ne zahtevaju analgetike

Gr II

- dijareja koja zahteva parasimpatikolitike – Loperamid
- pojava sluzavih stolica koje se mogu kontrolisati
- bol koji zahteva analgetike

Gr III

- dijareja koja zahteva nadoknadu infuzionim rastvorima
- obilne sluzave ili sukrvičave stolice koje izazivaju inkontinenciju – potrebno nošenje higijenskih uložaka
- meteorizam praćen distendiranim crevima na nativnom RTG abdomena

Gr IV

- GI krvarenje koje zahteva transfuziju
- abdominalni bolovi ili tenezmi koji zahtevaju hirurško lečenje i rasteretnu kolostomu
- obstrukcija
- fistula
- perforacija creva

Akutna GU toksičnost

Gr I

- učestalost mokrenja i noćnog mokrenja 2x veća u odnosu na učestalost pre početka RT
- dizurija ili urgencija koja ne zahteva medikamentnu terapiju

Gr II

- učestalost mokrenja na >1h (danju 12-16, a noću 5-8 puta)
- dizurija, urgencija, spazmi koji zahtevaju lokalne anestetike

Gr III

- učestalost mokrenja na ≤1h (danju više od 16, a noću više od 8 puta)
- dizurija, urgencija, spazmi koji zahtevaju redovno davanje opijata
- makroskopska hematurija
- tegobe koje zahtevaju permanentni ili suprapubični kateter

Gr IV

- krvarenje koje zahteva transfuziju
- opstrukcija urinarnih puteva koja nije izazvana koagulumima
- ulceracija
- nekroza

Slika 21. RTOG/EORTC skala akutne gastrointestinalne (GI) i genitourinarne (GU) toksičnosti

Individualne karakteristike koje su ispitivane, podrazumevale su starost pacijenta, pušački status i konzumaciju alkohola.

Kliničke karakteristike uključivale su stadijum bolesti, rizičnu grupu pacijenta, prisustvo komorbiditeta poput Dijabetes melitusa, hipertenzije kao i prethodne operacije u abdomenu i karlici.

Terapijske karakteristike su se odnosile na tip radioterapije (radikalna ili postoperativna), tehniku zračenja (3D-CRT ili VMAT tehnika), kao i dozimetrijske karakteristike.

Ispitivani dozimetrijski parametri radioterapijskog plana bili su srednja i maksimalna doza koju su primili mokraćna bešika i rektum, kao i V50, V60, V65, V70, i V72 (tj volumeni mokraćne bešike i rektuma izraženi u procentima koji su primili dozu od 50 Gy, 60 Gy, 65 Gy, 70 Gy i 72 Gy). Navedeni podaci dobijeni su očitavanjem sa krive odnosa doze i volumena (eng. Dose Volume Histogram-DVH).

Biomarkeri koji su praćeni bili su citokini (IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ i TGF- β 1), a njihove koncentracije u serumu određivane su ELISA testom (eng. Enzyme-linked immunosorbent assay).

Drugi ispitivani biomarkeri bili su određene vrste mikroRNK: miR-21, miR-146a, miR-155, dok je merenje nivoa ekspresije mikro RNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi vršeno metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (qRT-PCR).

3.3. Istraživanje na prvoj grupi ispitanika

3.3.1. Selekcija pacijenata

U okviru ovog istraživanja, najpre je vršeno ispitivanje mogućeg kliničkog značaja veze između individualnih, kliničkih i bioloških faktora i rizika za nastanak akutne radijacione toksičnosti na uzorku od 44 pacijenta sa patohistološki potvrđenim adenokarcinomom prostate, koji su lečeni 3D konformalnom radioterapijom (3D-CRT) u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije od januara 2016. do avgusta 2017. god. Od ukupnog broja ovih pacijenta, kod njih 21 sprovedena je radikalna radioterapija, dok je postoperativna radioterapija sprovedena kod 23 pacijenta, bilo kao adjuvantna (unutar 6 meseci od operacije) ili Salvage zračna terapija (usled biohemijskog relapse bolesti ili pojave lokalnog recidiva).

3.3.2. Ispitivanje akutne radijacione toksičnosti i kvaliteta života

Akutna radijaciona toksičnost ispitivana je na osnovu sistema skorovanja Radioterapijske onkološke grupe i Evropske organizacije za istraživanje i terapiju raka (RTOG/EORTC kriterijumi) modifikovanog po Peeters-u. Podaci za akutnu radijacionu GI i GU toksičnost dobijane su popunjavanjem upitnika na redovnim kontrolama u toku zračenja, nakon svakih 5 frakcija, na poslednjoj frakciji kao i na prvoj kontroli, odnosno mesec dana po završenom radioterapijskom lečenju.

Takođe su popunjavani EPIC upitnici (eng. The Expanded Prostate Cancer Index Composite), koji su se odnosili na detaljan opis prisutnih simptoma od strane gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta kao i na individualne i kliničke karakteristike za svakog pacijenta (124).

3.3.3. Planiranje i sprovođenje zračne terapije

Pacijenti koji su bili uključeni u ovo istraživanje, bili su tretirani 3D CRT, sledeći protokol Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (95).

Pacijenti kod kojih je sprovedena radikalna radioterapija, u zavisnosti od procenjenog rizika za infiltraciju semenih vezikula i limfnih čvorova prema Roach formuli, podeljeni su u tri grupe: 1. Pacijenti kojima je ozračena samo prostata (eng. Prostate-only group-P), ukoliko je procenjeni rizik

za infiltraciju semenih vezikula <15% ; 2. Pacijenti kojima je ozračena prostata i semene vezikule (eng. Prostate and seminal vesicle group (P+SV)) ukoliko je procenjeni rizik za infiltraciju semenih vezikula >15%; 3. Pacijenti kojima je ozračen ceo pelvis (eng. Whole pelvic radiotherapy-WPRT), ukoliko je rizik za infiltraciju limfatika >15%. CTV i PTV volumeni delineirani su sledeći preporuke ICRU 50 i ICRU 62 (**50,51**).CTV je uključio celu prostatu, CTV 1 podrazumevao je prostatu i cele semene vizikule, a CTV In podrazumevao je delineaciju ispod bifurkacije a.iliace communis sa marginom od 7 mm oko krvnog suda. Margina za PTV i PTV 1 iznosila je 10 mm u svim pravcima, izuzev posteriorno gde je iznosila 8 mm. Margina na PTV3, tj.na prostatu, kada se radioterapija sprovodi u 3 faze, iznosila je 5 mm. Zračna terapija sprovedena je standardnim režimom fracionisanja, 5 dana u nedelji, sa dnevnom dozom 2 Gy i ukupnom propisanom dozom od 72Gy u 36 frakcija. Dozna ograničenja organa od rizika sledila su Quantec preporuke (**55**).

Ukoliko je zračna terapija sprovedena u 1 fazi (P grupa pacijenata), propisana doza je iznosila 72 Gy na prostatu sa odgovarajućom marginom. Ako je sprovedena u dve faze (P+SV grupa), na prvi volumen (PTV1) propisana je doza 66 Gy, a na drugi (PTV2), doza od dodatnih 6 Gy. U slučaju sprovedenja zračne terapije u 3 faze (WPRT), na PTV1 propisana doza iznosila je 44 Gy, na PTV2 22 Gy, a na PTV 3 dodatnih 6 Gy. U svim fazama, dnevna doza bila je 2 Gy, 5 dana nedeljno.

Pacijenti kod kojih je sprovedena adjuvantna ili salvage zračna terapija, ukoliko je pN status bio N0, primili su dozu na volumen koji je uključio ložu prostate +/- SV. U slučaju pN statusa Nx i N1 propisana doza iznosila je 44 Gy na volumen koji je uključio regionalne limfatike, ložu prostate +/-SV), a potom još 22 Gy na volumen koji je obuhvatio ložu prostate +/-SV. Volumen semenih vezikula, bio je uključen u slučaju pT3b stadijuma bolesti. Ukupno propisana doza kod pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili salvage zračna terapija, iznosila je 66 Gy u 33 frakcije. Provera preciznosti zračenja, vršena je jednom nedeljno, po potrebi i češće pregledom portala.

3.3.4. Određivanje koncentracije citokina u serumu

Inflamatorni markeri koji su ispitivani bili su sledeći citokini: IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ i TGF β 1. Za ispitivanje koncentracije ovih citokina uzimani su uzorci krvi u nekoliko tačaka i to po 10 ml krvi bez antikoagulansa za svaku tačku praćenja. Dobijeni uzorci bili su poslani u Laboratoriju za modifikatore biološkog odgovora, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, a vremenski interval od uzimanja uzorka do obrade nije smeo prelaziti 45 minuta. Uzorci krvi su držani 30 min na sobnoj temperaturi, a zatim su centrifugirani 10 min na 2000 rpm kako bi se izolovao serum, koji je alikvotiran u više manjih tuba i zamrznut do dalje analize.

Određivanje koncentracije ovih citokina vršeno je pomoću komercijalnih neobloženih ELISA testova (Invitrogen). Koncentracije citokina određivane su po sledećoj dinamici: pre radioterapije, nakon 5, 15 i 25 frakcije, nakon poslednje frakcije, odnosno poslednjeg dana tretmana i na prvoj kontroli, odnosno mesec dana po završetku zračnog tretmana. Ovako intenzivan plan bio je dizajniran da verifikuje inicijalni inflamatorni odgovor i nastanak simptoma akutne toksičnosti.

Polistirenske mikrotitarske ploče sa 96 bunarića bile su obložene odgovarajućim vezujućim antitelima specifičnim za odgovarajući citokin u puferu za oblaganje (dodato po 100 μ l rastvora) i inkubirane su tokom noći na 4°C. Ploče su potom isprane i dodato je po 200 μ l ELISA/ELISAPOT rastvora kao blokera, kako bi se blokirala nespecifična mesta vezivanja. Nakon 1h inkubacije, ploče su ponovo isprane, a uzorci seruma i standardi dodati su u bunariće (po 100 μ l, te su ploče inkubirane preko noći na 4°C, kako bi se postigla maksimalna senzitivnost. Posle ispiranja i aspiracije, dodato je po 100 μ l rastvora antitela za detekciju specifičnog citokina u svaki bunarić i usledila je inkubacija u trajanju od 1h. Nakon toga, ploče su isprane i aspirirane, dodato je po 100 μ l rastvora konjugata avidina i peroksidaze rena (eng. Horseradish Peroxidase, HRP) u bunariće i uzorci su inkubirani 30 minuta. Ploče su potom isprane i u svaki bunarić je dodato po 100 μ l rastvora 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, koji je korišćen kao supstrat za detekciju, nakon čega je sledila inkubacija od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Enzimaska reakcija je prekinuta dodavanjem 50 μ l rastvora sumporne kiseline u sve uzorke. Absorbancija je merena na talasnoj dužini od 450 nm primenom

spektrofotometra Multiskan EX Termo Labsystems. Uzorci seruma rađeni su u duplikatu. Koncentracije citokina su očitane sa standardne krive i predstavljene u pg/ml.

3.4. Istraživanje na drugoj grupi ispitanika

Na osnovu rezultata koji su dobijeni u prvoj grupi pacijenata, nastavljeno je istraživanje u grupi od novih 39 pacijenata sa patohistološki potvrđenim adenokarcinomom prostate lečenih u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije od oktobra 2017. do februara 2020. godine. Od svih uključenih pacijenata, njih 27 bilo je tretirano 3D konformalnom radioterapijom (3D-CRT), a kod preostalih 12 pacijenata bila je sprovedena Volumetrijski modulirana lučna terapija (engl. Volumetric Modulated Arc Therapy-VMAT). Radikalna radioterapija sprovedena je kod 26 pacijenata, dok je 13 pacijenata primilo postoperativnu zračnu terapiju.

Kao i u prethodnom istraživanju, istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije broj 3348/1-01 i Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanje je sprovedeno prema principima Helsinške deklaracije, a pre uključivanja pacijenata u studiju, dobijen je njihov informisani pristanak.

Takođe, prikupljeni su isti individualni, klinički i podaci vezani za zračnu terapiju kao i u prethodnoj grupi pacijenata, a praćen je i njihov uticaj na nastanak simptoma akutne i kasne GU i GI toksičnosti kao i na nastanak zamora.

Akutna i kasna GU i GI toksičnost ispitivana je, kao u prethodnom istraživanju, na osnovu RTOG/EORTC kriterijuma modifikovanim po Peetersu i to: akutna toksičnost jednom nedeljno tokom sprovođenja radioterapijskog tretmana i na prvoj kontroli, odnosno mesec dana po završenom zračenju, dok je kasna toksičnost ispitivana na redovnim kontrolama po sledećoj dinamici: na 3, odnosno 4 meseca u prvoj, odnosno drugoj godini nakon sprovedene radioterapije, a potom na 6 meseci. Statistika je rađena za period praćenja od 30 meseci, ali je praćenje i dalje u toku i nakon 5 godina od sprovedenog lečenja, popunjavanje upitnika za kasnu GU i GI toksičnost vršiće se jednom godišnje. Takođe je za sve pacijente određivan maksimalan gradus akutne i kasne GU i GI toksičnosti. Na redovnim kontrolama je, pored ispitivanja toksičnosti, pacijent dostavljao i nov nalaz PSA kao i druge dijagnostičke izveštaje zavisno od indikacija.

Za merenje kvaliteta života ovih pacijenata koji se odnose na genitourinarne i gastrointestinalne simptome, kao i u prethodnom istraživanju, korišćen je EPIC upitnik (eng. The Expanded Prostate Cancer Index Composite) (124).

Ispitivanje umora, vršeno je koristeći upitnike (The Brief Fatigue Inventory-BFI) gde je stepen umora gradiran na skali od 0-10, a u zavisnosti od skora, umor je klasifikovan kao blag (skor od 1-4), srednji (skor od 5-6) i težak (skor 7-10).

Radioterapijski tretman kod ovih pacijenata sproveden je 3D-CRT ili VMAT tehnikom, po istim principima kao u prvom delu istraživanja, sledeći protokol Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, a delineacija ciljnih volumena sledila je preporuke ICRU 50, ICRU 62 i ICRU 83 (eng. International Commission on Radiation Units and Measurements) (50,51,52). Bez obzira na tehniku radioterapije koja je primenjena (3D-CRT ili VMAT), pacijenti kod kojih je sprovedena radikalna radioterapija, primili su dozu 72 Gy u 36 frakcija, a kod postoperativne radioterapije, doza je iznosila 66 Gy u 33 frakcije, standardnim režimom fracionisanja, 2 Gy dnevno, 5 dana u nedelji. Dozna ograničenja organa od rizika sledila su Quantec preporuke (55).

3.4.1. Određivanje koncentracije IL-6 i TGF- β 1 u serumu

Koncentracije IL-6 i TGF- β 1 u serumu pacijenata određivane su komercijalnim ELISA testovima, prema protokolu proizvođača (Quantikine[®] Elisa Human IL-6 i Human TGF- β 1 Immunoassays, R&D Systems). Koncentracije IL-6 i TGF- β 1 određivane su pre započinjanja radioterapije i nakon 25. frakcije zračenja, na sličan način kao i u prethodnom istraživanju. Uzorci seruma pacijenata i razblaženja standarda dodati su u bunariće 96-well polistirenske mikrotitarske ELISA ploče koji su obloženi antitelima koja će vezati odgovarajući citokin iz uzorka, nakon

dodavanja rastvora za razblaživanje (eng. Assay Diluent), nakon čega su uzorci inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi. Ploče su zatim isprane i rastvor konjugata koji sadrži antitelo specifično za IL-6 ili TGF- β 1 je dodato u bunariće ploča. Nakon inkubacije od 2 h na sobnoj temperaturi, ploče su isprane i nakon aspiracije pufera za ispiranje dodat je rastvor supstrata (TMB). Ploče su zatim inkubirane 30 min u mraku na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodat rastvor kiseline za prekidanje enzimske reakcije.

Absorbancija je merena na talasnoj dužini od 450 nm primenom spektrofotometra Multiskan EX Termo Labsystems. Uzorci seruma rađeni su u duplikatu. Koncentracije IL-6 i TGF- β 1 očitavane su sa standardnih kriva i predstavljene u pg/ml.

3.5. Određivanje ekspresije mikroRNK

Sledeći pretpostavke da genetski i epigenetski mehanizmi, među kojima su izmene u nivoima ekspresije mikroRNK (miRNK), mogu biti povezane sa nastankom radijacione toksičnosti i odgovora na radioterapiju, sprovedena je pilot studija na uzorku od 15 pacijenata sa adenokarcinomom prostate lečenih u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije 3D konformalnom radioterapijom bilo u definitivnom (72 Gy u 36 frakcija) ili postoperativnom pristupu (66 Gy u 33 frakcije) u periodu od aprila 2016. do aprila 2017.godine. Ispitivana je potencijalna veza između izmena ekspresije miR-21, miR-146a i miR-155 i nastanka GU toksičnosti.

Detalji studije jasno su objašnjeni svakom pacijentu koji je dao svoj potpisani pristanak za uključivanje u istraživanje, a studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (broj3348/1-01) kao i Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Analize su vršene iz uzoraka krvi pacijenata pre radioterapije, neposredno nakon poslednje frakcije terapije, i na prvoj kontroli, odnosno mesec dana po završetku radioterapije. Iz uzoraka pune periferne krvi sa antikoagulansom (EDTA) izolovane su mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) centrifugiranjem u gradijentu gustine pomoću medijuma za separaciju (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich). Izolacija PBMC je izvedena na niskoj temperaturi (4°C), a uzorci ćelija su nakon izolacije čuvani na -80°C za dalje analize. Ukupna RNK je izolovana iz uzoraka PBMC pacijenata primenom Trizola (TRI Reagent® Sigma) prema uputstvu proizvođača. Nakon dodavanja Trizola, uzorci PBMC su lizirani mehaničkim pipetiranjem, nakon čega je dodat hloroform. Uzorci su centrifugirani 15 min na 11000 rpm na 4°C, tako da je došlo do razdvajanja tri faze: donja organska faza u kojoj se nalaze proteini, međufaza u kojoj se nalazi DNK i gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNK. Nakon toga izvršena je precipitacija RNK izopropanolom i centrifugiranjem 10 min na 11000 rpm na 4°C. RNK talog je zatim ispran, osušen, rastvoren u sterilnoj destilovanoj vodi sa dietilpirokarbonatom (DEPC), i zamrznut na -80°C do daljih analiza.

Od polazne totalne ćelijske RNK (10 ng) reverznom transkripcijom primenom kita za reverznu transkripciju (TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) sintetisana je komplementarna DNK od mikro RNK primenom specifičnih prajmera sa petljom (eng. stem-loop). Uzorci ciljnih mikro RNK su zatim umnoženi primenom mešavine regenasa za PCR u realnom vremenu (TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG) i eseja za specifične mikro RNK (TaqMan™ MicroRNA Assay), primenom aparata Real Time PCR 7500 (Applied Biosystems). Korišćeni su sledeći eseji za mikro RNK: has-miR-21 (ID: 000397), hsa-miR-146a (ID:000468); has-miR-155 (ID: 002623) i RNU6B (ID:001093). Nivo ekspresije mikro RNK je predstavljen u relativnim jedinicama i normalizovan u odnosu na endogenu kontrolu RNU6B. Rezultati relativne ekspresije su analizirani pomoću softvera 7500 System SDS Software (Applied Biosystems) i primenom komparativne $\Delta\Delta C_t$ metode.

3.6. Statistička analiza podataka

U istraživanju u prve dve grupe ispitanika, zavisno od tipa varijabli i normalnosti raspodele, deskripcija podataka je prikazana kao n (%), srednja vrednost \pm standardna devijacija ili medijana (min-max). Povezanost između varijabli procenjena je primenom Spearmanovog koeficijenta korelacije. Za modelovanje odnosa ordinalne zavisne varijable (akutna genitourinarna toksičnost) u ponovljenim merenjima sa potencijalnim prediktorima korišćen je linearni mešoviti model ili logistička regresija mešovutih efekata. U multivarijantne regresione modele sa stepenom akutne genitourinarne toksičnosti kao zavisnom varijablom prilagođeno za vreme opservacije i vrstu radioterapije uključene su one varijable koje su u univarijantnim modelima bile statistički značajne. Promene u ishodima su ispitivane tokom trajanja studije sa pristupom modeliranja logističke regresija mešovutih efekata implementiranih u lme4 paket za R programsko okruženje (R Core Team, Vienna, Austria, 2019). Nivo statističke značajnosti postavljen je na 0,05.

U grupi pacijenata kod kojih su ispitivane ekspresije mikro RNK, razlike između dve grupe pacijenata (sa i bez GU toksičnosti) analizirane su primenom parametrijskog Studentovog t-testa, ili neparametrijskog Mann-Whitney U testa. Za analizu distribucije učestalosti korišćen je Fisherov test. Za komparaciju između parova uzoraka u dve tačke, korišćen je Vilkoksonov test sume rangova, a za komparaciju između uzoraka u tri tačke, korišćen je Friedmanov test. Za analizu korelacije, korišćen je Pearsonov koeficijent linearne korelacije ili Spearmanov koeficijent korelacije ranga. P vrednost \leq 0,05 smatrana je statistički značajnom, dok je p vrednost između 0,1 i 0,05 definisana kao statistički trend. Analiza statističkih podataka vršena je korišćenjem IBM SPSS Statistics 22 softvera (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) i GraphPad Prism 5 softvera (GraphPad Software, Inc, CA).

4. REZULTATI

4.1. Karakteristike ispitivane grupe pacijenata sa karcinomom prostate

U istraživanje je bilo uključeno 90 pacijenata sa karcinomom prostate lečenih radioterapijom. Prikaz individualnih, kliničkih, karakteristika tumora i karakteristika radioterapije dat je u tabeli 10.

Tabela 10. Individualne, kliničke, karakteristike tumora i karakteristike radioterapije

Broj pacijenata (n)*	90
Starost; Srednja vrednost** ± SD***, (opseg)	69,53 ± 6,6 (52-82)
Pušački status; n (%)	
Da	64 (71, 1%)
Ne	26 (28, 9%)
Konzumiranje alkohola; n (%)	
Da	54 (60%)
Ne	36 (40%)
Komorbidity; n (%)	
Hipertenzija	
Da	57 (63, 3%)
Ne	33 (36, 7%)
Diabetes Mellitus	
Da	17 (18, 9%)
Ne	73 (81, 1%)
Operacije u abdomenu ili karlici	
Da	42 (46, 7%)
Ne	48 (53, 3%)
Prisustvo komorbiditeta	
Da	86 (95, 6%)
Ne	4 (4, 4%)
PSA pre dijagnoze; Srednja vrednost ± SD,ng/ml (opseg)	15,16 ± 10,39 (3,86-57,00)
PSA pre RT; Srednja vrednost ± SD,ng/ml (opseg)	7,93 ± 6,98 (0,09-26,26)
Glison skor; n (%)	
6	20 (22, 2%)
7	58 (64, 44%)
8	9 (10%)
9	3 (3, 33%)
cT status; n (%), n=67	
cT1	8 (11, 94%)
cT2	59 (88, 05%)
cN status; n (%),n=67	
cN0	67 (100%)
cN1	0 (0%)
cM status; n(%), n=67	
cM0	67 (100%)
cM1	0 (0%)
pT status; n(%), n=36	
pT2	12 (33, 3%)
pT3	21 (58, 3%)

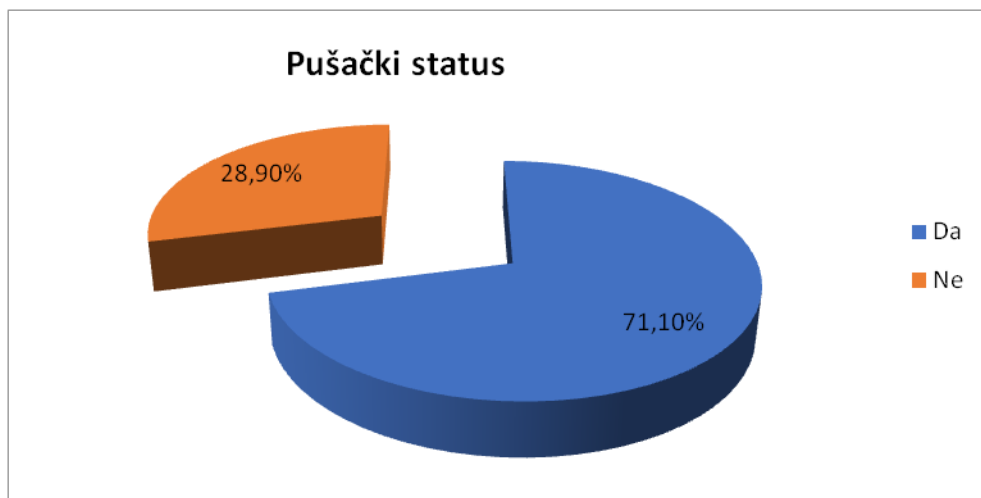
pT4	3 (8, 3%)
pN status; n(%), n=36	
pN0	13 (36, 1%)
pN1	6 (16, 7%)
pNx	17 (47, 2%)
pM status; n(%), n=36	
pM0	19 (52, 8%)
pM1	0 (0%)
pMx	17 (47, 2%)
Gradus tumora; n (%) n=37	
1	3 (8, 1%)
2	31 (83, 8%)
3	3 (8, 1%)
Grupe rizika; n (%)	
Nizak	9 (10, 0%)
Srednji	50 (55, 6%)
Visok	31 (34, 4%)
Resekcioni status (R1 resekcija); n (%), n=36	
Da	8 (22, 2%)
Ne	14 (38, 9%)
Nema podataka	14 (38, 9%)
Tip radioterapije	
Radikalna	51 (56, 6%)
Postoperativna/Salvage	39 (43, 3%)
Tehnika zračenja; n (%)	
3D-CRT	77 (85, 6%)
VMAT (ARC)	13 (14, 4%)
Zračni volumeni	
Volumeni (radikalni); %	
Prostata	18,9%
Prostata+s.vezikule	22,6%
Prostata+s.vezikule+lgl	58,5%
Volumeni (operisani); %	
Loža±SV	29,7%
Loža±SV+Lgl	70,3%
*n-broj ispitanika	
**Mean (eng)- srednja vrednost	
***SD-standardna devijacija	

Individualne karakteristike

Individualne karakteristike koje su ispitivane, bile su **starost, pušenje i konzumacija alkohola.**

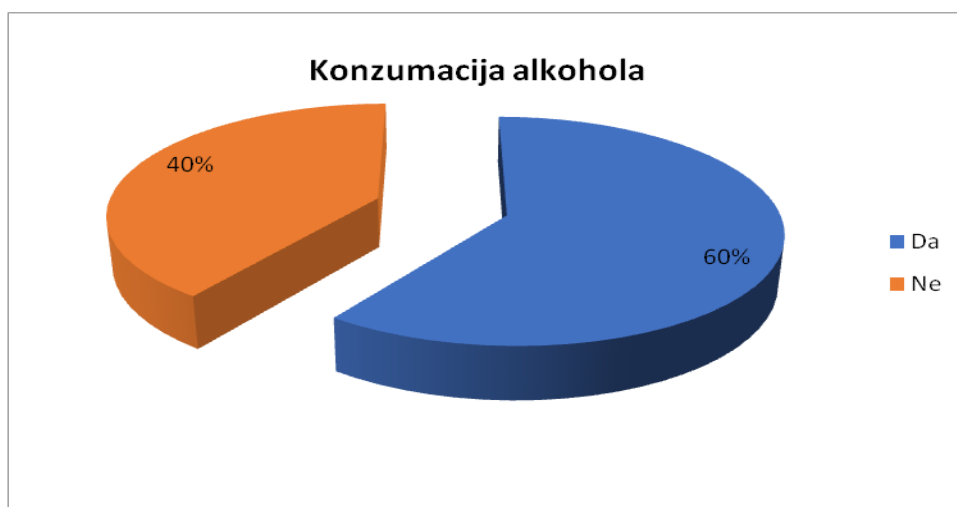
U momentu uključivanja u studiju, prosečna starost pacijenata bila je $69,53 \pm 6,6$ godina. Najmlađi ispitanik imao je 52 godine, dok je najstariji imao 82.

U trenutku ispitivanja, njih 64 (71,1%) deklariralo se kao pušači, dok se njih 26-oro (28,9%) izjasnilo da su nepušači.



Grafik 1. Pušački status ispitanika

U momentu započinjanja studije, 54 (60%) pacijenata izjasnilo se da konzumira alkohol, a njih 36 (40%) negiralo je konzumaciju alkohola.



Grafik 2. Status konzumiranja alkohola

Kliničke karakteristike

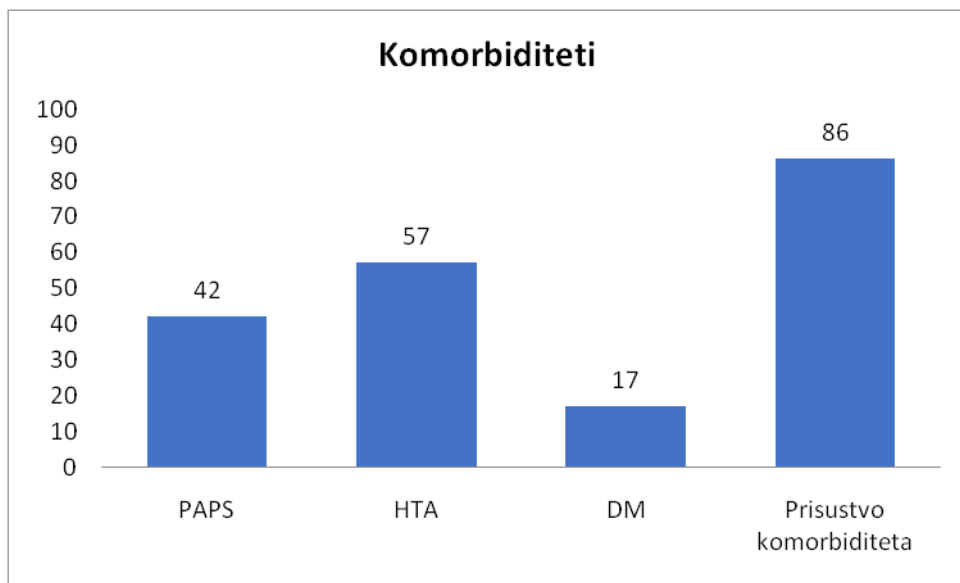
Kliničke karakteristike koje su ispitivane, bile su **stadijum bolesti, prethodne operacije abdomena ili male karlice (eng. prior abdominal or pelvic surgery-PAPS) i prisustvo komorbiditeta.**

U trenutku ispitivanja, prethodne operacije u abdomenu i maloj karlici, anamnestički su potvrđene kod 42 (46,7%) ispitanika, dok se njih 48 (53,3%) izjasnilo negativno.

U trenutku otpočinjanja lečenja, arterijsku hipertenziju (**HTA**) imalo je 57 (63,3%) ispitanika, dok 33 (36,7%) nije uzimalo antihipertenzivnu terapiju.

U momentu ispitivanja, dijagnozu Diabetes mellitusa (**DM**), imalo je 17 (18,9%) bolesnika, dok 73 (81,1%) pacijenata nije imalo dijagnostikovanu ovu bolest.

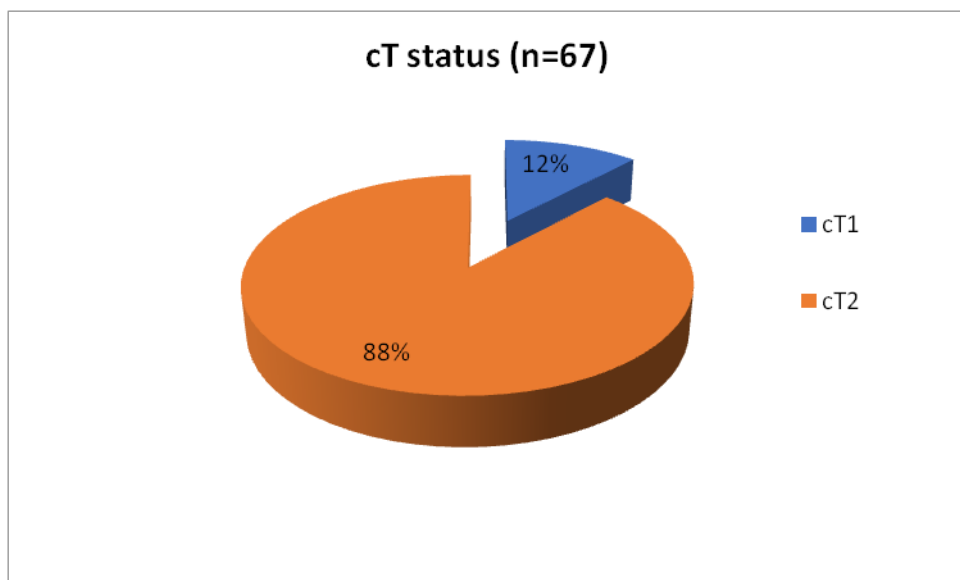
Analizirajući komorbiditete, u trenutku uključivanja u studiju, 86 (95,6%) pacijenata izjasnilo se da pored osnovnog oboljenja ima još neku od pridruženih bolesti, dok 4 (4,4%) ispitanika nije imalo druge komorbiditete.



Grafik 3. Pristvo komorbiditeta

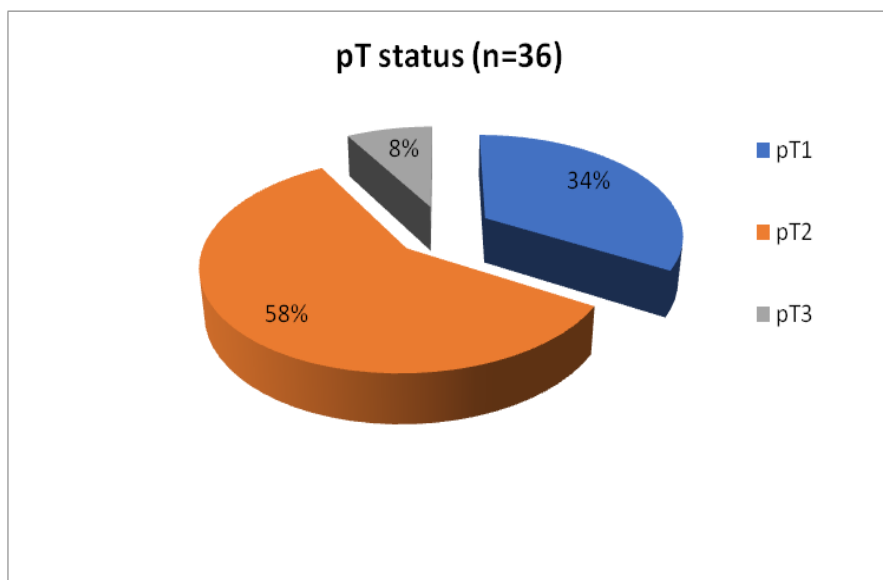
Karakteristike tumora

U trenutku postavljanja dijagnoze bolesti, za 67 pacijenata postojali su podaci za cTNM stadijum. Kod 8 (11,94%) pacijenata bolest je bila stadirana kao cT1, dok je cT2 bolest bila prisutna kod 59 pacijenata (88,05%). Svi pacijenti za koje su postojali podaci o cTNM stadijumu, bili su stadirani kao N0M0.



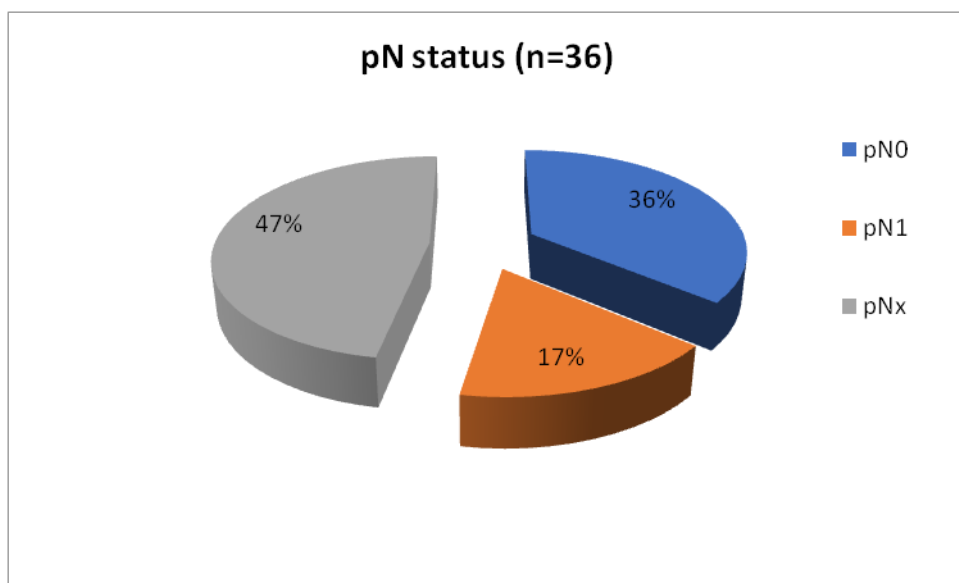
Grafik 4. Distribucija pacijenata prema T kliničkom stadijumu

Pri analizi pTNM statusa, od 36 ispitanika za koje su postojali podaci, njih 12 (33,3%), bilo je stadirano kao pT1, 21 (58,3%) kao pT2, a 3 (8,3%) ispitanika kao pT3.



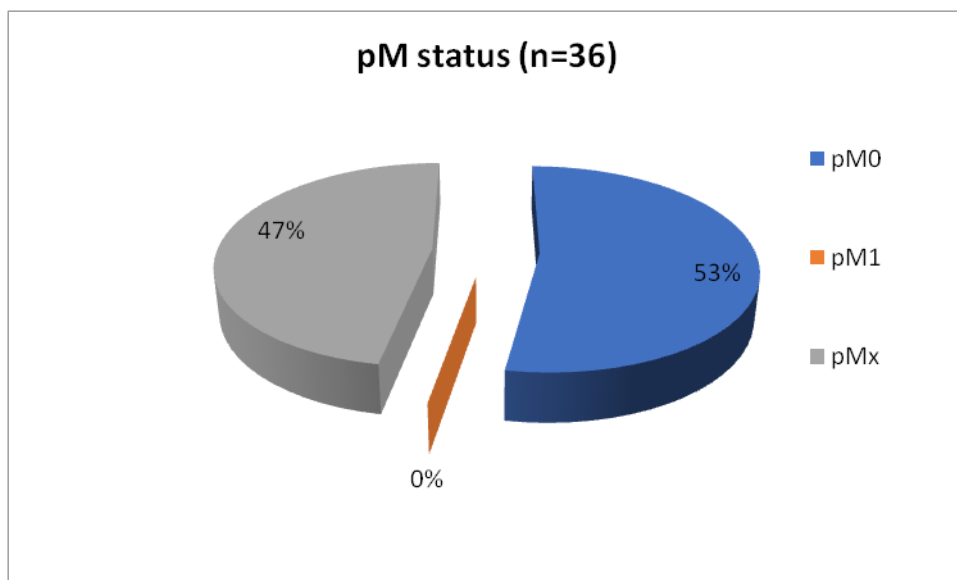
Grafik 5. Distribucija pacijenata prema T patohistološkom stadijumu

pN0 status postojao je kod 13 (36,1%) ispitanika, 6 (16,7%) ispitanika bilo je stadirano kao pN1, dok je kod 17 (47,2%) pacijenata postojao Nx status.



Grafik 6. Distribucija pacijenata prema N patohistološkom stadijumu

pM0 bio je prisutan kod 19 (52,8%) ispitanika, 0 pacijenata bilo je pM1, dok je Mx postojao kod 17 (47,2%) ispitanika.

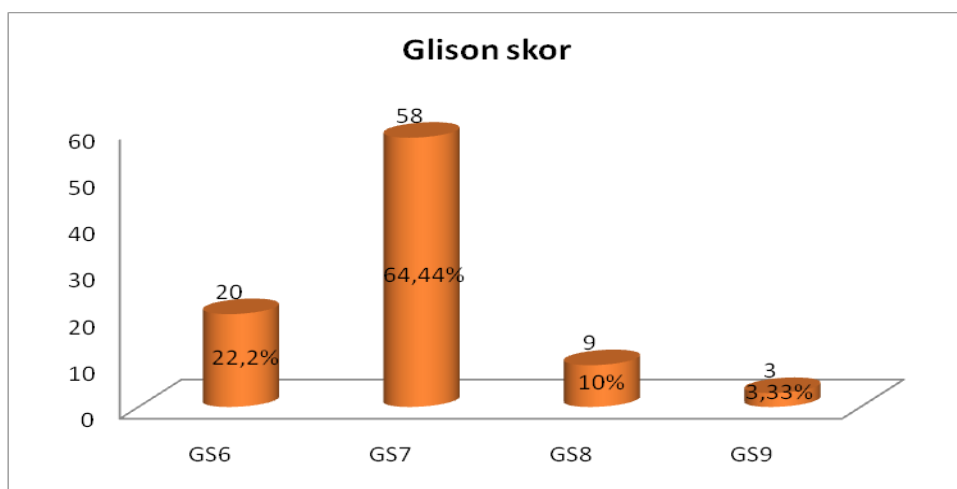


Grafik 7. Distribucija pacijenata prema M patohistološkom stadijumu

Prosečna vrednost inicijalnog PSA bila je $15,16 \pm 10,39$, a najniža vrednost bila je 3,86, dok je najviša bila 57,00.

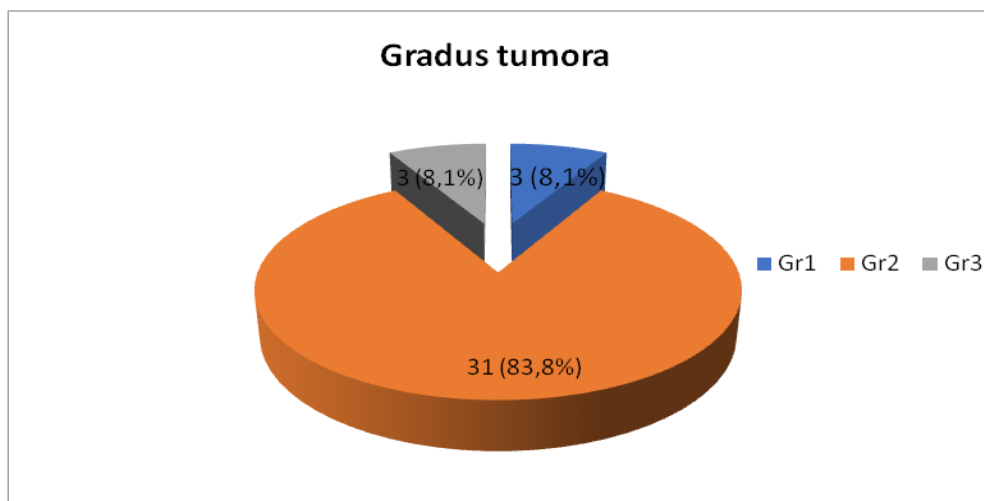
Kada je reč o PSA pre otpočinjanja radioterapije, prosečna vrednost iznosila je $7,93 \pm 6,98$, najniža vrednost bila je 0,09, a najviša 26,26.

Analiziranjem podataka za Glison skor (GS), utvrđeno je da je 20 (22,2%) ispitanika imalo GS 6, 58 (64,44%) GS 7, 9 (10%) GS 8, a kod 3 (3,33%) ispitanika postojao je GS 9.



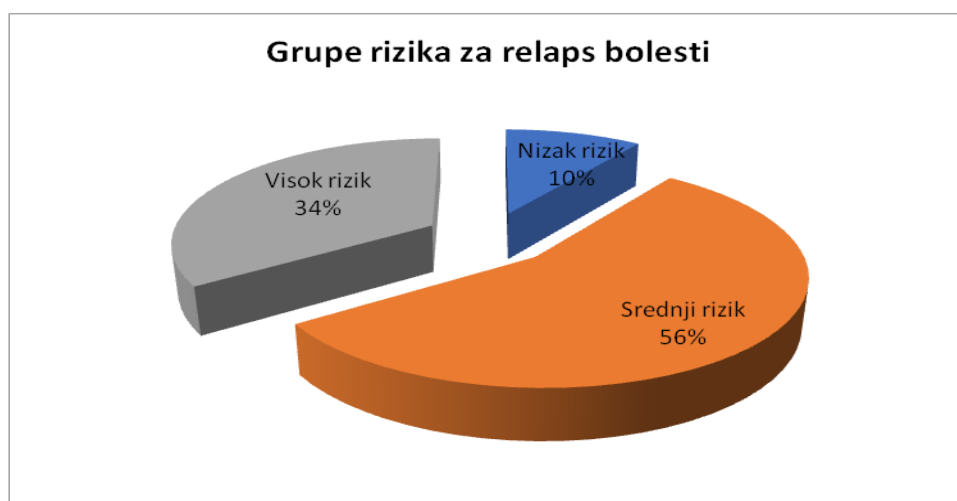
Grafik 8. Distribucija pacijenata prema Glison skoru

Uvidom u podatke o gradusu tumora (Gr), Gr 1 imalo je 3 (8, 1%) ispitanika, Gr 2 31 (83, 8%), a Gr 3 3 (8, 1%).



Grafik 9. Patohistološki gradus tumora

Svrstavajući pacijente u grupe rizika za relaps bolesti, 9 (10%) ispitanika pripadalo je grupi niskog rizika, 50 (55,6%) grupi srednjeg rizika, a 31 (34,4%) pacijenata pripadalo je visokorizičnoj grupi.

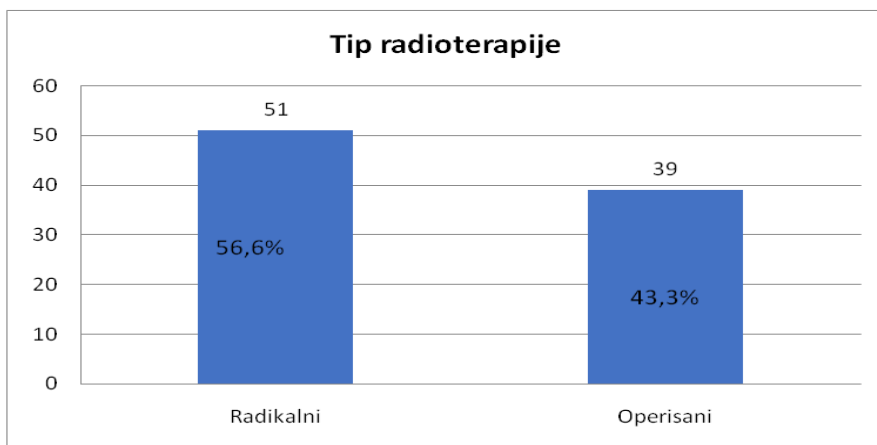


Grafik 10. Grupe rizika za relaps bolesti

Uvidom u definitivni PH nalaz nakon operacije i analizirajući hirurške margine (R status bolesti), 8 (22,2%) ispitanika imalo je R0 status, dok je 14 (38,9%) bilo R1.

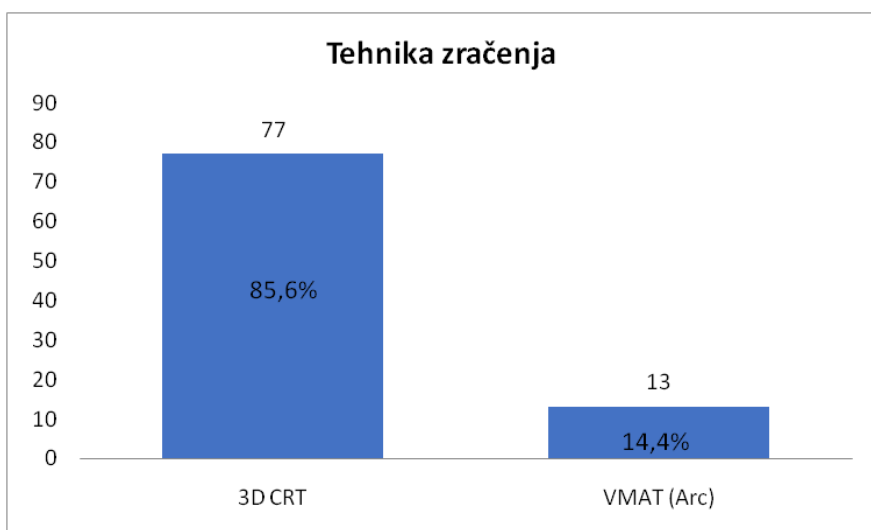
Karakteristike radioterapije

Od ukupnog broja uključenih pacijenata u istraživanje, kod njih 51 (56,6%) sprovedena je radikalna zračna terapija, dok je kod 39 (43,3%) ispitanika sprovedena zračna terapija nakon operacije, bilo kao adjuvantna ili Salvage.



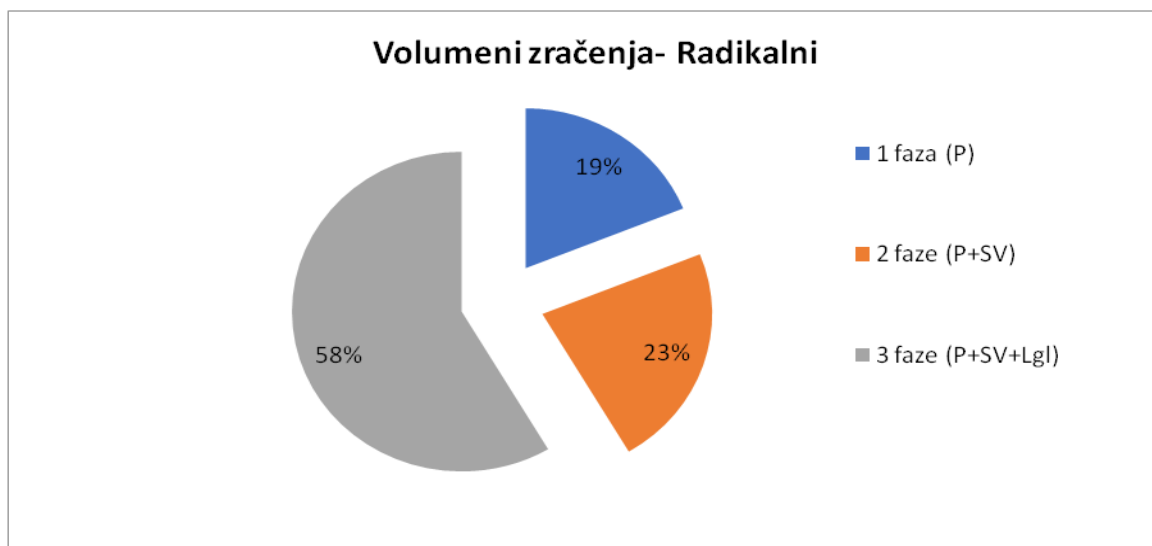
Grafik 11. Distribucija pacijenata prema tipu radioterapije

Od svih ispitanika, kod 77 (85,6%) pacijenata zračna terapija sprovedena je 3D-CRT, dok je kod preostalih 13 (14,4%) pacijenata, primenjena VMAT, odnosno ARC tehnika zračenja.



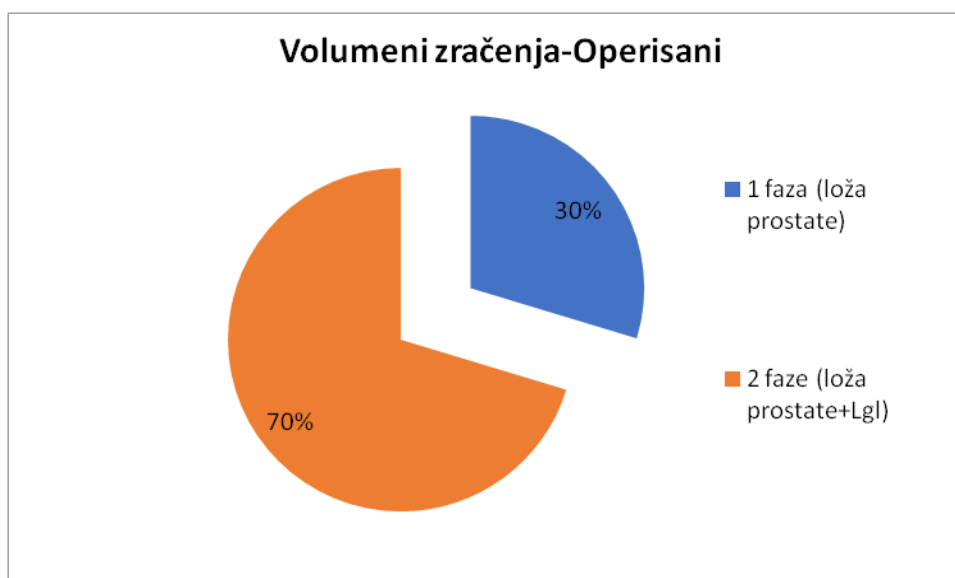
Grafik 12. Podela pacijenata prema tehnici zračne terapije

U grupi radikalno zračenih pacijenata, kod 18,9% njih, zračna terapija sprovedena je u 1 fazi (ciljni volumen bio je prostata), kod 22,6% radioterapija se izvodila u 2 faze (zračni volumen bio je prostata i semene vezikule, dok je zračna terapija u 3 faze (ciljni volumen, prostata, semene vezikule i regionalni limfatici) sprovedena kod 58,5%.



Grafik 13. Distribucija pacijenata prema Doza-volumen grupama kod radikalno zračenih

Kod operisanih pacijenata, zračna terapija sprovedena je u 1 fazi (ciljni volumen loža prostate ± semene vezikule) kod 29,7% pacijenata, dok je kod 70,3% ispitanika radioterapija izvedena u 2 faze (ciljni volumen loža prostate ± semene vezikule i regionalni limfatici).



Grafik 14. Distribucija pacijenata prema Doza-volumen grupama kod operisanih pacijenata

Dozimetrijske karakteristike

Dozimetrijske karakteristike od značaja za nastanak urogenitalne toksičnosti su srednja doza na mokraćnu bešiku (Dmean), maksimalna doza na mokraćnu bešiku (Dmax), kao i volumeni bešike sa primljenom dozom većom ili jednakom 50 Gy (V50), 60 Gy (V60), 65 Gy (V65), 70 Gy (V70), 72 Gy (V72). Mediane ovih vrednosti date su u tabeli 11.

Dozimetrijske karakteristike od značaja za nastanak gastrointestinalne toksičnosti su srednja doza na rektum (Dmean), maksimalna doza na rektum (Dmax), kao i volumeni rektuma sa primljenom dozom većom ili jednakom 50 Gy (V50), 60 Gy (V60), 65 Gy (V65), 70 Gy (V70), 72 Gy (V72). Mediane ovih vrednosti date su u tabeli 12.

Tabela 11. Dozimetrijske karakteristike za mokraćnu bešiku

Median Dmean*, Gy (opseg)	55, 37 (19, 16-63, 77)
Median Dmax**, Gy (opseg)	72, 38 (65, 76-74, 90)
Median V 50***,% (opseg)	61, 32 (18, 60-100, 00)
Median V 60,% (opseg)	41, 52 (12, 00-87, 42)
Median V 65,% (opseg)	30, 99 (1, 64-75, 22)
Median V 70,% (opseg)	7, 19 (0, 00-32, 96)
Median V 72,% (opseg)	0, 21 (0, 00-10, 21)
*Dmean-srednja doza na bešiku **Dmax-maksimalna doza na bešiku ***Vxx-procentat bešike koji je primio \geq xxGy	

Tabela 12. Dozimetrijske karakteristike za rektum

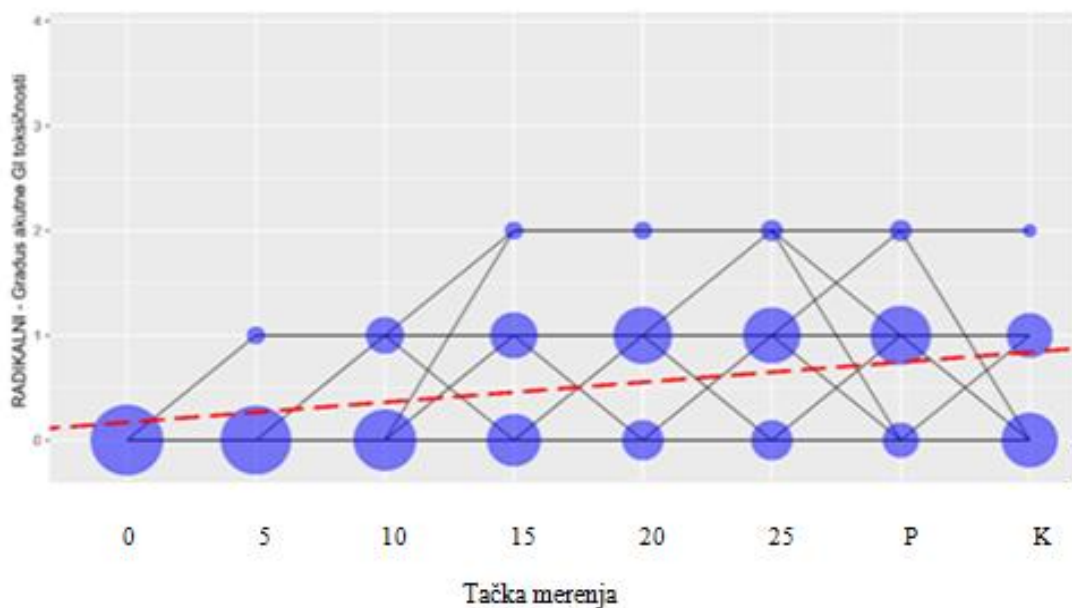
Median Dmean*, Gy (opseg)	50, 79 (30, 81-60, 14)
Median Dmax**, Gy (opseg)	71, 37 (65, 82-73, 99)
Median V 50***,% (opseg)	50, 99 (24, 38-87, 87)
Median V 60,% (opseg)	30, 69 (9, 86-71, 10)
Median V 65,% (opseg)	17, 51 (1, 26-58, 11)
Median V 70,% (opseg)	1, 88 (0, 00-17, 12)
Median V 72,% (opseg)	0 (0, 00-9, 19)
*Dmean-srednja doza na rektum **Dmax-maksimalna doza na rektum ***Vxx-procentat rektuma koji je primio \geq xxGy	

4.2. Ispitivanje prediktivne vrednosti individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika za nastanak toksičnosti za celu grupu ispitanika

4.2.1. Ispitivanje akutne toksičnosti

4.2.1.1. Ispitivanje akutne GI i GU toksičnosti u grupi radikalno zračenih pacijenata

U grupi radikalno zračenih pacijenata, postoji statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GI toksičnosti u vremenu ($b = 0,096$; $p < 0.001$), što je prikazano na grafiku 15.



Grafik 15. Trend porasta stepena akutne GI toksičnosti u vremenu u grupi radikalno zračenih pacijenata: 0- nulta frakcija, pre radioterapije; 5-nakon 5 frakcija radioterapije; 10-nakon 10 frakcija radioterapije; 15- nakon 15 frakcija radioterapije; 20- nakon 20 frakcija radioterapije; 25- nakon 25 frakcija radioterapije; P- nakon poslednje frakcije zračenja; K- prva kontrola, mesec dana nakon završene radioterapije. Linija reprezentuje izmenu gradusa akutne GI toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

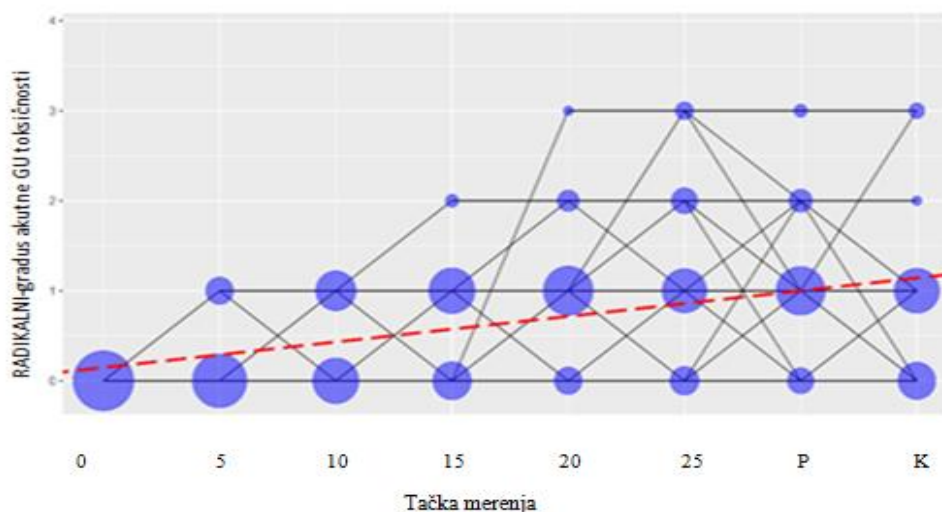
Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika na nastanak akutne GI toksičnosti kod radikalno zračenih pacijenata prikazana je u tabeli 13.

Tabela 13. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak akutne GI toksičnosti u grupi radikalno zračenih pacijenata

Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	-0,007	0,367
Navika pušenja	0,030	0,727
Konzumiranje alkohola	-0,080	0,313
Gradus_TU	0,143	0,206
Prethodne operacije	-0,039	0,619
Hipertenzija	-0,038	0,654
DM	-0,045	0,619
Ostali komorbiditeti	0,005	0,980
V50 rektum	-0,001	0,888
V60 rektum	<0,001	0,939
V65 rektum	0,001	0,803
V70 rektum	-0,007	0,434
V72 rektum	0,016	0,525
Srednja doza rektum	0,009	0,129
Maksimalna doza rektum	0,042	0,111

U grupi radikalno zračenih pacijenata, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima nijedna od ispitivanih varijabli nije bila povezana sa većim stepenom akutne GI toksičnosti.

U grupi radikalno zračenih pacijenata, postoji statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GU toksičnosti u vremenu ($b = 0,142$; $p < 0.001$), što je prikazano na grafiku 16.



Grafik 16. Trend porasta stepena akutne GU toksičnosti u vremenu u grupi radikalno zračenih pacijenata: 0- nulta frakcija, pre radioterapije; 5-nakon 5 frakcija radioterapije; 10-nakon 10 frakcija radioterapije; 15- nakon 15 frakcija radioterapije; 20- nakon 20 frakcija radioterapije; 25- nakon 25 frakcija radioterapije; P- nakon poslednje frakcije zračenja; K- prva kontrola, mesec dana nakon završene radioterapije. Linija reprezentuje izmenu gradusa akutne GU toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika na nastanak akutne GU toksičnosti kod radikalno zračenih pacijenata prikazana je u tabeli 14.

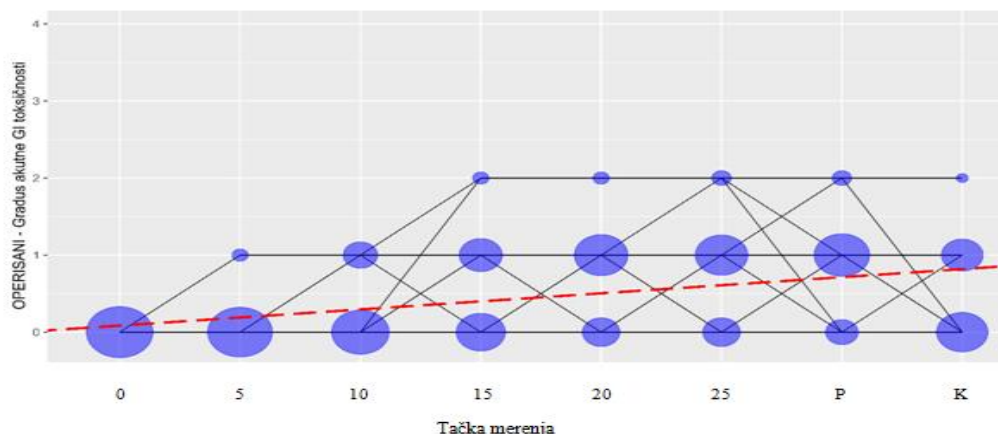
Tabela 14. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak akutne GU toksičnosti kod radikalno zračenih

Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	0,002	0,855
Navika pušenja	-0,040	0,693
Konzumiranje alkohola	0,036	0,703
Gradus_TU	0,069	0,591
Prethodne operacije	-0,226	0,012
Hipertenzija	-0,028	0,778
DM	0,038	0,721
Ostali komorbiditeti	-0,370	0,119
V50 bešika	0,003	0,166
V60 bešika	0,003	0,180
V65bešika	0,003	0,273
V70 bešika	0,008	0,153
V72 bešika	0,028	0,148
Srednja doza mokraćna bešika	0,006	0,219
Maksimalna doza mokraćna bešika	-0,013	0,669

Kod radikalnih ispitanika, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima veći stepen akutne GU toksičnosti imali su ispitanici bez prethodnih operacija ($b = -0,226$; $p = 0,012$).

4.2.1.2. Ispitivanje akutne GI i GU toksičnosti u grupi zračenih operisanih pacijenata

Kod operisanih ispitanika, postoji statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GI toksičnosti u vremenu ($b = 0,105$; $p < 0.001$), što je prikazano na grafiku 17.



Grafik 17. Trend porasta stepena akutne GI toksičnosti u vremenu u grupi zračenih operisanih pacijenata: 0- nulta frakcija, pre radioterapije; 5-nakon 5 frakcija radioterapije; 10-nakon 10 frakcija radioterapije; 15- nakon 15 frakcija radioterapije; 20- nakon 20 frakcija radioterapije; 25- nakon 25 frakcija radioterapije; P- nakon poslednje frakcije zračenja; K- prva kontrola, mesec dana nakon završene radioterapije. Linija reprezentuje izmenu gradusa akutne GI toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

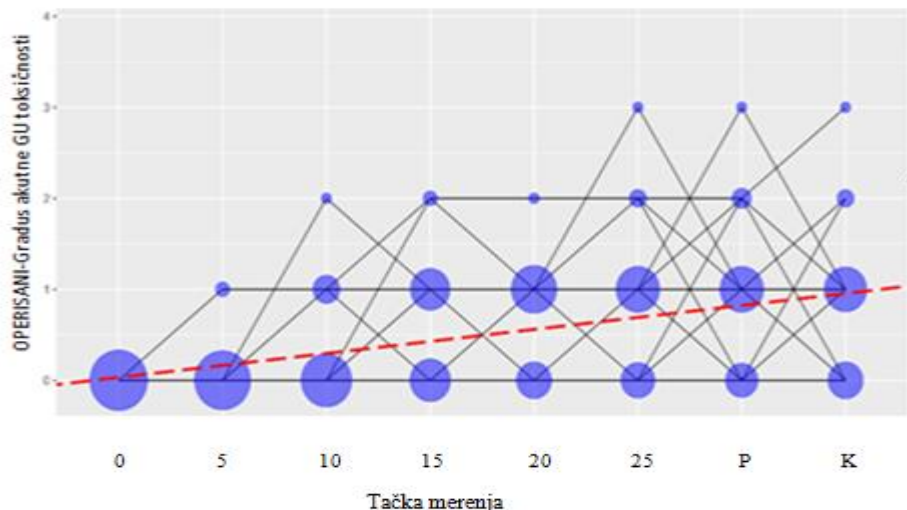
Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika na nastanak akutne GI toksičnosti u grupi zračenih operisanih pacijenata prikazana je u **tabeli 15**.

Tabela 15. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak akutne GI toksičnosti u grupi zračenih operisanih pacijenata

Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	0, 010	0, 181
Navika pušenja	0, 036	0, 723
Konzumiranje alkohola	-0, 144	0, 121
Gradus_TU	0, 152	0, 627
Prethodne operacije	0, 016	0, 866
Hipertenzija	0, 045	0, 615
DM	-0, 016	0, 913
Ostali komorbiditeti	0, 081	0, 688
V50 rektum	0, 001	0, 771
V60 rektum	0, 002	0, 538
V65 rektum	0, 003	0, 514
V70 rektum	-0, 005	0, 765
V72 rektum	-0, 026	0, 795
Srednja doza rectum	0, 008	0, 414
Maksimalna doza rectum	0, 005	0, 884

Kod operisanih ispitanika, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima nijedna od ispitivanih varijabli nije bila povezana sa stepenom akutne GI toksičnosti u vremenu.

Kod operisanih ispitanika, postoji statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GU toksičnosti u vremenu ($b = 0,132$; $p < 0.001$), što je prikazano na grafiku 18.



Grafik 18. Trend porasta stepena akutne GU toksičnosti u vremenu u grupi zračenih operisanih pacijenata: 0- nulta frakcija, pre radioterapije; 5-nakon 5 frakcija radioterapije; 10-nakon 10 frakcija radioterapije; 15- nakon 15 frakcija radioterapije; 20- nakon 20 frakcija radioterapije; 25- nakon 25 frakcija radioterapije; P- nakon poslednje frakcije zračenja; K- prva kontrola, mesec dana nakon završene radioterapije. Linija reprezentuje izmenu gradusa akutne GU toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika na nastanak akutne GU toksičnosti u grupi zračenih operisanih pacijenata prikazana je u tabeli 16.

Tabela 16. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak akutne GU toksičnosti kod operisanih pacijenata

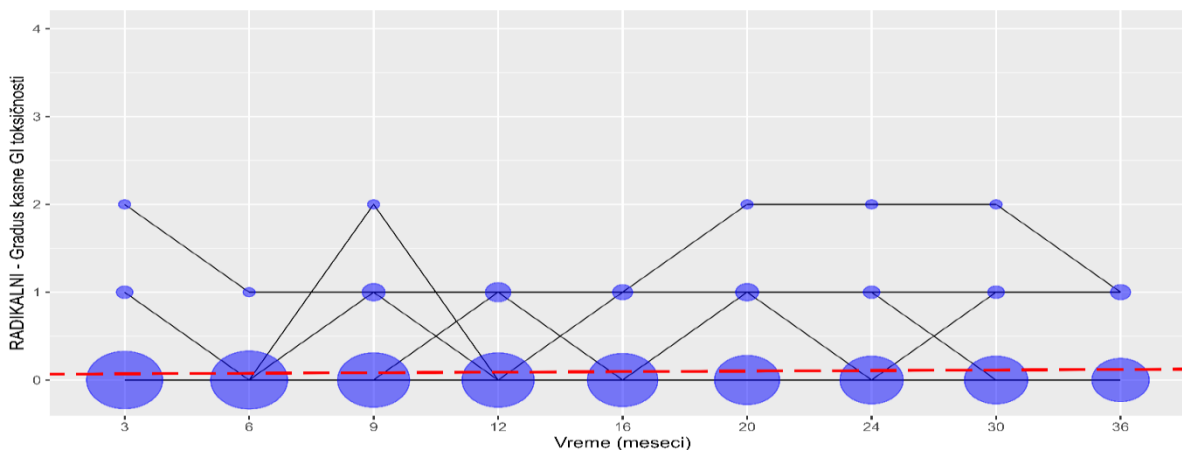
Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	0, 007	0, 479
Navika pušenja	0, 159	0, 187
Konzumiranje alkohola	-0, 001	0, 932
Gradus_TU	0, 241	0, 452
Prethodne operacije	0, 117	0, 278
Hipertenzija	-0, 037	0, 728
DM	0, 251	0, 148
Ostali komorbiditeti	0, 257	0, 285
V50 bešika	-0, 002	0, 627
V60 bešika	-0, 006	0, 100
V65bešika	-0, 004	0, 418
V70 bešika	-0, 013	0, 232
V72 bešika	-0, 040	0, 233
Srednja doza mokraćna bešika	-0, 019	0, 305
Maksimalna doza mokraćna bešika	-0, 029	0, 445

Kod operisanih ispitanika, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima nijedna od ispitivanih varijabli nije bila povezana sa stepenom akutne GU toksičnosti.

4.2.2. Ispitivanje kasne toksičnosti

4.2.2.1. Ispitivanje kasne GI i GU toksičnosti u grupi radikalno zračenih pacijenata

U grupi radikalno zračenih pacijenata, ne postoji statistički značajan trend promene stepena kasne GI toksičnosti u vremenu ($b = 0,006$; $p = 0,277$), što je prikazano na grafiku 19.



Grafik 19. Trend porasta stepena kasne GI toksičnosti u vremenu u grupi radikalno zračenih pacijenata: Linija reprezentuje izmenu gradusa kasne GI toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

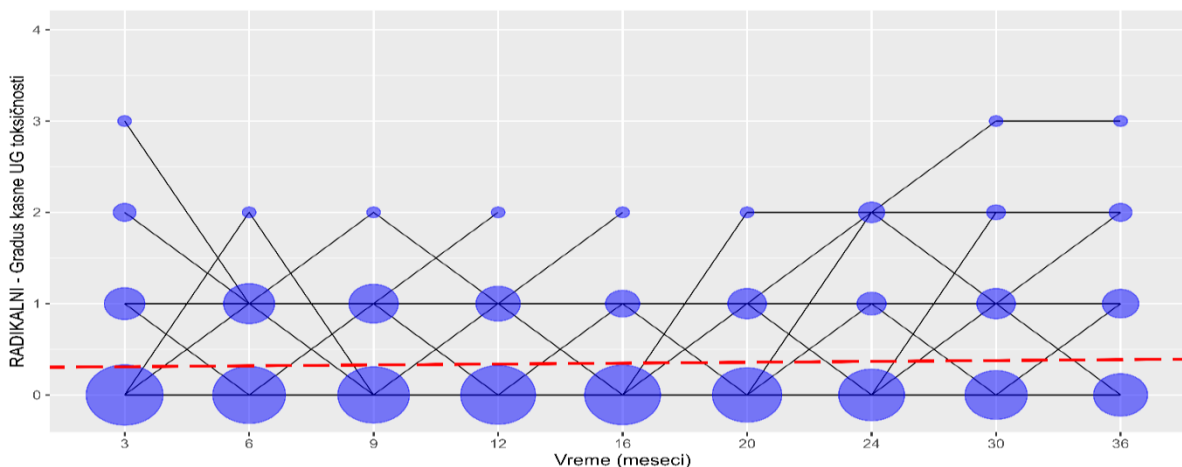
Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika na nastanak kasne GI toksičnosti kod radikalno zračenih pacijenata prikazana je u **tabeli 17**.

Tabela 17. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak kasne GI toksičnosti u grupi radikalno zračenih pacijenata

Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	-0,002	0,748
Navika pušenja	-0,107	0,104
Konzumiranje alkohola	0,074	0,234
Gradus_TU	0,014	0,922
Prethodne operacije	-0,122	0,044
Hipertenzija	-0,106	0,106
DM	0,042	0,563
Ostali komorbiditeti	-0,490	<0,001
V50 rektum	-0,001	0,584
V60 rektum	-0,001	0,782
V65 rektum	-0,001	0,888
V70 rektum	0,001	0,798
V72 rektum	-0,003	0,756
Srednja doza rectum	-0,002	0,294
Maksimalna doza rectum	-0,009	0,369

Kod radikalnih ispitanika, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima veći stepen kasne GI toksičnosti imali su ispitanici bez prethodnih operacija ($b = -0,122$; $p = 0,044$) i bez ostalih komorbiditeta ($b = -0,490$; $p < 0,001$).

Kod radikalnih ispitanika, ne postoji statistički značajan trend promene stepena kasne GU toksičnosti u vremenu ($b = 0,010$; $p = 0,344$), što je prikazano na grafiku 20.



Grafik 20. Trend porasta stepena kasne GU toksičnosti u vremenu u grupi radikalno zračenih pacijenata. Linija reprezentuje izmenu gradusa kasne GU toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika na nastanak kasne GU toksičnosti kod radikalno zračenih pacijenata prikazana je u tabeli 18.

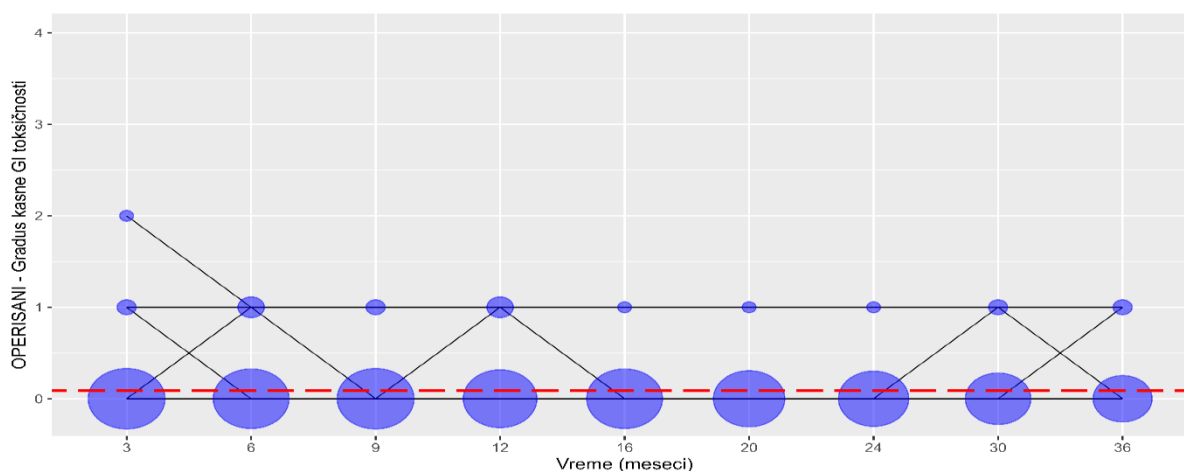
Tabela 18. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak kasne GU toksičnosti u grupi radikalno zračenih pacijenata

Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	0, 001	0, 944
Navika pušenja	0, 044	0, 720
Konzumiranje alkohola	-0, 021	0, 860
Gradus_TU	-0, 206	0, 164
Prethodne operacije	0, 261	0, 019
Hipertenzija	0, 134	0, 276
DM	-0, 128	0, 336
Ostali komorbiditeti	0, 243	0, 401
V50 bešika	-0, 001	0, 960
V60 bešika	<0, 001	0, 971
V65bešika	<0, 001	0, 946
V70 bešika	0, 005	0, 494
V72 bešika	0, 034	0, 236
Srednja doza mokraćna bešika	0, 004	0, 602
Maksimalna doza mokraćna bešika	0, 026	0, 536

Kod radikalnih ispitanika, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima veći stepen kasne GU toksičnosti imali su ispitanici sa prethodnim operacijama ($b = 0,261$; $p = 0,019$).

4.2.2.2. Ispitivanje kasne GI i GU toksičnosti u grupi zračenih operisanih pacijenata

Kod operisanih ispitanika, ne postoji statistički značajan trend promene stepena kasne GI toksičnosti u vremenu ($b = -0,001$; $p = 0,955$), što je prikazano na grafiku 21.



Grafik 21. Trend porasta stepena kasne GI toksičnosti u vremenu u grupi zračenih operisanih pacijenata. Linija reprezentuje izmenu gradusa kasne GI toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

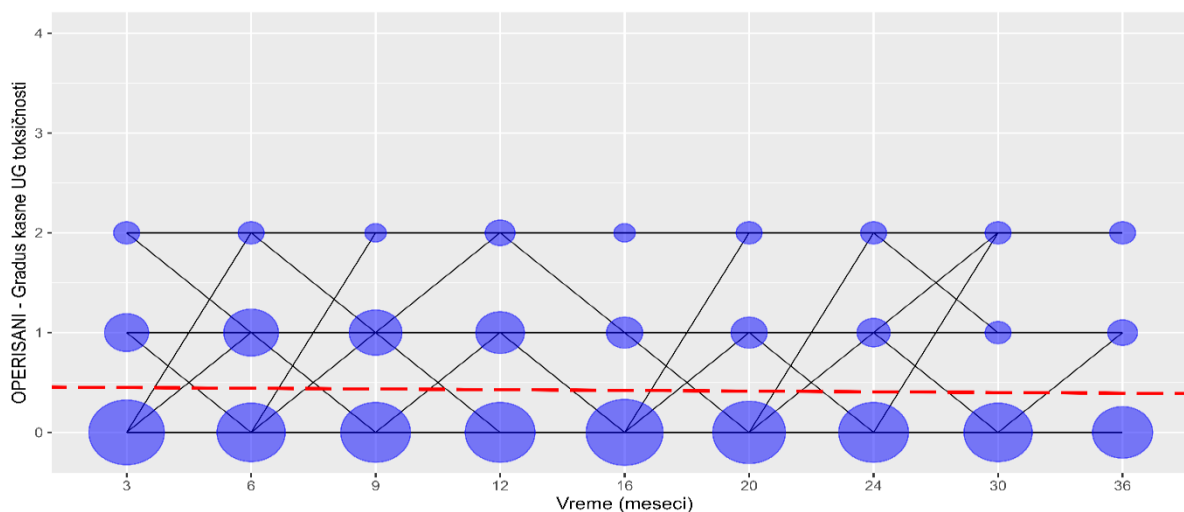
Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika za nastanak kasne GI toksičnosti kod operisanih pacijenata prikazana je u **tabeli 19**.

Tabela 19. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak kasne GI toksičnosti u grupi zračenih operisanih pacijenata

Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	0,005	0,409
Navika pušenja	-0,006	0,940
Konzumiranje alkohola	-0,034	0,620
Gradus_TU	0,126	0,665
Prethodne operacije	-0,004	0,947
Hipertenzija	0,073	0,261
DM	0,200	0,058
Ostali komorbiditeti	-0,024	0,869
V50 rektum	0,005	0,113
V60 rektum	0,006	0,057
V65 rektum	0,008	0,037
V70 rektum	-0,010	0,535
V72 rektum	-0,063	0,506
Srednja doza rectum	0,007	0,417
Maksimalna doza rectum	0,018	0,515

U grupi zračenih operisanih pacijenata, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima veći stepen kasne GI toksičnosti imali su ispitanici sa većim V65 za rektum ($b = 0,008$; $p = 0,037$).

Kod operisanih ispitanika, ne postoji statistički značajan trend promene stepena kasne GU toksičnosti u vremenu ($b = -0,008$; $p = 0,513$), što je prikazano na grafiku 22.



Grafik 22. Trend porasta stepena kasne GU toksičnosti u vremenu u grupi zračenih operisanih pacijenata. Linija reprezentuje izmenu gradusa kasne GU toksičnosti u vremenu. Veličina kruga proporcionalna je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija veličina krugova je 100%.

Uticaj individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika na nastanak kasne GU toksičnosti kod operisanih pacijenata prikazana je u **tabeli 20**.

Tabela 20. Uticaj prikazanih varijabli na nastanak kasne GU toksičnosti u grupi zračenih operisanih pacijenata

Varijable	Univarijantna analiza	
	b	p
Starost	0, 001	0, 931
Navika pušenja	-0, 011	0, 954
Konzumiranje alkohola	-0, 037	0, 824
Gradus_TU	0, 291	0, 456
Prethodne operacije	0, 218	0, 169
Hipertenzija	0, 159	0, 316
DM	0, 429	0, 098
Ostali komorbiditeti	0, 033	0, 925
V50 bešika	0, 001	0, 782
V60 bešika	0, 001	0, 892
V65bešika	0, 004	0, 489
V70 bešika	-0, 001	0, 418
V72 bešika	-0, 032	0, 418
Srednja doza mokraćna bešika	0, 002	0, 922
Maksimalna doza mokraćna bešika	-0, 005	0, 905

Kod operisanih ispitanika, u univarijantnim linearnim mešovitim modelima nijedna od ispitivanih varijabli nije bila povezana sa stepenom kasne GU toksičnosti.

4.3. Rezultati istraživanja na prvoj grupi ispitanika

U prvi deo istraživanja uključena je grupa od 44 pacijenta lečenih zračnom terapijom u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije od januara 2016. do avgusta 2017. godine, bilo u radikalnom ili postoperativnom pristupu. Postupak istraživanja detaljno je opisan u poglavlju Materijal i metode, a ovde će biti predstavljeni rezultati naše studije.

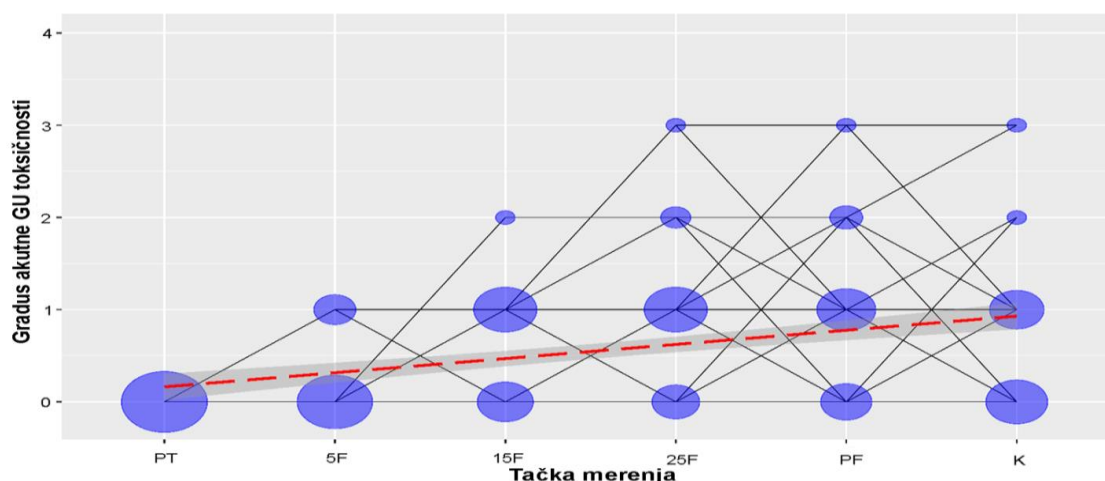
U tabeli 21 prikazane su individualne, kliničke, tumorske karakteristike i karakteristike radioterapije ispitivanih pacijenata.

Tabela 21. Individualne, kliničke, karakteristike tumora i karakteristike radioterapije

Varijabla	Deskripcija	Univarijantna analiza*	
		b	p
Starost; srednja vrednost ± SD	69.2±7.1	0.020	0.152
DM typ II Da Ne	10 (21.3%) 34	0.030	0.849
Pušački status Da Ne	23 (48.9%)	-0.176	0.204
Arterijska hipertenzija Da Ne	19 (40.4%)	0.018	0.895
Glison skor; Medijana (min,max)	7 (6-9)	-0.016	0.857
Rizična grupa za relaps 1 (nizak) 2 (srednji) 3 (visok)	3 (8.3%) 14 (38.9%) 19 (52.8%)	0.131	0.231
R1 resekcija	9 (75.0%)	-0.438	0.147
Tip radioterapije Postoperativna Radikalna	23 (52.3%) 21 (47.7%)	0.003	0.815

*Linearni mešoviti model (eng. Multilevel ordinal regresioni model) sa stepenom akutne genitourinarne toksičnosti kao zavisnom varijablom, prilagođeno za vreme praćenja i tip radioterapije. Zavisno od tipa varijabli i normalnosti raspodele, podaci su predstavljeni kao n (%), aritmetička sredina ± SD ili medijana (min-max).

Nakon 25 frakcija radioterapije, najčešći gradus akutne GU toksičnosti bio je 1, sa manjom stopom učestalosti gradusa 2 i 3, što je prikazano na grafiku 23.



Grafik 23. Promene gradusa akutne GU toksičnosti tokom vremena u različitim tačkama merenja: PT-pre terapije, 5F-nakon 5 frakcija radioterapije, 15F- nakon 15 frakcija radioterapije, 25F- nakon 25 frakcija radioterapije, PF- nakon poslednje frakcije, K- nakon 1 meseca od završetka radioterapije. Volumen kruga proporcionalan je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, sumacija krugova iznosi 100%. U tački PT, 100% pacijenata imao je gradus 0.

Promene nivoa citokina u serumu

Univarijantnom analizom nivoa cirkulišućih citokina pokazano je da koncentracije IL-2, IFN- γ i TGF- β 1 u serumu pacijenata sa karcinomom prostate teže rastu tokom radioterapije, ali bez statističke značajnosti. Povećanje koncentracije IL-6 u serumu pacijenata značajno je povezano sa višim gradusom akutne GU toksičnosti tokom vremena ($b = 0,018$; $p = 0,039$). Uočena je povezanost povišene koncentracije IL-2 i višeg gradusa akutne GU toksičnosti ($b = 0,018$; $p = 0,081$), iako nije bilo statističke značajnosti, što je predstavljeno u **tabeli 22**.

Tabela 22. Univarijantna analiza nivoa citokina u serumu kod pacijenata sa karcinomom prostate tokom radioterapije

Univarijantna analiza								
Koncentracija [pg/mL]	Pre tretmana	Nakon 5F	Nakon 15F	Nakon 25F	Nakon poslednje F	1 mesec nakon RT	B	P
IL-1 β	1.2 (0.1-4.1)	1.0 (0.2-4.3)	1.3 (0.3-4.2)	1.3 (0.3-4.3)	1.2 (0.3-4.5)	1.2 (0.2-4.8)	0.018	0.712
IL-2	1.9 (0.2-27.9)	1.8 (0.2-17.8)	1.6 (0.3-32.2)	2.1 (0.3-26.1)	1.8 (0.2-36.4)	1.8 (0.2-18.8)	0.018	0.081
IL-6	2.6 (0.3-14.3)	2.5 (0.2-29.3)	2.4 (0.2-40)	2.6 (0.2-33.8)	1.9 (0-58.6)	2.5 (0.1-17.3)	0.018	0.039
IFN- γ	8.1 (2.2-96.3)	9.8 (1.3-52.1)	8.8 (1.3-78)	8.3 (1.8-90.5)	8.4 (1.3-107.7)	6.8 (1.9-52.9)	0.004	0.138
TGF- β 1	42.7 (4.3-155)	43.1 (4.2-91)	46.3 (4.9-149.7)	44.6 (5.9-150.3)	45.6 (1.5-120.7)	41 (2.8-193.5)	0.001	0.516

* Linearni mešoviti model (eng. Multilevel ordinalni regresioni model) sa stepenom akutne GU toksičnosti kao zavisnom varijablom. Zavisno od tipa varijable, podaci su predstavljeni kao medijana (min-max).

Linearnim mešovitim modelom praćeno je da li promene u nivou IL-2 i IL-6 u serumu pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom mogu da predvide promene u stepenu

akutne GU toksičnosti kroz vreme. Analiza je pokazala da je povećanje nivoa IL-6 tokom radioterapije bilo značajno povezano sa višim gradusom akutne GU toksičnosti u vremenu ($b = 0,017$; $p = 0,046$), što je predstavljeno u **tabeli 23**.

Tabela 23. Linearni mešoviti model koncentracije citokina u serumu kod pacijenata sa karcinomom prostate

Parametar	Multivarijantna analiza*	
	b	p
IL-2	0.020	0.062
IL-6	0.017	0.046

* Linearni mešoviti model sa stepenom akutne GU toksičnosti kao zavisne varijable

Ovakav podatak za IL-2 koji je blizu statističke značajnosti, može se pripisati relativno malom broju pacijenata i/ili niskim gradusom toksičnosti tokom radioterapije u analiziranoj grupi pacijenata (7 pacijenata imalo je gr 2 i 3 toksičnost nakon 25 radioterapijskih frakcija, dok je 8 pacijenata imalo gr 2 i 3 na kraju radioterapijskog tretmana).

Moguće razlike u profilu cirkulišućih citokina i njihove veze sa nastankom akutne GU toksičnosti praćene su između pacijenata kod kojih je sprovedena radikalna zračna terapija i onih kod kojih je radioterapija sprovedena u nekom momentu nakon prostatektomije.

Nađeno je da su nivoi IL-6 i IFN- γ značajno viši u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena radikalna zračna terapija ($p = 0,001$) u odnosu na one kod kojih je zračna terapija sprovedena u postoperativnom pristupu ($p = 0,020$), što je prikazano u **tabeli 24**.

Tabela 24. Univarijantna analiza nivoa citokina u serumu u grupi radikalno zračenih i grupi operisanih zračenih pacijenata

	Konc. (pg/ml)	Pre RT	Nakon 5 f	Nakon 15f	Nakon 25f	Nakon poslednje f	1 mesec od rt	b	p
Radikalno zračeni	IL-1β	1.1 (0.1-4.1)	1.0 (0.3-4.3)	1.3 (0.3-4.2)	1.2 (0.3-3.4)	1.1 (0.3-4.3)	1.5 (0.4-3.4)	0.050	0.835
Operisani zračeni		1.4 (0.3-4.1)	1.1 (0.2-3.1)	1.3 (0.3-4.0)	1.3 (0.4-4.3)	1.2 (0.3-4.5)	1.0 (0.2-4.8)		
Radikalno zračeni	IL-2	1.8 (0.2-24.7)	2.1 (0.2-17.8)	1.6 (0.3-19.7)	2.1 (0.4-9.8)	1.7 (0.3-15.0)	1.7 (0.5-18.8)	-0.038	0.976
Operisani zračeni		1.9 (0.6-27.9)	1.7 (0.5-8.7)	1.6 (0.4-32.2)	1.9 (0.3-26.1)	1.8 (0.2-36.4)	1.8 (0.2-7.1)		
Radikalno zračeni	IL-6	4.9 (0.8-14.3)	4.6 (0.8-29.3)	3.5 (0.6-40.0)	4.8 (0.8-33.8)	4.7 (0.5-58.6)	5.2 (0.6-17.3)	4.597	0.001
Operisani zračeni		1.3 (0.3-4.7)	1.4 (0.2-6.2)	1.7 (0.2-11.7)	1.7 (0.2-8.4)	1.6 (0.04-8.5)	1.4 (0.1-12.3)		
Radikalno zračeni	IFN-γ	9.3 (2.2-96.3)	13.6 (1.3-52.1)	10.7 (1.3-78.0)	12.9 (1.8-90.5)	11.9 (1.3-107.7)	11.5 (1.9-52.9)	8.869	0.020
Operisani zračeni		7.5 (3.2-29.2)	7.7 (2.3-32.3)	7.4 (2.7-30.9)	8.3 (1.8-44.7)	7.4 (1.3-36.1)	5.1 (1.9-50.4)		
Radikalno zračeni	TGF-β1	41.3 (6.4-155.0)	43.1 (6.4-91.0)	51.3 (5.7-149.7)	38.5 (6.9-150.3)	42.5 (6.9-89.4)	32.0 (2.8-79.6)	-0.571	0.933
Operisani zračeni		43.4 (4.3-125.9)	44.9 (4.2-70.4)	43.7 (4.9-134.4)	47.3 (5.9-120.1)	51.6 (1.5-120.7)	52.6 (3.3-193.5)		

4.4. Rezultati istraživanja na drugoj grupi ispitanika

Istraživanje je sprovedeno kao nastavak prethodne studije i uključilo je grupu od 39 pacijenata koji su lečeni zračnom terapijom u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, bilo radikalnom radioterapijom ili radioterapijom u postoperativnom pristupu. Ispitivana je veza između nivoa citokina IL-6 i TGFβ-1 u serumu, individualnih i kliničkih karakteristika i nastanka GI i GU toksičnosti kao i zamora. Postupak istraživanja detaljno je opisan u poglavlju Matrijal i metode, a u ovom poglavlju biće predstavljeni rezultati naše studije.

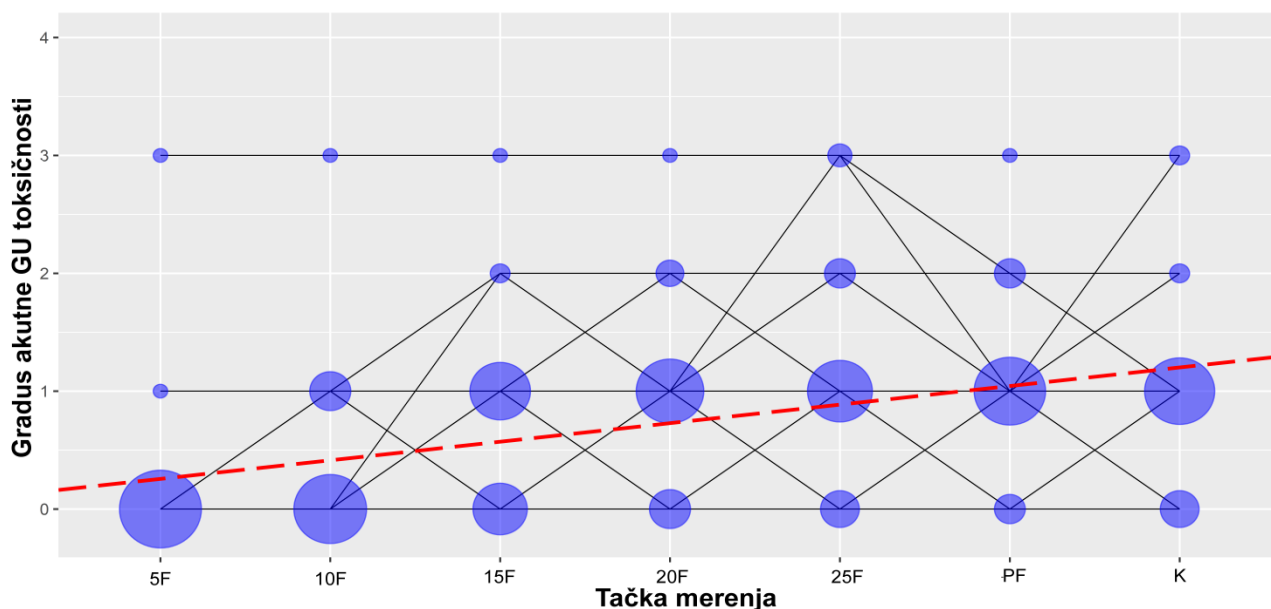
U **tabeli 25** prikazane su individualne, kliničke, tumorske karakteristike i karakteristike radioterapije ispitivanih pacijenata.

Tabela 25. Individualne, kliničke, tumorske karakteristike i karakteristike radioterapije

Broj pacijenata (n)	39
Starost; srednja vrednost ± SD	70.67 ± 6.7
Pušački status; n (%)	
Da	29 (74.4%)
Ne	10 (25.6%)
Konsumiranje alkohola; n (%)	
Da, redovno	1 (2.6%)
Periodično	23 (59%)
Ne	15 (38.5%)
Komorbiditeti; n (%)	
Diabetes mellitus	
Da	7 (17.9%)
Ne	32 (82.1%)
Hipertenzija	
Da	28 (71.8%)
Ne	11 (28.2%)
Operacije u abdomenu i karlici	
Da	17 (43.6%)
Ne	22 (56.4%)
Drugi maligniteti	
Da	3 (7.7%)
Ne	36 (92.3%)
PSA pre dijagnoze; mediana (min-max) ng/ml	10,0 (3,9-38,8)
PSA pre radioterapije; mediana (min-max)ng/ml	0,6 (0,1-14,3)
Glison skor; n (%)	
6	7 (17, 9%)
7	30 (76, 9%)
8	1 (2, 6%)
9	1 (2, 6)
T status; n (%)	
T2	27 (69.2%)
T3	12 (30.8%)
N status; n (%)	
N0	38 (97.4%)
N1	1 (2.6%)
Tip radioterapije; n (%)	
Radikalna	26 (66.7%)
Postoperativna	13 (33.3%)

Tehnika zračenja 3D-CRT VMAT	27 12
Doza volumen grupe; n (%) Prostata Prostata, semene vezikule (loža±SV) Prostata, semene vezikule, lgl (loža±SV+lgl)	5 (12.8%) 13 (33.3%) 21 (53.8%)
Grupe rizika Nizak rizik Srednji rizik Visok rizik	5 (12.8%) 26 (66.7%) 8 (20.5%)

Univarijantnom analizom promene gradusa akutne GU toksičnosti tokom radioterapije i mesec dana po završetku radioterapijskog lečenja, dobijeno je statistički značajno povećanje gradusa akutne GU toksičnosti tokom vremena u ispitivanoj grupi pacijenata ($b = 0,158$; $p < 0,001$), što je predstavljeno na grafiku 24.



Grafik 24. Promene gradusa akutne GU toksičnosti u vremenu (5F- posle 5. frakcije zračenja, 10F- posle 10. frakcije zračenja, 15F- posle 15. frakcije zračenja, 20F- posle 20. frakcije zračenja, 25F- posle 25. frakcije zračenja, PF- poslednja frakcija zračenja, K- 1 mesec po završetku radioterapije). Linija reprezentuje akutnu genitourinarnu toksičnost u vremenu. Volumen kruga proporcionalan je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, suma krugova iznosi 100%.

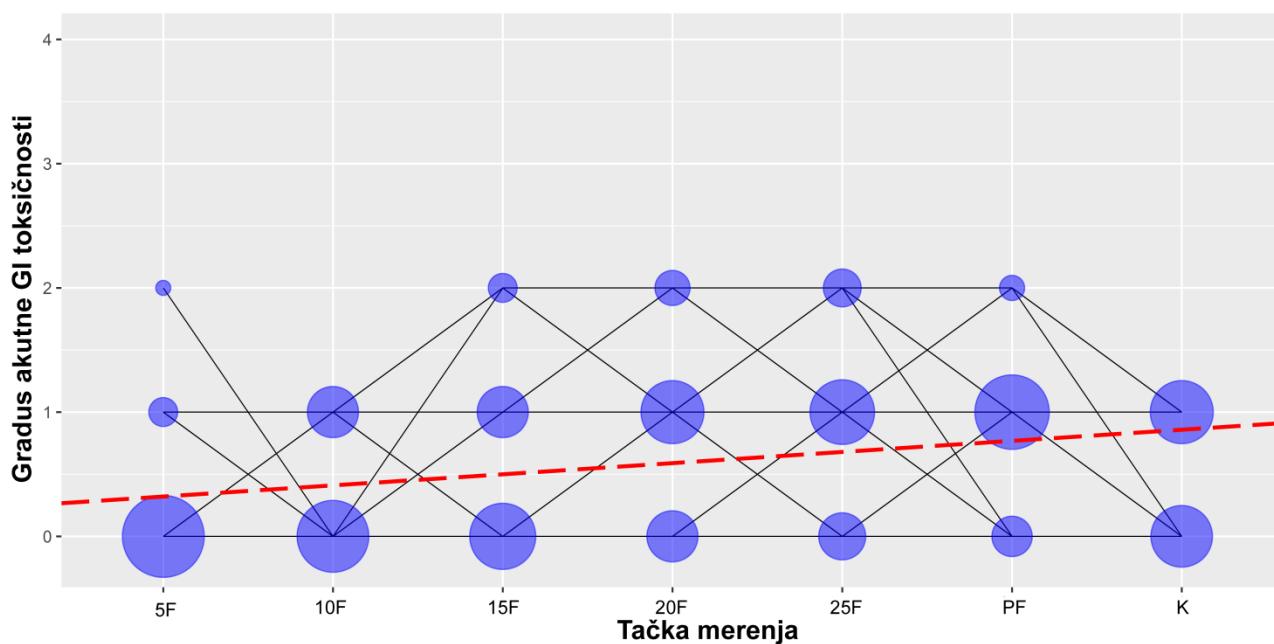
Veza između promena gradusa akutne GU toksičnosti tokom radioterapije i individualnih i kliničkih karakteristika pacijenata prikazana je u **tabeli 26**. Nađena je značajna pozitivna povezanost između gradusa akutne GU toksičnosti tokom radioterapije i prisustva Diabetes mellitusa u ispitivanoj grupi pacijenata ($b = 0,540$; $p < 0,007$).

Tabela 26. Veza između izmene gradusa akutne GU toksičnosti tokom radioterapije i individualnih i kliničkih karakteristika pacijenata

Parametar	Univarijantna analiza *	
	b	p
Pušački status-pušači	0.126	0.494
Konsumacija alkohola	-0.259	0.116
Diabetes mellitus	0.540	0.007
Arterijska hipertenzija	0.107	0.549
Operacije u abdomenu/karlici	-0.181	0.255

* Linearni mešoviti model sa stepenom toksičnosti kao zavisnom varijablom, kontrolisan za tip radioterapije

Univarijantnom analizom promene gradusa akutne GI toksičnosti tokom radioterapije i mesec dana po završetku radioterapijskog lečenja, dobijeno je statistički značajno povećanje gradusa akutne GI toksičnosti tokom vremena u ispitivanoj grupi pacijenata ($b = 0,090$; $p < 0,001$), što je predstavljeno na grafiku 25.



Grafik 25. Izmene gradusa akutne GI toksičnosti u vremenu (5F- posle 5. frakcije zračenja, 10F- posle 10. frakcije zračenja, 15F- posle 15. frakcije zračenja, 20F- posle 20. frakcije zračenja, 25F- posle 25. frakcije zračenja, PF- poslednja frakcija zračenja, K- 1 mesec po završetku radioterapije). Linija predstavlja akutnu genitourinarnu toksičnost u vremenu. Volumen kruga proporcionalan je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, suma krugova iznosi 100%.

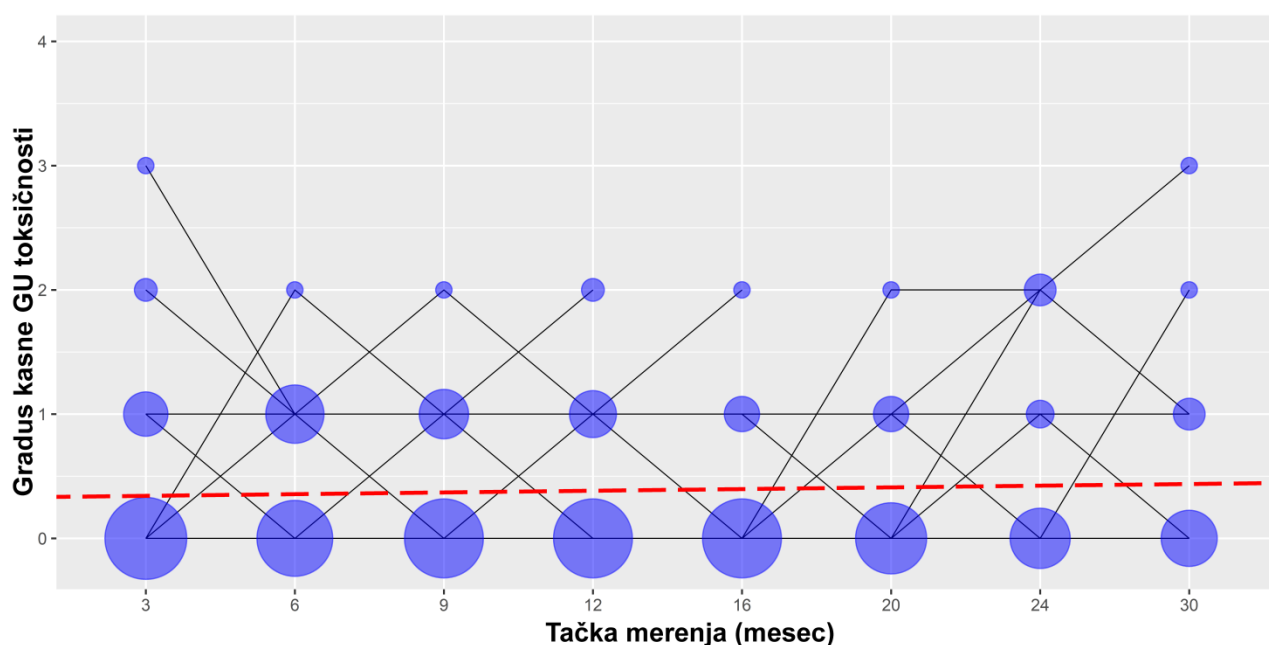
Univarijantnom analizom nije nađena statistički značajna povezanost između promena gradusa akutne GI toksičnosti tokom radioterapije i individualnih i kliničkih karakteristika u ispitivanoj grupi pacijenata, što je prikazano u tabeli 27.

Tabela 27. Veza između izmene gradusa akutne GI toksičnosti tokom radioterapije i individualnih i kliničkih karakteristika

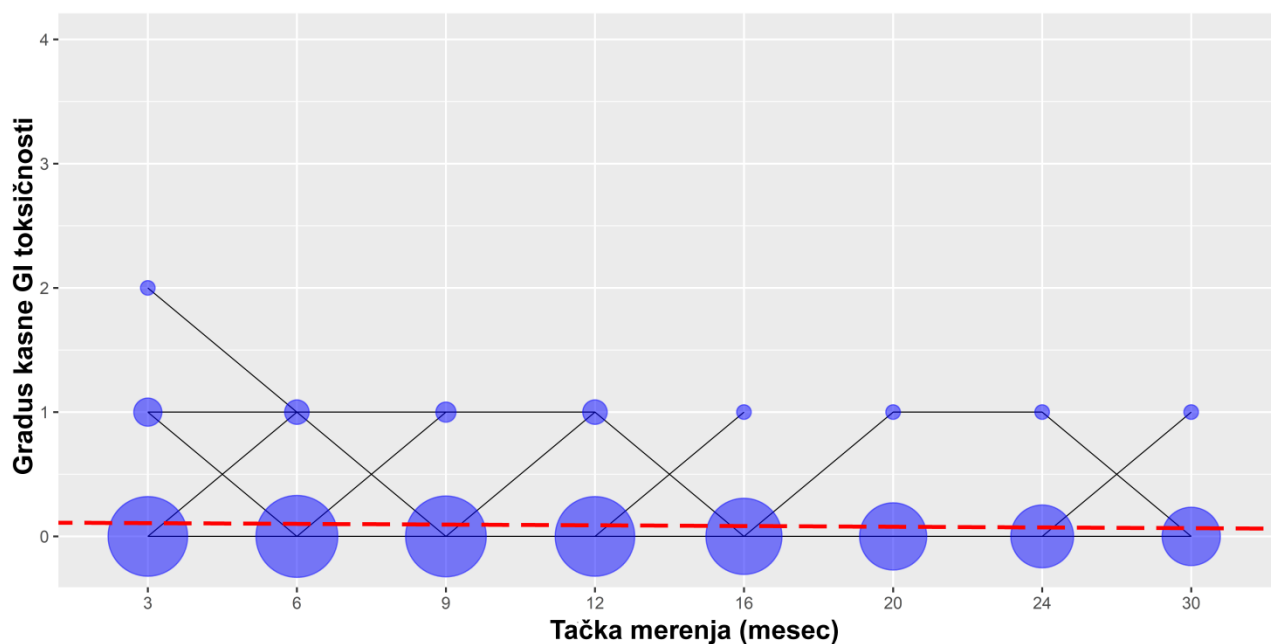
Parametar	Univarijantna analiza *	
	b	p
Pušački status-pušači	0.047	0.729
Konsumacija alkohola	-0.096	0.432
Diabetes mellitus	0.000	1.000
Arterijska hipertenzija	-0.050	0.704
Operacije u abdomen/ karlici	0.102	0.385

* Linearni mešoviti model sa stepenom toksičnosti kao zavisnom varijablom

Univarijantnom analizom promena gradusa kasne GU toksičnosti 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24 i 30 meseci nakon radioterapije u ispitivanoj kohorti nisu nađene statistički značajne promene kasne GU toksičnosti u vremenu ($b = 0,014$; $p = 0,368$) kao ni statistički značajne promene kasne GI toksičnosti u vremenu ($b = -0,006$; $p = 0,430$), što je predstavljeno na graficima 26 i 27.



Grafik 26. Promene gradusa kasne GU toksičnosti 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24 i 30 meseci nakon radioterapije. Linija predstavlja promenu gradusa kasne GU toksičnosti u vremenu. Volumen kruga proporcionalan je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, suma krugova iznosi 100%.



Grafik 27. Promene gradusa kasne GI toksičnosti 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24 i 30 meseci nakon radioterapije. Linija predstavlja promenu gradusa kasne GI toksičnosti u vremenu. Volumen kruga proporcionalan je broju pacijenata. U svakoj tački merenja, suma krugova iznosi 100%.

Promene nivoa citokina u serumu

Koncentracije IL-6 i TGF- β 1 u serumu pacijenata u drugoj grupi određivani su pre radioterapije i nakon 25 radioterapijske frakcije. U ispitivanoj grupi, nivo IL-6 značajno je bio veći nakon 25. frakcije u poređenju sa nivoom ovog citokina pre radioterapijskog tretmana ($p < 0,00001$). Nije utvrđena značajna razlika između koncentracije TGF- β 1 u serumu nakon 25. frakcije u odnosu na njegovu koncentraciju pre radioterapije. Ovi rezultati prikazani su u **tabeli 28**.

Tabela 28. Koncentracije IL-6 i TGF- β 1 u serumu kod pacijenata sa karcinomom prostate pre radioterapije i nakon 25. radioterapijske frakcije

Citokini	Pre radioteraije	Nakon 25.RT frakcije	p vrednost
	Koncentracija [pg/mL] median (minimum-maksimum)		
IL-6	4.60 (0.78-41.68)	6.26 (2.32-49.34)	<0.00001
TGF-β	9152.78 (1600.27-37421.78)	8104.36 (2465.12-20718.88)	0.136

Ispitivana je moguća korelacija između maksimalnog gradusa akutne GU toksičnosti, maksimalnog gradusa akutne GI toksičnosti, maksimalnog zamora i koncentracija IL-6 i TGF- β 1 u serumu kod pacijenata sa karcinomom prostate lečenih radioterapijom, čiji su rezultati prikazani u **tabeli 29**.

Tabela 29. Korelacija između maksimalnog gradusa akutne GU toksičnosti, maksimalnog gradusa akutne GI toksičnosti, maksimalnog zamora i koncentracija IL-6 i TGF- β 1 u serumu kod pacijenata sa karcinomom prostate lečenih radioterapijom

Varijabla 1	Varijabla 2	Koeficijent korelacije	p vrednost
Maksimalan gradus GU toksičnosti	Maksimalan gradus GI toksičnosti	0.09	0.594
Maksimalan gradus GU toksičnosti	Maksimalan skor zamora	0.15	0.353
Maksimalan gradus GI toksičnosti	Maksimalan skor zamora	0.26	0.117
Koncentracija IL-6 pre tretmana	Maksimalan gradus GU toksičnosti	0.31	0.054
Koncentracija IL-6 pre tretmana	Maksimalan gradus GI toksičnosti	0.10	0.548
Koncentracija IL-6 pre tretmana	Maksimalan skor zamora	0.35	0.032
Koncentracija IL-6 nakon 25.frakcije	Maksimalan gradus GU toksičnosti	0.21	0.199
Koncentracija IL-6 nakon 25.frakcije	Maksimalan gradus GI toksičnosti	0.08	0.640
Koncentracija IL-6 nakon 25.frakcije	Maksimalan skor zamora	0.29	0.069
Koncentracija TGF- β 1 pre tretmana	Maksimalan gradus GU toksičnosti	0.34	0.036
Koncentracija TGF- β 1 pre tretmana	Maksimalan gradus GI toksičnosti	0.06	0.724
Koncentracija TGF- β 1 pre tretmana	Maksimalan skor zamora	0.19	0.257
Koncentracija TGF- β 1 nakon 25.frakcije	Maksimalan gradus GU toksičnosti	0.31	0.052
Koncentracija TGF- β 1 nakon 25.frakcije	Maksimalan gradus GI toksičnosti	0.10	0.535
Koncentracija TGF- β 1 nakon 25.frakcije	Maksimalan skor zamora	0.29	0.074

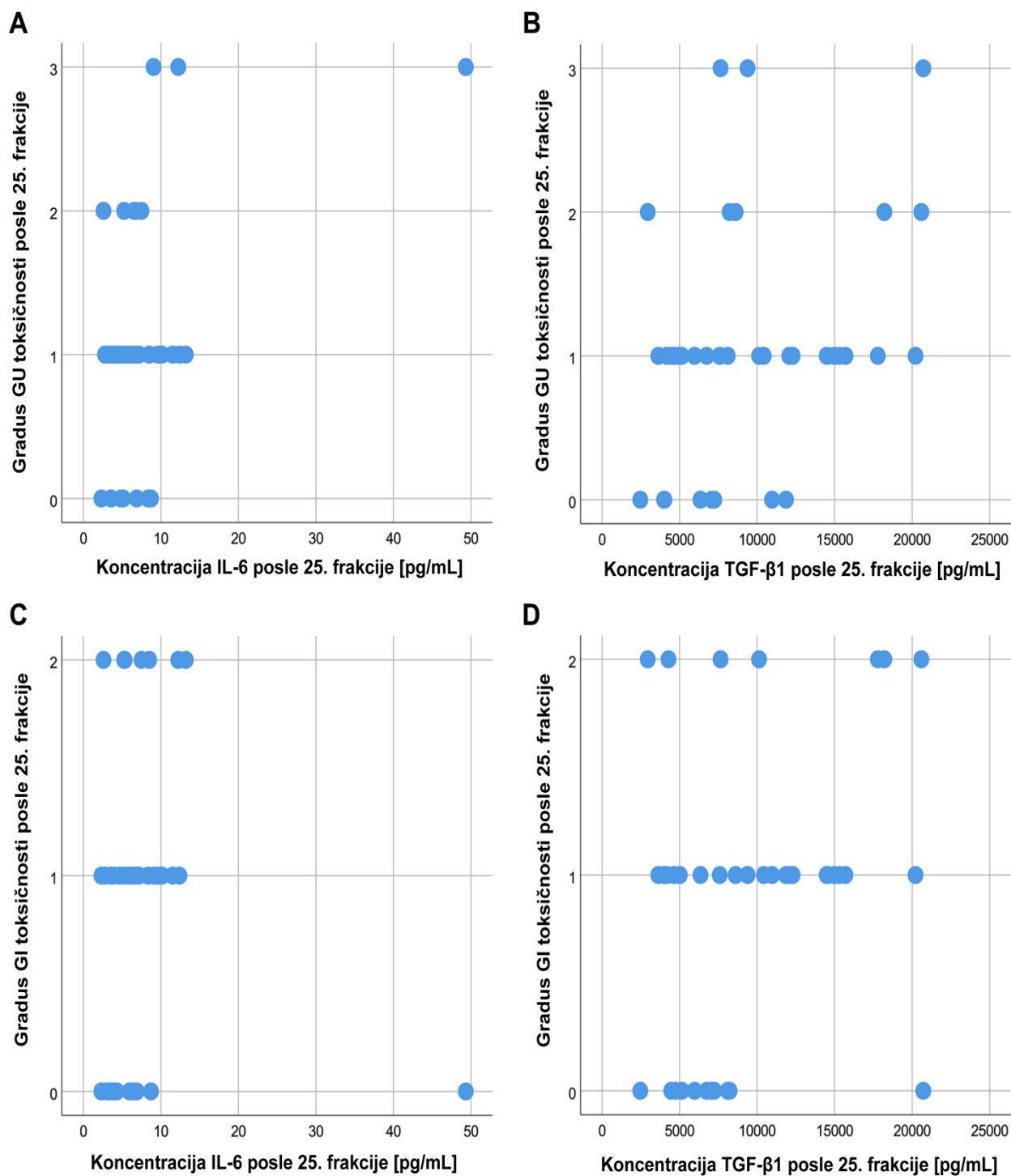
Nađena je statistički značajna pozitivna korelacija između nivoa IL-6 u serumu pre radioterapije i maksimalnog skora zamora ($p = 0,032$) kao i statistički značajna pozitivna veza između nivoa TGF- β 1 u serumu pre radioterapije i maksimalnog gradusa akutne GU toksičnosti ($p = 0,036$). Koncentracija TGF- β 1 u serumu nakon 25. frakcije bila je pozitivno asocirana sa maksimalnim gradusom GU toksičnosti, iako je povezanost bila blizu granice statističke značajnosti ($b = 0,31$, $p = 0,052$).

Ispitivana je moguća korelacija između gradusa akutne GU toksičnosti, gradusa akutne GI toksičnosti, zamora i koncentracija IL-6 i TGF- β 1 u serumu nakon 25. frakcije kod pacijenata sa karcinomom prostate lečenih radioterapijom, čiji su rezultati prikazani u **tabeli 30**.

Tabela 30. Korelacija između maksimalnog gradusa akutne GU toksičnosti, maksimalnog gradusa akutne GI toksičnosti, maksimalnog zamora i koncentracija IL-6 i TGF- β 1 u serumu nakon 25. frakcije kod pacijenata sa karcinomom prostate lečenih radioterapijom

Varijabla 1	Varijabla 2	Koeficijent korelacije	p vrednost
Gradus GU toksičnosti nakon 25.frakcije	Gradus GI toksičnosti nakon 25.frakcije	0.27	0.095
Gradus GI toksičnosti nakon 25.frakcije	Skor zamora nakon 25.frakcije	0.32	0.051
Gradus GU toksičnosti nakon 25.frakcije	Skor zamora nakon 25.frakcije	0.41	0.009
Koncentracija IL-6 nakon 25.frakcije	Gradus GU toksičnosti nakon 25.frakcije	0.30	0.063
Koncentracija IL-6 nakon 25.frakcije	Gradus GI toksičnosti nakon 25.frakcije	0.24	0.147
Koncentracija IL-6 nakon 25.frakcije	Skor zamora nakon 25.frakcije	0.33	0.042
Koncentracija TGF- β 1 nakon 25.frakcije	Gradus GU toksičnosti nakon 25.frakcije	0.32	0.044
Koncentracija TGF- β 1 nakon 25.frakcije	Gradus GI toksičnosti nakon 25.frakcije	0.24	0.145
Koncentracija TGF- β 1 nakon 25.frakcije	Skor zamora nakon 25.frakcije	0.24	0.149

Nađena je statistički značajna korelacija između gradusa GU toksičnosti nakon 25. frakcije i skora zamora nakon 25. frakcije ($p = 0,009$). Takođe je nađena značajna pozitivna korelacija između nivoa IL-6 u serumu nakon 25. frakcije i skora zamora nakon 25. frakcije ($p = 0,042$). Utvrđena je i statistički značajna pozitivna povezanost koncentracije TGF- β 1 u serumu nakon 25. frakcije i gradusa GU toksičnosti nakon 25. frakcije ($p=0,044$). Pozitivna korelacija između IL-6 u serumu nakon 25. frakcije i gradusa GU toksičnosti nakon 25. frakcije je takođe nađena, ali bez statističke značajnosti ($p=0,063$). Na grafiku 28, predstavljene su korelacije između gradusa akutne GU i GI toksičnosti nakon 25. frakcije i koncentracija IL-6 ili TGF- β 1 nakon 25. frakcije.



Grafik 28. Korelacija između gradusa akutne genitourinarne (GU) toksičnosti (A, B), gradusa akutne gastrointestinalne (GI) toksičnosti (C, D) i koncentracija IL-6 i TGF-β1 u serumu nakon 25 frakcija.

Univarijantnom analizom nije nađena statistički značajna povezanost između promena nivoa cirkulišućih IL-6 i TGF-β1 u serumu i gradusa akutne GU i GI toksičnosti tokom radioterapije, kao ni značajna povezanost između promena nivoa IL-6 i TGF-β1 u serumu i gradusa kasne GU i GI toksičnosti procenjene između 3-eg i 30-og meseca nakon radioterapije (**tabela 31**)

Tabela 31. Povezanost izmena nivoa IL-6 i TGF- β 1 u serumu i nastanka GU i GI toksičnosti u vremenu

Parametri	Univarijantna analiza*	
	b	p
Izmene nivoa IL-6 i gradusa akutne GU toksičnosti	0,017	0,559
Izmene u nivou TGF- β 1 i gradusa akutne GU toksičnosti	< -0,001	0,672
Izmene nivoa i gradusa akutne GI toksičnosti	0,013	0,558
Izmene u nivou TGF- β 1 i gradusa akutne GI toksičnosti	< 0,001	0,305
Izmene nivoa IL-6 i gradusa kasne GU toksičnosti	0,009	0,750
Izmene u nivou TGF- β 1 i gradusa kasne GI toksičnosti	< 0,001	0,351
Izmene nivoa IL-6 i gradusa kasne GU toksičnosti	0,018	0,105
Izmene u nivou TGF- β 1 i gradusa kasne GI toksičnosti	< -0,001	0,656

* Linearni mešoviti model sa stepenom toksičnosti kao zavisnom varijablom

Takođe, nije nađena povezanost između izmena nivoa IL-6 i TGF- β 1 u serumu i maksimalnog gradusa kasne GU i GI toksičnosti. Međutim, negativna korelacija blizu statističke značajnosti nađena je između nivoa TGF- β 1 nakon 25 frakcija i maksimalnog gradusa kasne GI toksičnosti (p=0,052).

4.5. Ispitivanje veze između promene nivoa miR-21/146a/155 i razvoja genitourinarne toksičnosti

Pilot studija u kojoj je ispitivana veza između promena nivoa miR-21, miR-146a i miR-155 i akutne genitourinarne toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate, uključila je 15 pacijenata lečenih zračnom terapijom u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. U ovoj studiji, ispitivana je veza između izmena nivoa miR-21, miR-146a i miR-155 i akutne genitourinarne toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate.

U poglavlju Materijal i metode, detaljno je objašnjena metodologija istraživanja, a u ovom delu biće prikazani rezultati našeg istraživanja. Individualne i kliničke karakteristike ispitanika, prikazane su u **tabeli 32.**

Tabela 32. Individualne i kliničke karakteristike pacijenata i akutna genitourinarna toksičnost

Individualne i kliničke karakteristike	N, %, Srednja vrednost ± SD	Razlike između grupa sa i bez toksičnosti, p vrednost
Broj pacijenata	15	
Bez GU toksičnosti	6	
Sa GU toksičnošću	9	
Starost (srednja vrednost) ± standardna devijacija		
Bez GU toksičnosti	68 ± 5.40	0,450
Sa GU toksičnošću	70.57 ± 6.29	
Pušači status		
Pušači		
Bez GU toksičnosti	33.3%	0,315
Sa GU toksičnošću	66.7%	
Nepušači		
Bez GU toksičnosti	66.7%	
Sa GU toksičnošću	33.3%	
Diabetes mellitus		
Da		
Bez GU toksičnosti	16.7%	0,400
Sa GU toksičnošću	0.0%	
Ne		
Bez GU toksičnosti	83.3%	
Sa GU toksičnošću	100.0%	
Arterijska hipertenzija		
Da		1,000
Bez GU toksičnosti	66.7%	
Sa GU toksičnošću	55.6%	
Ne		
Bez GU toksičnosti	33.3%	
Sa GU toksičnošću	44.4%	

U **tabeli 33** prikazane su karakteristike tumora, karakteristike radioterapije i akutna genitourinarna toksičnost

Tabela 33. Karakteristike tumora, radioterapije i akutna genitourinarna toksičnost

Karakteristike tumora	N,%,(minimum-maximum)	Razlike između grupa sa i bez toksičnosti, p vrednost
Glison skor medijana (minimum-maksimum)		
Bez toksičnosti	7.50 (6-9)	0,313
Sa toksičnošću	7 (6-8)	
Rizična grupa		
Nizak rizik		
Bez toksičnosti	16.7%	1,000
Sa toksičnošću	11.1%	
Srednji rizik		
Bez toksičnosti	16.7%	
Sa toksičnošću	22.2%	
Visok rizik		
Bez toksičnosti	66.7%	
Sa toksičnošću	66.7%	
Tip radioterapije		
Radikalna		
Bez toksičnosti	33.3%	1,000
Sa toksičnošću	44.4%	
Salvage/Postoperativna		
Bez toksičnosti	66.7	
Sa toksičnošću	55.6	

U ovoj studiji, određivani su nivoi ekspresije tri miRNK, miR-21, miR-146a i miR-155 kod 15 pacijenata sa karcinomom prostate, u tri tačke (pre radioterapije-PRT, nakon radioterapije- NRT, odnosno posle poslednje frakcije i na prvoj kontroli - PK po završenom lečenju, odnosno mesec dana nakon radioterapije).

Kod 9 pacijenata postojala je akutna GU toksičnost (gradus 1-3), dok 6 pacijenata nije imalo simptome akutne GU toksičnosti (gradus 0) u ispitivanim tačkama.

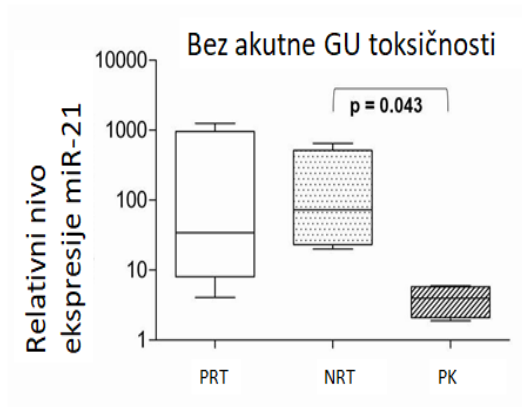
4.5.1. Individualne i kliničke karakteristike i akutna GU toksičnost

Kao što se može videti iz tabela 32 i 33, nije nađena statistički značajna povezanost u grupama pacijenata podeljenih prema tome da li je ispoljena ili ne akutna GU toksičnost, sa individualnim i kliničkim karakteristikama kao što su starost pri dijagnozi, pušački status, dijabetes mellitus i hronična hipertenzija. Takođe, nije nađena statistički značajna povezanost između nastanka akutne GU toksičnosti i Glison skora, grupa rizika za relaps bolesti i tipa radioterapije.

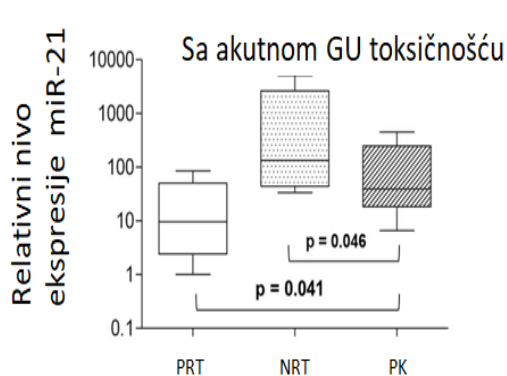
4.5.2. Nivoi ekspresije miR-21, miR-146a i miR-155 pre, nakon radioterapije i na prvoj kontroli

U grupi pacijenata bez ispoljene akutne GU toksičnosti, značajno viši nivo miR-21 detektovan je nakon poslednje radioterapijske frakcije u odnosu na nivo nakon prve kontrole ($p = 0,043$), što je prikazano na grafiku 29A.

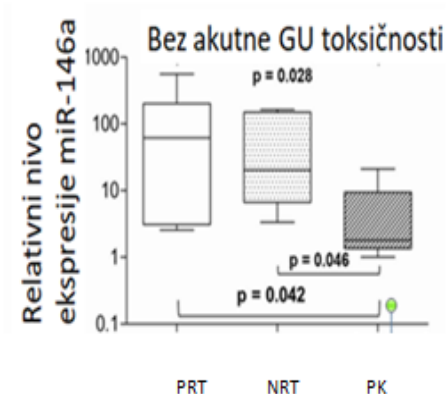
A



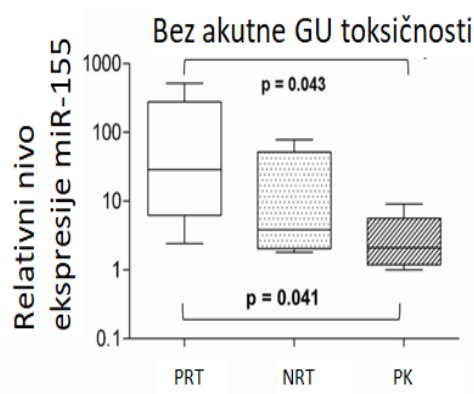
B



C



D



Grafik 29. Razlike u nivoima ekspresije miR-21, miR-146a i miR-155 pre radioterapije-PRT, nakon poslednje frakcije radioterapije-NRT, na prvoj kontroli-PK. A- promene nivoa ekspresije miR-21 unutar grupe pacijenata bez ispoljene GU toksičnosti. B- promene nivoa ekspresije miR-21 unutar grupe pacijenata sa ispoljenom GU toksičnošću. C- promene nivoa ekspresije miR-146a unutar grupe pacijenata bez ispoljene GU toksičnosti. D- promene nivoa ekspresije miR-155 unutar pacijenata bez ispoljene GU toksičnosti.

Uočeno je postojanje višeg nivoa miR-21 kod pacijenata sa ispoljenom GU toksičnošću u odnosu na grupu bez ispoljene GU toksičnosti nakon prve kontrole ($p=0,068$), što je predstavljeno u **tabeli 34**. Dobijeni podatak nije bio statistički značajan, iako je postojao trend ka statističkoj značajnosti.

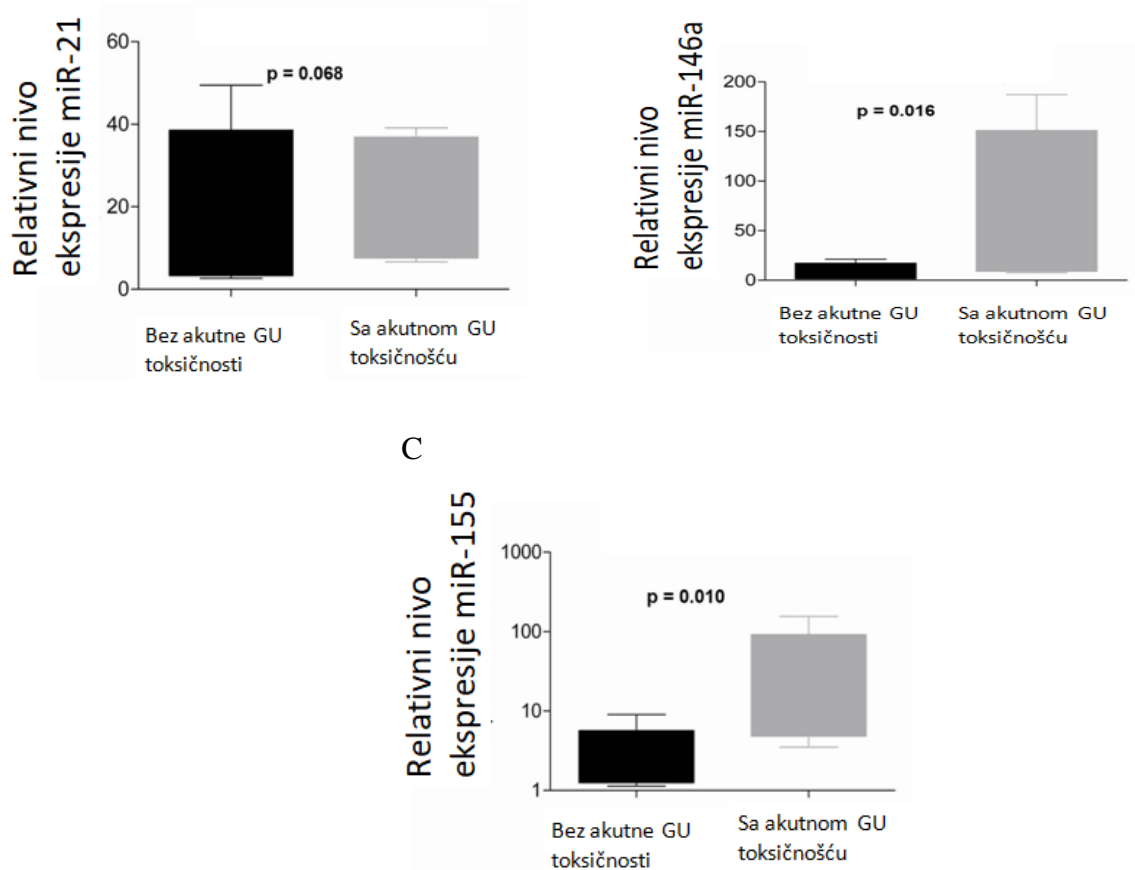
Tabela 34. Razlike u nivoima ekspresije miR-21, miR-146a i miR-155 između pacijenata bez i sa akutnom GU toksičnošću, u tačkama pre radioterapije, nakon radioterapije i na prvoj kontroli

^a Relativni nivo ekspresije miR-21			
	Bez akutne GU toksičnosti	Sa akutnom GU toksičnošću	p vrednost
PRT		26.59 (1.00-1871.00)	0,661
NRT	38.84 (4.05-1258.00)	179.83 (33.72-5141.00)	0,289
PK	128.01 (20.03-647.34)	34.57 (6.61-454.90)	0,068
p vrednost	5.23 (1.89-49.45) 0.105	0.041	
^a Relativni nivo ekspresije miR-146			
	Bez akutne GU toksičnosti	Sa akutnom GU toksičnošću	p vrednost
PRT		5.78 (0.001-3986.76)	0,724
NRT	61.76 (2.56-560.28)	53.97 (6.58-391.54)	0,556
PK	20.33 (3.35-163.71)	18.29 (6.71-187.27)	0,016
p vrednost	1.79 (1.00-21.21) 0.042	0.311	
^a Relativni nivo ekspresije miR-155			
	Bez akutne GU toksičnosti	Sa akutnom GU toksičnošću	p vrednost
PRT		3.96 (1.64-2757.22)	0,549
NRT	28.70 (2.41-520.3)	11.71 (2.43-153.17)	0,157
PK	3.07 (1.63-78.36)	21.16 (3.52-155.552)	0,010
p vrednost	1.73 (1.00-9.06) p = 0.041	p = 0.867	

*GU-genitourinarna; PRT- pre radioterapije; NRT- nakon radioterapije; PK- prva kontrola; ^aMedijana vrednost ekspresije miR-21, miR-146a i miR-155 sa minimumom i maksimumom u zagradi, p vrednost $\leq 0,05$ smatra se značajnom prema rezultatima Wilcoxon's testa (između 2 grupe) i Friedman's testa za poređenje 3 grupe. P vrednost između 0, 1 i 0,05 smatra se statističkim trendom

Kod pacijenata sa ispoljenom GU toksičnošću, statistički značajno viši nivoi ekspresije miR-21, primećeni su nakon poslednje radioterapijske frakcije u odnosu na nivoe na prvoj kontroli, mesec dana nakon radioterapije (p = 0,046, grafik 29B).

U grupi pacijenata bez ispoljene akutne GU toksičnosti, najniži nivoi miR-146a, nađeni su u PK tački praćenja, odnosno nakon prve kontrole u poređenju sa PRT i NRT tačkama praćenja, odnosno pre i nakon radioterapije, redom (p = 0,028, p = 0,046, grafik 29C). Pacijenti sa ispoljenom GU toksičnošću, imali su značajno više nivoe miR-146a u poređenju sa pacijentima bez ispoljene GU toksičnosti, u PK tački praćenja, odnosno nakon prve kontrole (p = 0,016, Tabela 34, Grafik 30B).



Grafik 30. Razlike u nivoima ekspresije miR-21 (A), miR-146a (B) i miR-155 (C) na PK tački praćenja između grupa pacijenata sa i bez ispoljene GU toksičnosti

Nivoi miR-155 bili su značajno niži u PK tački praćenja, odnosno nakon prve kontrole, u poređenju sa PRT tačkom praćenja, odnosno pre radioterapije, kod pacijenata bez ispoljene GU toksičnosti ($p = 0,041$, Grafik 29D), a značajno viši nivoi nađeni su u grupi pacijenata sa ispoljenom GU toksičnošću u poređenju sa pacijentima bez ispoljene GU toksičnosti, u PK tački praćenja ($p = 0,010$, Tabela 34, Grafik 30C).

4.5.3. Korelacija između nivoa miR-21, miR-146a i miR-155

S obzirom na čestu koaktivaciju ekspresije miR-146a i miR-155 u imunskom odgovoru na jonizujuće zračenje, ispitivana je potencijalna korelacija između ove dve miRNK i poređena sa nivoima miR-21, zbog potencijalnog sinergističkog efekta.

Značajna pozitivna korelacija je nađena između miR-21 i miR-146a u sve tri tačke, redom ($p = 0,001$, $\rho = 0,819$, $p = 0,011$, $\rho = 0,636$, $p = 0,001$, $\rho = 0,867$, Spearmanov koeficijent korelacije ranga, Tabela 35) i takođe između miR-21 i miR-155 ($p = 0,026$, $\rho = 0,636$, $p = 0,025$, $\rho = 0,575$, $p < 0,001$, $\rho = 0,891$, redom, Spearmanov koeficijent korelacije ranga, tabela 35).

Značajna pozitivna korelacija nađena je između miR-146a i miR-155 u sve tri tačke, redom (PRT, NRT i PK, $p < 0,001$ $\rho = 0,912$, $p < 0,001$ $\rho = 0,875$, $p < 0,001$ $\rho = 0,951$, Spearmanov koeficijent korelacije ranga, **tabela 35**).

Tabela 35. Značajne korelcije između nivoa miR-21, miR-146a i miR-155

Varijabla 1	Varijabla 2	N ¹	Tačka merenja	Koeficijent korelacije ²	P vrednost
miR-21	miR-146a	13	PRT	rho= 0,819	p=0,001
miR-21	miR-155	12	PRT	rho= 0,636	p=0,026
miR-21	miR-146a	15	NRT	rho=0,636	
miR-21	miR-155	15	NRT	rho=0,575	p=0,011
miR-21	miR-146a	10	PK	rho=0,867	
miR-21	miR-155	11	PK	rho=0,891	p=0,025
miR-146a	miR-155	14	PRT	rho=0,912	
miR-146a	miR-155	15	NRT	rho=0,875	p=001
miR-146a	miR-155	12	PK	rho=0,951	p<0,001
					p<0,001
					p<0,001
					p<0,001
					p<0,001

*N¹- broj pacijenata. Koeficijent korelacije² . p vrednost ≤ 0.05 smatra se značajnom. PRT - pre radioterapije; NRT - nakon radioterapije; PK - prva kontrola.

5. DISKUSIJA

Karcinom prostate je oboljenje sa visokom stopom izlečenja u lokalizovanom stadijumu bolesti i očekivanim dugogodišnjim preživljavanjem, zbog čega je obezbeđivanje dobrog kvaliteta života nakon lečenja ovih pacijenata od neprocenjive važnosti. Predikcija radijacionog morbiditeta kao posledica primene radioterapije vrlo je aktuelna tema među naučnicima iz ove oblasti. Zato je za nas kao istraživače, ispitivanje toksičnosti izazvane radioterapijom bio veliki izazov. Brojni autori bavili su se utvrđivanjem mehanizama nastanka neželjenih dejstava radioterapije. Ispitivan je uticaj individualnih osobina poput starosne dobi, konzumacije alkohola, pušenja, indeksa telesne mase i drugih, zatim kliničkih karakteritika kao što su različiti komorbiditeti, prethodne operacije, terapija koju pacijent uzima itd. Od dozimetrijskih faktora koji takođe mogu imati uticaja za nastanak neželjenih dejstava radioterapije, ispitivano je kako tip radioterapije, tehnika zračenja, ukupno propisana doza, režim frakcionisanja, doza koju prime okolni organi gastrointestinalnog i genitourinarnog trakta utiču na nastanak toksičnosti. Ispitivani su i brojni biološki faktori pod pretpostavkom da mogu imati uticaja na razvoj toksičnih efekata radioterapije. Cilj svih ovih istraživanja bio je pokušaj da se pronađu predikcioni modeli za nastanak toksičnosti primenljivi u kliničkoj praksi. Time bi se značajno olakšalo donošenje odluke o modalitetu lečenja koji je najadekvatnije primeniti kod svakog pacijenta ponaosob i eventualne modifikacije radioterapiskog tretmana.

Našim istraživanjem pokušali smo da dođemo do novih saznanja iz oblasti radijacione onkologije i radiobiologije koja omogućavaju bolje razumevanje mehanizma nastanka toksičnosti i identifikaciju molekularnih prediktora radijacione toksičnosti, što je u savremenoj radijacionoj onkologiji veoma aktuelno pitanje.

Podaci iz literature govore da neki autori akutnu toksičnost definišu kao onu koja se ispolji tokom tretmana, odnosno unutar 90 dana nakon završenog radioterapijskog lečenja, dok se kasnom radijacionom toksičnošću smatra ona koja se javlja nakon tog perioda ili pak u toku lečenja, ali koja traje i posle 90 dana od početka lečenja (72). Drugi autori, pak, radijacionu toksičnost dele na akutnu i kasnu u zavisnosti da li se ona ispoljila pre ili nakon 6 meseci od završenog radioterapijskog tretmana (73).

U našem istraživanju akutnom radijacionom toksičnošću smatrali smo toksičnost koja se manifestovala do 120 dana od početka radioterapijskog tretmana, dok smo kasnom radijacionom toksičnošću smatrali onu koja se ispoljila nakon toga (70,71).

S obzirom da su različiti istraživači propisivali različite doze zračenja na ciljne volumene tokom lečenja pacijenata sa karcinomom prostate radioterapijom, različite režime frakcionisanja, od standardne dnevne doze 1,8-2Gy do hipofrakcionisanih režima sa visokom dnevnom dozom od 2,4-6Gy, različite tehnike zračenja od 3DCRT, preko IMRT, VMAT i SBRT tehnike, rezultati toksičnosti među različitim studijama često nisu u potpunosti uporedivi zbog nehomogenosti grupa.

Pregledom objavljenih radova, može se zaključiti da su brojni autori diskutovali o vezi između akutne i kasne radijacione toksičnosti. Jereczek-Fossa i saradnici ispitivali su povezanost akutne i kasne radijacione toksičnosti kod 973 pacijenta sa karcinomom prostate koji su tretirani 3D konformalnom radioterapijom sa medijanom totalne doze 76Gy (opseg 34-82Gy) i dnevnom dozom od 2Gy. Oni su pronašli da nakon medijane praćenja od 25, 5 meseci (0-129 meseci), kasna GI i GU toksičnost koreliraju sa akutnim radijacionim oštećenjem GI i GU trakta ($p < 0,001$) (125). Takođe, Stanković i saradnici pronašli su da je pojava akutne GU toksičnosti imala značajan uticaj na razvoj kasne GU toksičnosti ($p = 0,024$) (95). Mathieu i saradnici ispitivali su nastanak kasne urinarne toksičnosti kod 965 pacijenata sa medijanom propisane doze 70Gy (opseg 65-80 Gy) i dnevnom dozom od 2-2,5Gy. Njihovim istraživanjem nađeno je da incidencija simptoma kasne urinarne toksičnosti raste nakon radioterapije, dosežući stopu od 24% i 7% za 10 godina, gradus ≥ 2 , odnosno ≥ 3 , redom (126). Međutim, Schmid i saradnici pokazali su da je većina urinarnih simptoma nakon radioterapije tranzitorna (127). U našem istraživanju na celoj grupi ispitanika, sa medijanom praćenja 30 meseci, u grupi radikalno zračenih pacijenata koja je uključila 51 ispitanika, sa propisanom dozom 72Gy, 2 Gy po frakciji, postojao je statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GI i

GU toksičnosti u vremenu ($b=0,096$, $p<0.001$; $b=0,142$, $p<0.001$, redom), dok nije postojao statistički značajan pozitivan trend porasta stepena kasne GI i GU toksičnosti u vremenu ($b=0,006$, $p=0,277$; $b=0,010$; $p=0,344$). Takođe, u grupi zračenih operisanih pacijenata zbog karcinoma prostate koju je činilo 39 ispitanika, kod kojih je propisana doza 66Gy, 2 Gy po frakciji, postojao je statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GI i GU toksičnosti u vremenu ($b=0,105$, $p<0.001$; $b=0,132$, $p<0.001$, redom), dok nije postojao statistički značajan pozitivan trend porasta stepena kasne GI i GU toksičnosti u vremenu ($b=-0,001$, $p=0,955$; $b=-0,008$; $p=0,513$). Nepostojanje statistički značajnog pozitivnog trenda porasta stepena kasne GI i GU toksičnosti u našem istraživanju, može se objasniti nedovoljno dugim vremenom praćenja, s obzirom na činjenicu da se kasna radijaciona toksičnost može ispoljiti i posle mnogo godina od završetka radioterapijskog lečenja. Dok se plato kasne GI toksičnosti dostiže obično nakon 3 godine od završetka zračne terapije, kasna GU toksičnost može se razviti znatno kasnije, te je za njenu preciznu procenu neophodno duže vreme praćenja. Pad prevalencije kasne GI toksičnosti nakon 2 godine praćenja i njena stabilnost posle 5 godina nakon sprovedene radioterapije govore u prilog tome da nakon tog vremena od završetka lečenja dolazi do oporavka simptoma gastrointestinalne toksičnosti (127). Medijana vremena koje je potrebno za razvoj simptoma kasne GU toksičnosti je 13-33 meseci, a u oko 80% slučajeva javlja se unutar 48 meseci (128,129). U istraživanju koje su sprovedeli Takeda i saradnici pokazano je da se kasna GU toksičnost gr 3 može javiti i 10 godina nakon sprovedenog lečenja IMRT tehnikom (130). Iz toga se može zaključiti da sa dužim vremenom praćenja, incidencija GU toksičnosti raste. Takođe, za poređenje GU toksičnosti među ispitanicima iz različitih studija, treba porediti studije sa istim vremenom praćenja (131). S obzirom da je medijana praćenja naših ispitanika 30 meseci, a da je reč o dugoživećim pacijentima, potrebno je duže vreme praćenja za dobijanje validnijih zaključaka kasne GI i GU toksičnosti. Nastavljena je evaluacija toksičnosti na redovnim kontrolama, te se novi rezultati kasnih efekata radioterapije u našoj ispitivanoj grupi pacijenata očekuju u budućnosti. Naši rezultati se mogu povezati sa veličinom uzorka, razlikama u individualnim i kliničkim karakteristikama ispitanika u odnosu na neke podatke iz literature, kao i dozimetrijskim razlikama poput ukupno propisane doze, doze po frakciji, veličine zračnog volumena i mogućnosti sprovođenja IGRT procedura, u odnosu na druge studije.

Literaturni podaci ukazuju da je ispitivanje prediktivne vrednosti individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika za nastanak toksičnosti bio čest predmet diskusije među brojnim autorima. Ipak, za jasno utvrđivanje njihovog značaja za nastanak toksičnosti, potrebna su dalja istraživanja, multicentrične studije, homogenizacija grupa pri poređenju rezultata i slično.

Valdagni i saradnici pronašli su vezu između prethodnih operacija u abdomenu i karlici (PAPS), pre svega apendektomije i holecistektomije i nastanka GI toksičnosti. Oni su pokazali značajnu korelaciju između V70 i većeg stepena krvarenja iz rektuma kod ovih pacijenata. Incidencija srednjeg i teškog stepena krvarenja bila je 40% ako je $V70>21\%$, dok je ta stopa pala na 5% ako je $V70<21\%$, što sa kliničkog aspekta može imati značaja u redukciji rektalne toksičnosti, ukoliko se pri planiranju radioterapije kod ovih pacijenata postigne da V70 bude ispod 20%, umesto 25% koliko je prihvaćeno za opštu populaciju (132). Peeters i saradnici pokazali su takođe vezu između PAPS sa rektalnim krvarenjem i proktitisom (133). Fiorino i saradnici su u multicentričnoj studiji koja je analizirala podatke 506 pacijenata sa periodom praćenja 24 meseca koji su lečeni 3D-CRT sa totalnom dozom 70-80Gy, 1,8-2Gy dnevno, evaluirali rektalnu toksičnost. U njihovom istraživanju, veza između brojnih kliničkih i dozimetrijskih parametara i razvoja gr 2 i više rektalne toksičnosti, ispitivana je univarijantnom (UVA) i multivarijantnom analizom (MVA). Evaluirana su tri tipa rektalne toksičnosti: učestale stolice/tenezmi/bolovi, zatim fekalna inkontinencija i krvarenje. Prethodne operacije u abdomenu ili karlici korelirale su sa svim tipovima rektalne toksičnosti (134). Potencijalni razlozi za postojanje veze između prethodnih operacija u abdomenu ili karlici i nastanka GI toksičnosti mogu biti vaskularni efekti, poput kolagenske vaskularne bolesti (eng. Collagen vascular disease-CVD) (135). Još jedna hipoteza koja može objasniti povećan rizik za nastanak rektalne toksičnosti nakon apendektomije, može biti činjenica da ovom hirurškom intervencijom dolazi do poremećaja creva usled uklanjanja važnog rezervoara bifidobakterija koje imaju protektivnu ulogu na crevnu mukozu (136). Veza između prethodne hirurške intervencije i simptoma GI

toksičnosti može se objasniti i činjenicom da hirurgija može biti potencijalni prekursor inflamatornog odgovora, koji može dovesti do povećane senzitivnosti daleko od hirurškog ožiljka preko TGF- β koji se smatra značajnim biomarkerom inflamatornog i fibrotičnog odgovora na radioterapiju **(132)**. U našem istraživanju nije pokazana veća GI toksičnosti kod pacijenata koji su imali neku od prethodnih operacija u abdomenu ili karlici, verovatno najpre zbog razlika u individualnim i kliničkim karakteristikama naših pacijenata u odnosu na neke podatke iz literature, kao i razlikama u propisanoj dozi i tehnici zračenja. Smatra se da sličan uticaj prethodna hirurška intervencija može imati i na mukozu mokraćne bešike, što je u saglasnosti sa našim rezultatima dobijenim na celoj grupi naših ispitanika koji su pokazali da su u grupi radikalno zračenih ispitanika, veći stepen kasne GU toksičnosti imali ispitanici sa prethodnim operacijama u abdomenu ili maloj karlici ($b=0,261$, $p=0,019$).

Još jedan važan potencijalni klinički prediktor radijacione toksičnosti koji je ispitivan od strane velikog broja autora jeste diabetes mellitus. Pozitivna asocijacija između gradusa akutne GU toksičnosti tokom radioterapije i prisustva dijabetesa, potvrđena je u brojnim studijama **(137,95)**. Yahya i saradnici izneli su rezultate TROG 03.04 RADAR trajala koji je uključio 754 pacijenta sa medijanom praćenja 72 meseca nakon radioterapije. Pokazan je značajan uticaj dijabetesa na nastanak simptoma akutne GU toksičnosti, naročito dizurije i hematurije, sa manjim uticajem na nastanak inkontinencije i frekvencije pražnjenja. Ove razlike su verovatno posledica različitih patofizioloških puteva koji dovode do nastanka ovih simptoma **(137)**. Rezultati našeg istraživanja na grupi od 39 pacijenata sugerišu statističku značajnu pozitivnu povezanost između postojanja dijabetesa i izmena u gradu akutne genitourinarne toksičnosti tokom vremena ($b=0,540$; $p<0,007$), što je u skladu sa prethodno navedenim rezultatima.

Mnogi autori ispitivali su uticaj dijabetesa na nastanak kasne GU toksičnosti. Kalakota i saradnici u kohorti od 626 pacijenata, pokazali su viši rizik od nastanka kasne GU toksičnosti gradus 2 ($p=0,10$) i gradusa 3 ($p=0,04$) kod dijabetičara **(138)**. Slično njihovim rezultatima, Herold i saradnici pokazali su da postoji značajan rizik za nastanak kasne gradus 2 GU toksičnosti kod pacijenata sa ovim komorbiditetom **(139)**. Efekat dijabetesa na pojavu radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom, može se objasniti dugotrajnim patološkim izmenama, kao što je narušen imuni sistem, ishemija tkiva, otežano zarastanje rana i otežan oporavak tkiva nakon radioterapije **(138,139,140)**. U celoj grupi naših ispitanika, nije nađena statistički značajna povezanost između dijabetesa i nastanka kasne GU toksičnosti ni u grupi radikalno zračenih niti u grupi operisanih pacijenata zbog karcinoma prostate. Naši rezultati mogu se povezati sa manjim brojem ispitivanih pacijenata kao i kraćim vremenom praćenja kasne toksičnosti u odnosu na prethodno navedene studije.

Kada je reč o vezi između dijabetesa i nastanka GI toksičnosti, literaturni podaci se razlikuju. Alashkham i saradnici pokazali su da su pacijenti sa karcinomom prostate koji su imali dijabetes, imali značajno viši gradus akutne GI toksičnosti (proktitis) **(141)**. Vezu između rektalnog krvarenja i dijabetesa pronašli su univarijantnom analizom i Fiorino i saradnici, ali nije bilo statističke značajnosti ($p=0,15$) **(134)**. Herold i saradnici pokazali su da postoji značajan rizik za nastanak kasne gr 2 GI toksičnosti kod dijabetičara **(139)**. S druge strane, Kalakota i saradnici pokazali su da pacijenti sa dijabetesom nisu imali viši rizik za nastanak kasne GI toksičnosti gr 2 i 3 nakon radioterapije **(138)**. U našoj ispitivanoj grupi od 39 pacijenata nije nađena statistički značajna veza između dijabetesa i nastanka akutne GI toksičnosti ($p=1,000$), a takođe statistički podaci sprovedeni na celoj grupi od 90 pacijenata ne pokazuju vezu između postojanja dijabetesa u anamnezi i nastanka akutne i kasne GI toksičnosti. Ove razlike u rezultatima mogu se objasniti razlikama u individualnim i kliničkim osobinama, razlikama u karakteristikama tumora kao i radioterapijskog tretmana među ispitanicima, razlikama u veličini uzorka, kao i razlikama u dužini trajanja dijabetesa u ličnoj anamnezi koji može doprineti vaskularnim oštećenjima i posledičnom razvoju toksičnosti.

Kada je reč o značaju dozimetrijskih parametara za nastanak radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate, poznato je da faktori poput ukupne doze, doze po frakciji, ozračeni volumen zdravih tkiva i nehomogenost doze utiču na razvoj toksičnosti **(142,143)**. Prethodni autori ispitivali su značaj većeg iradijacionog volumena okolnih zdravih organa za nastanak neželjenih dejstava radioterapije. Tako su Vavasori i saradnici sprovedli prospektivnu multicentričnu

studiju (AIROPROS 01-02) koja je uključila 1123 pacijenta sa karcinomom prostate lečenih 3DCRT, sa medijanom doze 74Gy (70-81Gy). Oni su pokazali da je veći iradijacioni volumen rektuma bio povezan sa učestalim pražnjenjem creva, tenezmima, inkontinencijom i krvarenjem. V60 je pokazan kao prediktivni faktor za povećanu učestalost stolica, a V70 za pojavu inkontinencije težeg stepena (144). Takođe, Valdagni i saradnici pokazali su da je, između ostalog, srednja doza na rektum bila značajan prediktor akutne GI toksičnosti gradus 2 po RTOG/EORTC kriterijumima ($p=0,0004$). V60 bio je povezan sa većim krvarenjem iz rektuma ($p=0,002$), a V70 sa izraženijom inkontinencijom analnog sfinktera ($p=0,033$) (145). Fiorono i saradnici u svom istraživanju sugerisali su dozno ograničenje za rektum $V40 < 65-70\%$ radi prevencije inkontinencije. V40 do V70 bili su jaki prediktori rektalnog krvarenja u njihovom istraživanju (134).

Hasterok i saradnici sproveli su studiju koja je uključila 213 pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna radioterapija nakon prostatektomije, sa srednjom dozom 70Gy (opseg 62-76Gy). Cilj studije bio je da se proceni učestalost neželjenih efekata radioterapije kao i prognostička vrednost DVH parametara za nastanak GI i GU radijacione toksičnosti. Akutna GI toksičnost gradus ≥ 2 javila se u 11,7%, dok se kasna GI toksičnost gradus > 2 javila u 11,2%. Akutna GU toksičnost gradus ≥ 2 javila se u 18,7%, a 21,3% ispitanika razvilo je kasnu GU toksičnost gradus ≥ 2 . Najčešći simptomi GI toksičnosti bili su dijareja i proktitis, odnosno cistitis i dizurija za GU toksičnost. Parametri rektuma kao i zida rektuma koji su primili dozu u opsegu 30-65Gy, značajno su bili povezani sa nastankom akutne GI toksičnosti gradus ≥ 2 . S druge strane, pojava kasne GI toksičnosti gradus ≥ 2 , bila je značajno povezana samo sa parametrima zida rektuma, uključujući V35-54, V66-69 i V71. Najznačajniji prediktori akutne GI toksičnosti gradus ≥ 2 bili su V47 i V46 za rektum ($p < 0,001$ i $p < 0,001$) i V46 za zid rektuma ($p=0,001$), dok su najznačajniji prediktori kasne GI toksičnosti gradus ≥ 2 bili za zid rektuma V47 i V48 ($p=0,019$ i $p=0,021$) (146). Značaj dozimetrijskih parametara za nastanak toksičnosti pokazan je i u našem istraživanju u kojem je kod 77 pacijenata primenjena 3D CRT, a od avgusta 2018. nakon uvođenja VMAT tehnike u rutinsku kliničku praksu, uključili smo još 13 ispitanika kod kojih je primenjena ova tehnika zračenja. Praćena je ukupna toksičnost, bez poređenja toksičnosti između grupa pacijenata tretiranih različitim tehnikama zračenja, s obzirom na značajnu razliku u njihovom broju. U grupi zračenih operisanih pacijenata zbog karcinoma prostate, pokazano je da su veći stepen kasne GI toksičnosti imali ispitanici sa većim V65 za rektum ($b=0,008$; $p=0,037$).

Parametri za bešiku i za zid bešike, u studiji Hesteroka i saradnika, nisu bili značajno povezani sa rizikom od nastanka akutne GU toksičnosti. Rizik za nastanak kasne GU toksičnosti ≥ 2 bio je značajno povezan sa parametrima za zid bešike koji su primili dozu u opsegu 30-54 Gy kao i sa parametrima za celu bešiku opsega 30-53Gy.

S obzirom da sprovođenje postoperativne radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate nosi značajan rizik za nastajanje GI i GU radijacione toksičnosti, čak i kod pacijenata kod kojih su zadovoljena dozna ograničenja organa od rizika, zaključak autora ove studije bio je da treba favorizovati ranu salvagu radioterapiju u odnosu na postoperativnu, osim u slučajevima sa nepovoljnim patohistološkim parametrima sa operacije (gradus grupa 4 i 5, pT3 i N1 status bolesti), kada treba primeniti postoperativnu radioterapiju bez odlaganja (146).

Uticao dozimetrijskih parametara za mokraćnu bešiku pokazali su se kao značajni potencijalni prediktori GU toksičnosti i u drugim studijama. Tako su Son i saradnici ispitivali nastanak urinarne inkontinencije kod 87 pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili salvage zračna terapija u nekom momentu nakon prostatektomije, IMRT tehnikom. Pokazali su da se skor urinarne kontinencije ne menja kroz vreme u odnosu na onaj koji je bio pre IMRT, ali da je, nakon perioda praćenja od dve godine, postojala značajna razlika u ukupnom global skorurinarne kontinencije koji je ispitivan, u zavisnosti da li je V70 bio $< 42,27$ ili $\geq 42,27$ ($p < 0,05$) (147). U našem istraživanju kod pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna ili salvage zračna terapija, propisana doza bila je 66Gy i nije nađena statistički značajna veza između ispitivanih dozimetrijskih parametara za mokraćnu bešiku i nastanka akutne i kasne GU toksičnosti, što je u saglasnosti sa rezultatima nekih drugih autora (95). Razlika u rezultatima našeg istraživanja i israživanja autora koji su dobili statističku značajnost između dozimetrijskih parametara za mokraćnu bešiku i nastanka

GU toksičnosti, može se objasniti razlikama u individualnim i kliničkim karakteristikama kao i razlikama u dužini praćenja toksičnosti, ali i razlikama u dozi zračenja kao i razlikama u analiziranju prediktivnog značaja različitih doza za nastanak toksičnosti.

Pored prethodno opisanih, i druge individualne, kliničke i dozimetrijske karakteristike bile su analizirane od strane mnogih autora i ispitivan je njihov uticaj na nasatnak GI i GU toksičnosti. Tako je studija koju su sprovedeli Nuotio i saradnici pokazala da su aktivni pušači imali 2,55 puta veći rizik za razvoj urgencije mokrenja u odnosu na ispitanike koji nisu konzumirali cigarete **(148)**. Solanki i saradnici pronašli su da nakon perioda praćenja od 57 meseci, vezu između aktivnog pušenja i razvoja kasne GU toksičnosti $gr \geq 3$ **(149)**. I drugi autori pronašli su vezu između pušenja i nastanka višeg gradusa akutne GU toksičnosti ($p=0,003$) **(95)**. Takeda i saradnici sprovedli su istraživanje na 452 pacijenta sa lokalizovanim karcinomom prostate koji su lečeni IMRT tehnikom sa medijanom doze 80 Gy (76-80Gy), standardnim režimom frakcionisanja od 2Gy dnevno. Medijana praćenja bila je 83 meseca (4-210 meseci). Oni su ispitali uticaj godina starosti, pripadnost rizičnoj grupi za relaps bolesti, ukupno propisane doze zračenja, dužinu primene ADT, antitrombotične terapije (AT), kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, dijabetes melitusa, dislipidemije, prethodne transuretralne resekcije prostate (TURP) i prethodni visokointenzivno fokusiran ultrazvuk (eng. Prior high-intensity focused ultrasound - HIFU) na nastanak kasne gradus 3 urinarne toksičnosti. Zaključili su da je postojanje ovog gradusa toksičnosti bilo statistički značajno povezano sa primenom antitrobotične terapije i HIFU procedure, dok ostale varijable nisu bile u korelaciji sa nastankom gradusa 3 kasne GU toksičnosti. Opstrukcija, inkontinencija i radijacioni cistitis sa makroskopskom hematurijom najčešći su simptomi gradusa 3 GU toksičnosti **(73)**. Genitourinarni problemi pre započinjanja radioterapije, prethodne resekcije tumora u prostati ili mokraćnoj bešici kao i prisustvo akutne GU toksičnosti, mogu predstavljati rizik za nastanak kasne GU toksičnosti **(150)**. Holandski istraživači (Peeters i saradnici) sprovedli su multicentričnu studiju na 669 pacijenata sa lokalizovanim karcinomom prostate, u cilju komparacije akutne i kasne GI i GU toksičnosti nakon sprovedene 3D CRT dozama 68Gy i 78Gy. Značajan faktor predikcije za razvoj akutne GU toksičnosti bili su simptomi pre terapije ($p<0,0019$), hormonoterapija ($p=0,003$) kao i prethodni TURP ($p=0,02$). Pacijenti koji su prethodno imali TURP, trebalo bi da budu pažljivo praćeni, jer je više autora našlo vezu između ove intervencije i nastanka kasne urinarne toksičnosti **(133,151,152)**. U našoj grupi ispitanika, samo je kod jednog pacijenta učinjen TURP pre započinjanja radioterapije, te nismo bili u mogućnosti da utvrdimo vezu između ove intervencije i razvoja GU toksičnosti. Dutz i saradnici poredili su akutnu i kasnu GI i GU toksičnost kod 88 pacijenata koji su tretirani protonskom ili IMRT tehnikom zračenja. Oni nisu pronašli razliku u pojavi GI i GU toksičnosti između ove dve grupe pacijenata, osim što je kasna urinarna urgencija bila znatno niža u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena protonska terapija ($p=0,047$) **(153)**.

Kada je reč o prediktivnom značaju ostalih individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika koje su ispitivane u celoj grupi naših ispitanika kao što su starost pacijenta, navika pušenja, konzumacija alkohola, arterijska hipertenzija, dozimetrijski parametri za bešiku, nije nađena njihova značajna povezanost sa izmenama gradusa akutne i kasne GU toksičnosti u vremenu ni u grupi radikalno zračenih pacijenata niti u grupi zračenih operisanih ispitanika zbog karcinoma prostate. Ove razlike u dobijenim rezultatima našeg istraživanja i pojedinih rezultata iz literature mogu se objasniti razlikama u individualnim, kliničkim, tumorskim i karakteristikama radioterapijskog tretmana kao i razlikama u veličini uzoraka i dužini praćenja toksičnosti.

Brojne studije bavile su se utvrđivanjem prediktora GI toksičnosti i pokazano je da su viša životna dob, veći volumen rektuma koji je ozračen, prethodne abdominalne operacije, konkomitantna primena antideprivacione terapije, dijabetes, hemoroidi ili inflamatorne bolesti creva identifikovani kao najvažniji faktori rizika za razvoj akutne i kasne GI toksičnosti nakon radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate **(150)**. Neoadjuvantna androgena deprivaciona terapija smanjuje incidenciju akutne rektalne toksičnosti zbog smanjivanja veličine prostate, a samim tim i zračnog volumena **(133,144)**. Barnett i saradnici našli su da je starost pacijenta na početku lečenja povezana sa višim rizikom od razvoja rektalnog krvarenja, dok Schmid i saradnici nisu pronašli ovu asocijaciju **(154)**. Valdagni i saradnici pokazali su da prethodne hirurške intervencije, individualni i klinički faktori

kao što su starost pacijenta, konzumacija cigareta, indeks telesne mase, komorbiditeti poput dijabetesa, hipertenzije itd, ali i molekularni i genetski faktori mogu takođe biti predisponirajući za razvoj kasne rektalne toksičnosti (155). Drugi autori pokazali su da hemoroidi i gastrointestinalni komorbiditeti imaju značajan uticaj na pojavu toksičnosti donjeg gastrointestinalnog trakta (eng. low gastrointestinal tract toxicity-LGIT) (70), dok Hesterok i saradnici nisu pronašli ovu asocijaciju (146). Jean-Bernard Delobel i saradnici težili su da identifikuju prediktore akutne i kasne rektalne toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate i generišu nomograme za individualnu predikciju toksičnosti. Oni su u svoje istraživanje uključili 972 pacijenta sa lokalizovanim karcinomom prostate, koji su lečeni radioterapijom dozom od 70Gy ili 80Gy, koristeći dva režima frakcionisanja (2Gy ili 2,5Gy) i nekoliko tehnika zračenja (3D CRT, IMRT ili IGRT). Period praćenja bio je 62 meseca. Zaključili su da eskalacija doze i hipofrakcionisani režim zračenja povećavaju kasnu rektalnu toksičnost. IMRT kombinovan sa IGRT smanjuje stopu akutne i kasne rektalne toksičnosti. Ovim nomogramima se, dakle, može predvideti rizik za trogodišnju rektalnu toksičnost integrišući totalnu dozu, dozu po frakciji i radioterapijsku tehniku zračenja (156). U našem istraživanju, nije pronađena povezanost između individualnih i kliničkih karakteristika poput starosti pacijenta, navike pušenja, konzumacije alkohola, arterijske hipertenzija sa izmenama gradusa akutne i kasne GI toksičnosti u vremenu ni u grupi radikalno zračenih pacijenata niti u grupi zračenih operisanih ispitanika. Ove razlike u dobijenim rezultatima našeg istraživanja i rezultata iz literature mogu se objasniti razlikama u individualnim, kliničkim, tumorskim i karakteristikama radioterapijskog tretmana kao i razlikama u veličini uzoraka i dužini praćenja toksičnosti.

Ipak, poznavanje individualnih, kliničkih i dozimetrijskih parametara pri lečenju pacijenata sa karcinomom prostate radioterapijom, predstavlja samo deo slagalice u razumevanju kompleksnog mehanizma nastanka radijacione toksičnosti. Stoga podaci iz savremene literature pridaju važnost razvijanju predikcionih modela, koji podrazumevaju integraciju ovih parametara sa biološkim faktorima, pre svega nivoima inflamatornih faktora poput citokina i razumevanje genetskih i epigenetskih mehanizama, među kojima su izmene u nivoima ekspresije mikroRNK (miRNK) i koji bi mogli poslužiti kao esencijalni faktor ka razvoju personalizovane radioterapije.

Poznato je da jonizujuće zračenje aktivira imunski sistem. S jedne strane, imunološki faktori mogu suprimirati razvoj tumora, uništavajući maligne ćelije ili inhibirajući njihov rast. S druge strane, imunske ćelije su sposobne da obezbede imunosupresivo mikrookruženje koje dovodi do tumorske progresije (157,158,159). Jedan od načina na koji radioterapija ostvaruje svoj efekat na modulaciju imunskog sistema jeste kroz aktivaciju kaskade citokina (160). Smatra se da nakon izlaganja radioterapiji, oštećenje normalnog okolnog tkiva i izmene ekspresija gena dovode do povećanja produkcije citokina u zračevoj regiji koji nakon toga ulaze u cirkulaciju (161,162). Jonizujuće zračenje povećava ekspresiju određenih citokina koji su uključeni u inflamatorni odgovor i razvoj toksičnosti indukovane radioterapijom (163). Budući da se smatra da u osnovi mehanizma nastanka radijacione toksičnosti leži inflamacija, analiza nivoa inflamatornih faktora poput citokina tokom sprovođenja radioterapije je stoga od izuzetnog značaja u oblasti radiobiologije, sa ciljem boljeg razumevanja njihove uloge u nastanku i lečenju kancera kao i nastanku neželjenih efekata radioterapije (164,165,166). U tkivima i ćelijama koji su izloženi jonizujućem zračenju u in vitro i in vivo uslovima, dolazi do aktivacije ekspresije mnogih citokina i faktora rasta kao što su: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, tip I IFN, faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (eng. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-GM-CSF) (160,167,168,169), IL-4, IL-5, IL-10 (170), IL-12, IL-18 (171) i TGF- β (172).

Brojni su citokini koji mogu da imaju uticaj na odgovor na radioterapiju malignog i zdravog okolnog tkiva, indukujući inflamaciju, invazivnost malignih ćelija i fibrozu u ozračenom tkivu. Ovi podaci potvrđuju hipotezu o značaju određivanja nivoa citokina pre, tokom i nakon radioterapije u cilju predikcije odgovora na zračenje, kao i moguće primene specifičnih inhibitora ili lekova, sposobnih da modifikuju citokinske puteve, u cilju da unaprede lečenje radioterapijom. Pokazano je da su IL-6 i IL-8 uključeni u inflamatorni odgovor indukovan jonizujućim zračenjem, pojačavajući invazivnost malignih ćelija (173). Wu i saradnici pokazali su da je povišen nivo IL-6 pozitivno

povezan sa rezistencijom na radioterapiju, dok njegova inhibicija poboljšava radiosenzitivnost kod pacijenata sa karcinomom prostate **(98)**.

Pored značajne uloge citokina u odgovoru malignog tumora na radioterapiju, izmene njihovih nivoa tokom sprovođenja zračne terapije, povezane su sa nastankom neželjenih efekata radioterapije, odnosno mogu imati uticaja na nastanak GU i GI radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom. S obzirom da je reč o dugoživećim pacijentima, obezbeđivanje dobrog kvaliteta života je od neprocenjivog značaja, zbog čega je utvrđivanje potencijalnih uzročnika nastanka toksičnosti veliki izazov.

Brojni autori bavili su se utvrđivanjem veze između izmena nivoa citokina u cirkulaciji tokom sprovođenja radioterapije i nastanka radijacione toksičnosti **(84,80,174,175,87,176,177)**. Christensen i saradnici sprovedli su longitudinalnu studiju na 42 pacijenta sa karcinomom prostate koji su pripadali srednjoj grupi rizika za relaps bolesti i koji su bili podeljeni u dve grupe. Prvu grupu, činilo je 22 pacijenta kod kojih je sprovedena radikalna radioterapija, sa propisanom dozom 78Gy u 39 frakcija, IMRT tehnikom zračenja, dok su drugu grupu od 20 pacijenata činili ispitanici kod kojih je sprovedena radioterapija u nekom momentu nakon prostatektomije, sa propisanom dozom 66Gy u 33 frakcije, istom tehnikom zračenja. Uzimani su uzorci krvi pre započinjanja radioterapije i jednom nedeljno tokom lečenja. Akutna toksičnost ispitivana je svake nedelje i određivani su nivoi sledećih medijatora inflamacije i imunskog odgovora: faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 i IL-12p70. Pokazano je značajno povećanje IFN- γ i IL-6 tokom IMRT ($p=0,0077$, $0,0035$, redom). Izmene u nivoima IL-2, IL-6 i IFN- γ u odnosu na bazalnu vrednost, bile su povezane sa povećanom GI toksičnošću, dok je za IL-2 nađena statistička značajnost. Izmene u IL-1 i IFN- γ bile su povezane sa povećanom GU toksičnošću, a statistička značajnost pronađena je za IL-1 **(80)**. Njihovi rezultati ukazuju da nivoi IL-1, IL-2, IL-6 i IFN- γ u cirkulaciji tokom IMRT mogu imati prediktivnu vrednost za utvrđivanje nastanka akutne radijacione toksičnosti. Iako su ovi autori pronašli značajno povećanje nivoa IL-6 tokom radioterapije, njegovo povećanje nije bilo povezano sa GU toksičnošću.

Ispitivanje profila citokina u cirkulaciji u našoj grupi od 44 pacijenta sa karcinomom prostate koji su lečeni 3D konformalnom radioterapijom, od kojih je kod 21 pacijenta sprovedena radikalna zračna terapija sa propisanom dozom 72Gy u 36 frakcija, a kod 23 pacijenta zračna terapija nakon prostatektomije dozom od 66Gy u 33 frakcije, multivarijantna analiza pokazala je da su viši nivoi IL-6 i IL-2 tokom radioterapije bili povezani sa višim gradusom akutne GU toksičnosti, pri čemu je za IL-6 utvrđena statistička značajnost ($b=0,017$; $p = 0,046$), dok je za IL-2 nađen trend ka postizanju značajnosti ($b=0,020$; $p=0,062$, redom). Razlike u našim rezultatima i onim koji su dobili Christensen i saradnici o povezanosti IL-6 i nastanka GU toksičnosti, mogu biti posledica primene različitih tehnika zračenja, razlika u propisanoj dozi zračenja kao i u individualnim i kliničkim razlikama između različitih grupa pacijenata. Slično rezultatima našeg istraživanja, Singh i saradnici su, u svom istraživanju koje je uključilo pacijente sa karcinomom prostate koji su lečeni IMRT tehnikom zračenja u radikalnom pristupu, dozom 78-80Gy, pokazali povećanje nivoa IL-6 tokom radioterapije i njegovu povezanost sa povećanjem stepena akutne GU toksičnosti **(84)**.

Naše istraživanje pokazalo je značajno više nivoe IL-6 i IFN- γ u cirkulaciji kod pacijenata koji su lečeni radikalnom radioterapijom u odnosu na pacijente kod kojih je zračna terapija sprovedena u postoperativnom pristupu. Ove razlike mogu se objasniti propisanom većom dozom za radikalnu radioterapiju (72Gy) nego za adjuvantnu, odnosno Salvage zračnu terapiju (66Gy), odnosno različitim zračnim volumenima kod ove dve grupe pacijenata ili pak samim prisustvom prostate. Ovaj podatak za IL-6 je očekivan s obzirom da ćelije karcinoma prostate produkuju ovaj citokin koji je uključen u inflamatorni odgovor na jonizujuće zračenje **(86,178)**. Christensen i saradnici pronašli su statistički značajnu razliku u nivoima IL-6 i IFN- γ u toku radioterapije u odnosu na bazalni nivo kod zračenih operisanih pacijenata zbog karcinoma prostate, dok ta razlika kod ispitanika kod kojih je sprovedena radikalna radioterapija nije bila statistički značajna **(80)**. Tazaki i saradnici pokazali su, takođe, povišene nivoe IFN- γ u serumu kod pacijenata sa karcinomom prostate **(179)**. Povećanje nivoa IFN- γ tokom radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate, pokazali su i Tanji i saradnici **(180)**.

Rezultati drugih studija takođe su pokazali da su kod pacijenata sa karcinomom prostate nivoi citokina značajno izmenjeni u cirkulaciji nakon radioterapije nego što su bili pre sprovođenja zračne terapije, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Na primer, Johnke i saradnici su u svom istraživanju koje je uključilo 37 pacijenata kod kojih je sprovedena radioterapija samostalno ili u kombinaciji sa totalnom androgenom blokadom, određivali nivoe IL-6, TGF- β 1 i IL-1 β pre radioterapije, 24h po otpočinjanju zračenja i potom jednom nedeljno tokom trajanja radioterapijskog tretmana. Oni su pokazali da njihovi nivoi značajno rastu tokom radioterapije. Dok nivo IL-6 i IL-1 β raste odmah nakon izlaganja radioterapiji, sa postizanjem pika 1-2 nedelje od početka sprovođenja radioterapije i postepenim vraćanjem na bazalne vrednosti nakon toga, nivo TGF- β 1 najpre opada, a potom dolazi do pojave 2 talasa rasta ovog profibrotičnog citokina, najpre nakon 1-2 nedelje od početka radioterapije, a potom i nakon 5-6 nedelja od započinjanja tretmana **(181)**. Kovacs i saradnici sprovedli su istraživanje koje je uključilo 37 pacijenata sa karcinomom prostate kod kojih je sprovedena radioterapija pelvičnim poljima uz dodatnu dozu na prostatu prema RTOG protokolu 94-08 i 94-13. Oni su pokazali da su nivoi citokina poput IL-1 α , faktor stimulacije makrofagnih kolonija (eng. macrophage colony stimulating factor - M-CSF) i TGF- β bili povišeni kod ovih pacijenata pre započinjanja radioterapije i da su tokom trajanja zračne terapije njihovi nivoi i dalje rasli u cikličnim talasima **(182)**. I drugi autori pokazali su u svom istraživanju da se tokom radioterapije značajno menjaju nivoi citokina u serumu ili plazmi u odnosu na njihove bazalne nivoe **(84,180,175)**. Tako su Singh i saradnici u svom istraživanju koje je uključilo 18 pacijenata kod kojih je primenjena IMRT, pokazali da nivoi proinflamatornih citokina TNF- α i IL-6 rastu tokom radioterapije dok nivo antiinflamatornog citokina TGF- β 1 opada. Ovakve promene navedenih citokina, bile su povezane sa nastankom GU i GI toksičnosti, iako ove asocijacije nisu bile statistički značajne, verovatno zbog veličine uzorka.

Brojna istraživanja ukazuju da IL-6 i TGF- β 1 mogu imati ulogu u razvoju akutne genitourinarne toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate. U cilju daljeg istraživanja mogućeg kliničkog značaja izmena nivoa citokina IL-6 i TGF- β 1 za pojavu neželjenih efekata radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate, podstaknuti dobijenim rezultatima, u našem drugom delu istraživanja koje je uključilo 39 pacijenata, ispitivali smo moguću vezu između koncentracija IL-6 i TGF- β 1 u serumu pre radioterapije i nakon 25. frakcije zračenja i nastanka akutne GU i GI toksičnosti. Značajna pozitivna korelacija nađena je između nivoa TGF- β 1 u serumu pre radioterapije i maksimalnog gradusa GU toksičnosti tokom radioterapije ($p=0,036$), dok je povezanost između nivoa IL-6 pre tretmana i maksimalnog gradusa GU toksičnosti tokom tretmana bila blizu statističke značajnosti ($p=0,054$). Nivo TGF- β 1 u serumu nakon 25. frakcija bio je pozitivno povezan sa maksimalnim gradusom GU toksičnosti. Mada ova korelacija nije bila statistički značajna, pokazan je trend prema statističkoj značajnosti ($p=0,052$). Takođe je pokazana statistički značajna pozitivna asocijacija između koncentracije TGF- β 1 u serumu nakon 25. frakcija i gradusa GU toksičnosti nakon 25. frakcije ($p=0,044$). Nađena je pozitivna asocijacija između nivoa IL-6 u serumu nakon 25. frakcije radioterapije i gradusa akutne GU toksičnosti u istoj tački merenja. Iako ova asocijacija nije bila statistički značajna, pokazan je trend ka postizanju značajnosti ($p=0,063$). Svi ovi rezultati ukazuju na klinički značaj određivanja nivoa citokina za predikciju rizika za razvoj toksičnosti normalnog tkiva indukovano radioterapijom, što je u korelaciji sa brojnim podacima iz literature **(80,84,97)**. Obećavajući rezultati za IL-6 kao potencijalnog prediktora radijacione toksičnosti, što je pokazano u obe studije našeg istraživanja koje su ispitivale značaj citokina za nastanak neželjenih dejstava radioterapije, ne korelira sa rezultatima nekih drugih studija koji su sugerisali da izmene u nivoima IL-6 u odnosu na bazalni nivo, nisu bili povezani sa povećanjem GU radijacione toksičnosti **(80)**. Takođe, dok su rezultati našeg istraživanja pokazali da su izmene u nivoima TGF- β 1 tokom radioterapije značajno pozitivno povezane sa nastankom akutne GU toksičnosti, Singh i saradnici su pokazali u svom istraživanju, koje je uključilo pacijente sa karcinomom prostate koji su tretirani sa IMRT dozom 78, odnosno 80Gy, da su pacijenti koji su razvili viši gradus akutne GU radijacione toksičnosti, imali nižu koncentraciju TGF- β 1 u plazmi na kraju radioterapije i 3 meseca po završenom radioterapijskom lečenju **(84)**. Naši rezultati mogu biti posledica razlika u broju pacijenata u različitim studijama, razlikama u propisanoj dozi zračenja,

tehničari zračenja, kao i razlikama u individualnim i kliničkim karakteristikama ispitanika u odnosu na druge studije.

Nivoi IL-6 i TGF- β 1 u serumu nisu bili statistički značajno povezani sa maksimalnim gradusom kasne GU toksičnosti ili maksimalnim gradusom kasne GI toksičnosti u našoj grupi pacijenata. Međutim, negativna korelacija blizu statističke značajnosti nađena je između nivoa TGF- β 1 nakon 25 frakcija i maksimalnog gradusa kasne GI toksičnosti. Ovi rezultati mogu biti posledica malog uzorka i relativno kratkog vremena praćenja od 30 meseci za procenu kasne radijacione toksičnosti. Određivanje nivoa IL-6 i TGF- β 1 kod pacijenata sa karcinomom prostate nakon 1, 3, 6, 12 meseci nakon završenog radioterapijskog lečenja, može biti od značaja za evaluaciju njihove potencijalne značajnosti za predikciju akutne i kasne GU i GI toksičnosti i mogao bi biti fokus istraživanja u daljim studijama sa većim brojem pacijenata.

Značaj TGF- β 1 za nastanak radijacione toksičnosti, pokazan je i u drugim istraživanjima, gde je uočeno da su povišeni cirkulišući novoi TGF- β 1 bili povezani sa rizikom od razvoja pulmonalne radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom pluća (**183**). Takođe je pokazano da su povišeni nivoi TGF- β 1 u plazmi u pozitivnoj korelaciji sa razvojem fibroze uzrokovane radioterapijom kod pacijentkinja sa karcinomom dojke (**184,185**). Malisic i saradnici pronašli su da TGF β 1 C-509T heterozigoti (CT) imaju statistički značajno nižu stopu akutne toksičnosti u poređenju sa homozigotom (CC plus TT) kod pacijenata sa karcinomom prostate (**82**). IL-6 se smatra jednim od najvažnijih imunoloških markera za predikciju radioterapijom indukovane toksičnosti normalnih tkiva, ne samo kod karcinoma prostate, već i kod drugih maligniteta (**96,97**). Tako su Siva i saradnici pokazali da je rana izmena nivoa IL-6 u plazmi povezana sa višim gradusom toksičnosti pluća kod pacijenata sa nemikrocelularnim karcinomom pluća lečenih radioterapijom (**162**). Prediktivni značaj citokina za nastanak težih oblika mukozitisa i posledičnom neophodnošću plasiranja perkutane endoskopske gastrostome (PEG) kod zračenja tumora regije glave i vrata, ispitivali su i Meirovitz i saradnici. Oni su pratili nivoe proinflammatoryh citokina kao što su TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, antiinflammatoryh citokina kao što je IL-10 i citokina koji aktivira imunski odgovor sIL-2R. Nivoi citokina mereni su Elisa testom iz limfocita zdravih donora, u in vitro uslovima, nakon ozračivanja dozom 5 i 10Gy, kao i iz seruma 23 pacijenta obolelih od karcinoma regije glave i vrata, koji su lečeni radioterapijom dozom od 60-72Gy. Zaključili su da je smanjivanje nivoa sIL-2R i inflammatoryh citokina povezano sa manje izraženim neželjenim efektima radioterapije u smislu razvoja mukozitisa, a samim tim i bez potrebe za plasiranje PEG-a, dok je povećanje nivoa ovih parametara tokom radioterapije, praćeno razvojem težih oblika mukozitisa i neophodnošću plasiranja PEG-a. Dakle, praćenje izmena u nivoima citokina kod tumora regije glave i vrata imaju veliki potencijal da posluže kao prognostički faktori za predviđanje neophodnosti plasiranja PEG-a, pre nego se razviju komplikacije, čime se može omogućiti raniji tretman i prevenirati nastajanje teških komplikacija radioterapije (**186**).

S obzirom na veliki potencijalni značaj citokina za nastanak toksičnosti, u kliničkoj praksi pokušano je razvijanje terapijskih strategija koje mogu imati značaja u ublažavanju radijacijom izazvane toksičnosti normalnih tkiva.

Jedna od tih strategija podrazumevala je inhibiciju proinflammatoryh citokina. Načinjeni su mnogi pokušaji direktnog targetiranja TGF- β puteva, s obzirom da se smatra da TGF- β i sa njim povezan protein, Smad, imaju profibrotični efekat u tkivima nakon izlaganja radioterapiji. Halofuginone, biljni alkaloid, prihvaćen je kao lek od strane Američke administracije za hranu i lekove (eng. US Food and Drug Administration-FDA), za tretman sklerodermije. Lek inhibira razvoj T ćelija pomoćnika, ali takođe interferira sa TGF- β signalnim putevima. Xavier i saradnici pokazali su da ovaj lek može biti efikasan u olakšanju radijacijom indukovane fibroze kod miševa (**187**). Korišćenje inhibitora TGF- β receptora1, LY-364947, Avraham i saradnici su pokazali da dovodi do smanjivanja nastanka fibroze u tkivima nakon radioterapije (**187**).

TNF- α je citokin, produkovan najvećim delom od strane makrofaga, ima značajnu ulogu u nastanku inflamacije. Postoji više FDA prihvaćenih inhibitora TNF- α koji u kliničkoj praksi imaju ulogu u lečenju reumatoidnog artritisa, psorijaze i Kronove bolesti. Na primer, Etanercept, inhibitor TNF- α , značajno olakšava oštećenje kože izazvano radioterapijom kod miševa (**188**).

Terapijska strategija vezana za mobilizaciju stem ćelija, zasniva se na konceptu da stem ćelije mogu biti korišćene za redukciju oštećenja normalnih tkiva nakon primene radioterapije **(189)**. Kostna srž je rezervoar progenitorskih ćelija, uključujući stromalne progenitorske ćelije, endotelne ćelije i hematopoetske progenitorske ćelije. U odgovoru na oštećenje tkiva, ove ćelije se mobilizuju iz kostne srži i dopremaju do tkiva gde dovodi do njegovog oporavka i remodelovanja. Mobilizacija stem ćelija iz kostne srži, koristeći stimulujući faktor granulocitne kolonije (eng. granulocyte colony stimulating factor- G-CSF), indukuje proces oporavka tkiva nakon radioterapijom indukovano oštećenja pljuvačnih žlezda kod miševa **(190)**. Plerixafor je FDA prihvaćen lek, sa primarnom ulogom u lečenju HIV infekcije, ali je pokazano da on može biti značajan aktivator mobilizacije stem ćelija iz kostne srži u perifernu cirkulaciju. Na modelu miševa, pokazano je da ovaj lek značajno ublažava oštećenje kože izazvano radioterapijom **(191)**.

Skorašnja studija ustanovila je prediktivni model koji je uključio nivoe citokina IL-8 i CCL2 pre radioterapije, klinički faktor (prisustvo hipertenzije) i dozimetrijski faktor (srednja doza na pluća) za procenu rizika za razvoj pneumonitisa gradus ≥ 2 kod pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća koji se leče radioterapijom **(192)**. Studija naglašava značaj integracije nivoa citokina i mnogobrojnih kliničkih faktora za pravljenje predikcionih modela za identifikaciju pacijenata sa kancerom koji su pod većim rizikom za razvoj neželjenih efekata radioterapije, što je sugerisano i u našim studijama za pacijente sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom.

Razumevanje kompleksne veze između jonizujućeg zračenja, inflamacije i imunskog odgovora u malignim oboljenjima, identifikacija i validacija novih imunoloških biomarkera, otvaraju nov napredak u radioterapiji sa ciljem optimizacije i personalizacije radioterapijskog tretmana za svakog pacijenta.

Genetički i epigenetički mehanizmi, među kojima su promene u nivoima ekspresije mikroRNK (miRNK), takođe mogu uticati na nastanak radijacione toksičnosti i odgovora na radioterapiju.

U cilju razvoja predikcionih modela za nastanak radijacione toksičnosti zasnovanih na određivanju mikroRNK, brojne su studije koje su ispitivale izmene nivoa miRNA u tkivima i ćelijama tumora kao i u plazmi i serumu i njihovu povezanost sa odgovorom na radioterapiju i nastankom neželjenih efekata radioterapije **(121,122,123)**.

Eksperimentalno je pokazano da miR-21 učestvuje u radijacijom indukovanom efektu ozračenih ćelija na neozračene ćelije – “bystander” efekat (eng. bystander effect) **(193)**, što znači da se nivoi miR-21 menjaju tokom i nakon zračenja čak i u okolnim neozračenim ćelijama preko interćelijskih signala i komunikacija između ozračenih i neozračenih ćelija u telu, naglašavajući značaj određivanja nivoa ove miRNK u različitim tačkama tokom radioterapije. Istraživanje koje su sprovedeli Bonci i saradnici, pokazalo je da povišena ekspresija miR-21 pojačava invazivnost karcinoma prostate i razvoj koštanih metastaza **(194)**. Amankwah je sa svojim saradnicima pokazao da su viši nivoi miR-21 povezani sa rekurentnošću tumora nakon radikalne prostatektomije i ukazali da je ekspresija ove miRNK izraženija kod gojaznih osoba **(195)**.

Lin i saradnici su ukazali na antitumorsko svojstvo miR-146a kod pacijenata sa karcinomom prostate u androgen nezavisnoj ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma prostate PC-3 **(196)**. Niži nivoi miR-146a bili su povezani sa biohemijskim relapsom, višim Glison skorom i pojavom metastaza, to ukazuje da bi terapija sa miR-146a mogla imati značaja u tretmanu karcinoma prostate **(197)**.

Pokazano je da se nivoi miR-155 mogu smanjivati i povećavati u zavisnosti od tipa radioterapije, doze i dužine ekspozicije **(198,199)**. Tako su Chaudhry i saradnici pokazali da nivo miR-155 raste nakon 10cGy hronične ekspozicije, opada nakon 10cGy akutnom izlaganju X zracima 3h i opada nakon 400cGy 3h i 8 frakcija akutne doze **(198)**. Kod karcinoma prostate, pojačana ekspresija miR-155, bila je povezana sa proliferacijom ćelija i progresijom kancera, dok je inhibicija njene ekspresije rezultovala povećanom stopom apoptoze u četiri pregledane ćelijske linije adenokarcinoma prostate: LNCaP, DU145, PC-3 I 22RV1 **(200)**.

Dok su u prethodnim istraživanjima ispitivane izmene nivoa miRNA u tkivima i ćelijama malignog tumora kao i u plazmi i serumu, u našem istraživanju prvi put u savremenoj literaturi,

ispitivana je veza između izmena nivoa miR-21, miR-146a i miR-155 u PBMC normalnih tkiva i nastanka GU radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate tretiranih 3D CRT u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

U našem istraživanju ispitivani su nivoi ekspresije miR-21, jer se ova mikroRNK smatra osetljivom na radioterapiju (115,116,117). miR-21 ima sposobnost da utišava gene čiji proteini regulišu propagaciju ćelijskog ciklusa (119), apoptozu (201) i popravku oštećenja DNK (202). S obzirom da miR-21 nije dovoljna sama po sebi za predikciju hemoradiosenzitivnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate (123), u našem istraživanju ispitivani su nivoi proinflamatornih radiosenzornih miR-146a i miR-155 (122,198), za koje je dokazano da imaju ulogu u intraćelijskoj regulaciji imunskog odgovora (203). miR-155 reguliše i ekspresiju gena uključenih u popravku DNK oštećenja (204), i uključena je u odgovor na hemoradioterapiju ili samo radioterapiju (205,206). PBMCs sadrže i produkuju velike količine miRNK koje regulišu sazrevanje limfocita, njihovu funkciju i diferencijaciju, kao i odgovor na radioterapiju (207,208,209,210). Naši rezultati ukazuju da se nivoi miR-21, miR-146a i miR-155 u PBMCs menjaju tokom radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate. Nivoi miR-21 bili su značajno viši nakon radioterapije nego na prvoj kontroli, mesec dana po završenom radioterapijskom lečenju ($p=0,043$), u grupi pacijenata bez ispoljene radijacione toksičnosti, kao i u grupi pacijenata sa ispoljenom radijacionom toksičnošću ($p=0,046$), što ukazuje da radioterapija može imati uticaj na nivo ekspresije miR-21 u PBMC pacijenata. Takođe su pokazane statistički značajne promene nivoa miR-146a i miR-155 kod pacijenata bez razvoja akutne GU toksičnosti tokom radioterapije ($p=0,042$ i $p=0,041$, redom). U grupi pacijenata bez ispoljene akutne GU toksičnosti, najniži nivoi miR-146a, nađeni su nakon prve kontrole u poređenju sa nivoima pre i nakon radioterapije ($p = 0,028$, $p = 0,046$, redom). Nivoi miR-155 bili su značajno niži nakon prve kontrole, u poređenju sa nivoom pre radioterapije, kod pacijenata bez ispoljene GU toksičnosti ($p = 0,041$). Statistički značajno viši nivoi miR-146 i miR-155 (0,016 i 0,010, redom), i viši nivoi miR-21 koji su bili blizu statističke značajnosti ($p=0,068$) u grupi pacijenata sa akutnom GU toksičnošću, ukazuju da miRNK molekuli imaju odličan potencijal da budu korišćeni kao budući biomarkeri za predikciju akutne GU radijacione toksičnosti. Viši nivoi miR-146a i miR-155 kod pacijenata kod kojih se ispoljila radijaciona GU toksičnost mogu biti povezani sa višom stopom inflamatornog odgovora, dok viši nivoi miR-21 mogu indikovati višu stopu apoptoze i veću radiosenzitivnost (119). Limfociti kao dominantna frakcija PBMCs aktiviraju se tokom imunskog odgovora na radioterapiju i produkuju više nivoa miR-155 nego u fiziološkim uslovima. Visoko pozitivna korelacija između miR-21, miR-146a i miR-155 može da ukaže da ove tri miRNK mogu imati sinergistični efekat, pojačavajući odgovor na zračnu terapiju i mogu biti prepoznati kao budući biomarker za akutnu radijacionu toksičnost. U našem istraživanju, nismo pronašli značajnu vezu između nivoa ekspresije miRNK i standardnih kliničkopatoloških parametara pacijenata, karakteristika tumora i tipa radioterapije, što ukazuje da su nivoi ekspresije miR-21/146a/155 nezavistan faktor akutne GU radijacione toksičnosti.

U istraživanju koje su sprovedeli Xiaoli i saradnici ispitivano je 162 miRNK sa različitom ekspresijom u normalnim tkivima i malignom tkivu kod pacijenata sa karcinomom prostate. Od njih su miRNK sa pojačanom ekspresijom (eng. up-regulated) bile has-mir-153-2, has-mir-92a-1 i has-mir-182, a sa sniženom (eng. down-regulated) bile su has-mir-29a, has-mir-10a i has-mir-221. Ovih 6 miRNK mogle bi da budu budući prognostički i prediktivni biomarkeri odgovora na terapiju karcinoma prostate (211).

Szczyrba i saradnici su 2010.godine pokazali da su 33 miRNK u tkivu pacijenata sa karcinomom prostate bile sa povećanom ili sniženom ekspresijom više od 1,5 puta u poređenju sa normalnim tkivima. Oni su sugerisali da bi miR-143 i miR-145 mogle biti uključene u razvoj karcinoma prostate (212). Song i saradnici sugerisali su da profili ekspresije 20 abnormalnih miRNAs povezanih sa karcinomom prostate, uključujući has-miR-26a, has-miR-152, has-miR-19a, has-miR-30c, has-miR-19b, has-miR-146b-5p mogu biti korišćene za predikciju kliničkog ponašanja karcinoma prostate. Iz toga proizilazi da se miRNK mogu smatrati novim onkogenim ili tumorsupresornim genima i prognostičkim i prediktivnim biomarkerima za prognozu i terapiju karcinoma prostate (213).

Petrović i saradnici opisivali su miRNK uključenih u odgovor na radioterapiju kod pacijenata sa karcinomom prostate i istakli potencijalne kandidate miRNK za biološke testove koji bi u budućnosti mogli imati ulogu u predikciji odgovora na radioterapiju, sa posebnim osvrtom na neželjene efekte radioterapije. Oni su zaključili da bi let-7, miR-21, miR-34a, miR-146a, miR-155 i članovi miR-17/92 grupe mogli biti obećavajući kandidati za razvoj bioloških testova za predikciju radiosenzitivnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom **(102)**. Prediktivni miRNK paneli, naročito za akutna i kasna neželjena dejstva radioterapije, mogu poslužiti kao početna tačka u donošenju odluka za individualizovano planiranje radioterapije. Korpela i saradnici opisali su miRNK panele kao prediktivne biomarkere za odluku o tretmanu, nastanku radijacione toksičnosti i radiosenzitivnosti tumora i njihov model je pionir u polju predikcije toksičnosti povezane sa miRNK. Ovi prediktivni paneli mogli bi da odvoje pacijente koji su pod većim rizikom za nastanak radijacione toksičnosti od onih kod kojih je taj rizik nizak. Takođe, drugi miRNK paneli mogu se koristiti za predikciju radiosenzitivnosti tumora. Sve ovo može pomoći kliničarima u donošenju odluke da li primeniti standardnu dozu radioterapije i standardni režim frakcionisanja ili su potrebne određene modifikacije ili je pak potrebno pribeći drugom modalitetu lečenja umesto radioterapije, naročito kod pacijenata kod kojih postoji rizik za nastanak toksičnosti visokog gradusa ili rezistencije na radioterapijski tretman **(121)**. miRNK modulatori mogu biti korišćeni u bliskoj budućnosti u cilju prevazilaženja radiorezistencije tumora ili smanjivanja radiosenzitivnosti okolnih zdravih tkiva ili se mogu koristiti za predikciju efikasnosti radioterapije kod pacijenata sa karcinomom prostate **(102)**.

Pokazan je potencijalni klinički značaj pojedinih mikroRNK kao biomarkera za predikciju radioterapijom indukovane toksičnosti, uključujući radioterapijom indukovani dermatitis kod karcinoma dojke i ezofagitis kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća **(214,215)**.

Singh i saradnici sprovedli su istraživanje u kojem su sumirani i diskutovani rezultati studija iz savremene literature o uticaju radioterapije na nivo cirkulišućih miRNK u krvi kao i vezi između nivoa ekspresije miRNK i radioterapijom indukovane toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate. Od sedam kliničkih studija, u šest je pokazano da se nivoi 10 miRNK menjaju u plazmi, serumu i perifernim mononuklearnim ćelijama periferne krvi, tokom radioterapije. Nakon radioterapije, nivoi ekspresije miRNK-132-5p, miRNK-151a-5p, miRNK-410 i miRNK-221 bili su povišeni, dok je nivo ekspresije miRNK-23a-3p bio snižen kod pacijenata sa niskim gradusom radioterapijom indukovane toksičnosti. Dalje, kod pacijenata sa visokim gradusom radioterapijom indukovane toksičnosti, nivoi ekspresije miRNK-197-3p, miRNK-151a-5p, miRNK-18b-5p, miRNK-99a i miRNK-21 bili su povišeni, dok je nivo ekspresije miRNK-132-5p bio snižen **(216)**.

Stepanovic i saradnici su u svom istraživanju pokazali da je nivo ekspresije miR-34a kod pacijenata sa glioblastomom bio povišen nakon 15 i 30 frakcija u poređenju sa njihovim nivoima u uzorcima uzetim pre radioterapije **(217)**.

Određene karakteristike miRNK, uključujući visoku stabilnost miRNK u krvi i urinu, čine ih dobrim kandidatima da posluže kao pogodni molekularni biomarkeri za predikciju radijacione toksičnosti **(218,219)**. Međutim, i dalje postoje nedostaci za njihovu kliničku primenu kao pouzdane biomarkere za predikciju radioterapijom indukovane toksičnosti, odnosno neophodna je njihova dalja validacija sa većim brojem pacijenata. Najpre, nedovoljno je studija baziranih na miRNK koje istražuju njihovu povezanost sa nastankom neželjenih efekata radioterapije kod pacijenta sa karcinomom prostate. Stoga je određivanje miRNK kao potencijalnih biomarkera tokom radioterapije neophodno u toku datatih kliničkih istraživanja. Drugo, istraživanje zasnovano na prikupljanju uzoraka krvi neophodno je za formiranje prospektivnih studijskih protokola. To istraživanje bi trebalo da uključi kontrolisanu veličinu uzorka, interpretaciju statističkih rezultata i korišćenje plazme ili seruma. Treće, i u budućnosti bi prospektivne studije trebalo da razmotre uzimanje uzoraka krvi pre, tokom i nakon radioterapije u cilju evaluacije nivoa ekspresije miRNK i praćenje kako bi se kvantifikovala akutna i kasna toksičnost uzrokovana radioterapijom.

Iako su studije koje su ispitivale značaj individualnih i kliničkih karakteristika, kao i molekularnih biomarkera za nastanak radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate, omogućile visok potencijal za razvoj predikcionih modela radijacione toksičnosti, za njihovu

validaciju i rutinsku primenu u kliničkoj praksi kao i personalizovani pristup u radioterapiji, u budućnosti su neophodna dalja istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata našeg istraživanja, zaključci koji se mogu izvesti su sledeći:

1. U grupi radikalno zračenih pacijenata postojao je statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GI i GU toksičnosti u vremenu ($b=0,096$, $p<0.001$; $b=0,142$, $p<0.001$, redom), dok nije postojao statistički značajan pozitivan trend porasta stepena kasne GI i GU toksičnosti u vremenu ($b=0,006$, $p=0,277$; $b=0,010$; $p=0,344$).

2. U grupi zračenih operisanih pacijenata zbog krcinoma prostate, postojao je statistički značajan pozitivan trend porasta stepena akutne GI i GU toksičnosti u vremenu ($b=0,105$, $p<0.001$; $b=0,132$, $p<0.001$, redom), dok nije postojao statistički značajan pozitivan trend porasta stepena kasne GI i GU toksičnosti u vremenu ($b=-0,001$, $p=0,955$; $b=-0,008$; $p=0,513$).

3. Ispitivanjem individualnih, kliničkih i dozimetrijskih karakteristika dobijeni su sledeći statistički značajni rezultati:

- u grupi radikalno zračenih pacijenata, veći stepen kasne GU toksičnosti imali su ispitanici sa prethodnim operacijama ($b=0,261$; $p=0,019$).
- u ispitivanoj grupi radikalno zračenih i operisanih zračenih pacijenata zbog karcinoma prostate, pokazana je značajna asocijacija između višeg gradusa akutne GU toksičnosti tokom radioterapije i prisustva Diabetes mellitusa ($b=0,540$; $p<0,007$).
- u grupi zračenih operisanih pacijenata, veći stepen kasne GI toksičnosti imali su ispitanici sa većim V65 za rektum ($b=0,008$; $p=0,037$).

4. Naše istraživanje pokazalo je da bi praćenje izmena u nivoima cirkulišućih citokina tokom radioterapije, više nego njihovih apsolutnih nivoa, moglo biti značajno za predviđanje radijacione toksičnosti.

- povećanje koncentracije IL-6 tokom vremena u serumu pacijenata sa karcinomom prostate lečenih radioterapijom, statistički značajno je povezano sa višim stepenom akutne GU toksičnosti tokom terapije ($b=0,018$; $p=0,039$). Pokazano je da postoji trend ka asocijaciji između povišenih koncentracija IL-2 i viših gradusa akutne GU toksičnosti, ali to nije bilo statistički značajno ($b=0,018$; $p=0,081$).

- nivoi IL-6 i IFN- γ značajno su bili viši u grupi pacijenata tretiranih radikalnom nego u grupi pacijenata kod kojih je sprovedena postoperativna zračna terapija ($p=0,001$; $p=0,020$, redom).

5. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da cirkulišući nivoi IL-6 i TGF- β 1 mogu imati uticaja na nastanak akutne GU toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom.

- pokazana je značajno pozitivna korelacija između koncentracije cirkulišućeg TGF- β 1 u serumu pre radioterapije i maksimalnog gradusa akutne GU toksičnosti ($p=0,036$).

- dobijena je pozitivna korelacija između koncentracije TGF- β 1 merene nakon 25 frakcija radioterapije i gradusa GU toksičnosti nakon ove frakcije kod pacijenata sa karcinomom prostate koji se leče radioterapijom ($p=0,044$).

- nivo cirkulišućeg IL-6 bio je značajno viši nakon 25. frakcije radioterapije u poređenju sa njegovim nivoom pre zračne terapije ($p<0,00001$).

- nivoi IL-6 nakon 25. frakcije bili su pozitivno povezani sa gradusom GU toksičnosti nakon ove frakcije ($p=0,063$).

6. U našem istraživanju pokazane su izmene nivoa miR-21/146a/155 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi tokom radioterapije. Iz toga se može zaključiti da miR-21/146a/155 mogu poslužiti u budućnosti kao nezavisni prediktivni biomarkeri za nastanak akutne genitourinarne (GU) toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate.

- u grupi pacijenata bez akutne GU toksičnosti, detektovani su najviši nivoi miR-21 nakon poslednje frakcije radioterapije ($p=0,043$).

- pokazan je trend prema višim nivoima miR-21 i značajno višim nivoima miR-146a i miR-155 u grupi pacijenata sa akutnom GU toksičnošću u odnosu na grupu pacijenata bez ispoljene GU toksičnosti ($p=0,068$; $p=0,016$; $p=0,010$, redom).

- detektovane su značajne izmene u nivoima miR-146a i miR-155 u grupi pacijenata bez ispoljene GU toksičnosti tokom radioterapije ($p=0,042$ i $p=0,041$, redom).

7. Naši rezultati otvorili su novi aspekt istraživanja biomarkera baziranih na miRNK, indikujući da pored izolacije miRNK iz seruma i tkiva, takođe i miRNK izolovane iz mononuklearnih ćelija periferne krvi, mogu imati veliki potencijal za predikciju toksičnosti.

8. Uzevši sve u obzir, može se zaključiti da poznavanje individualnih, kliničkih i dozimetrijskih parametara predstavlja samo deo slagalice kompleksnog mehanizma nastanka radijacione toksičnosti i nije dovoljno za njegovo potpuno razumevanje. Integracija ovih parametara i više bioloških faktora poput izmena nivoa citokina u serumu tokom radioterapije i ekspresije miRNK u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, od značaja je za razvoj modela za predikciju radijacione toksičnosti kod pacijenata sa karcinomom prostate.

9. Verujemo da bi rezultati ove disertacije mogli biti jedan korak bliže u razumevanju molekularnih mehanizama nastanka toksičnosti izazvane radioterapijom.

10. Očekuje se da će rezultati budućih istraživanja potvrditi značaj predikcionih modela radijacione toksičnosti, što bi u kliničkoj praksi značilo bolju stratifikaciju pacijenata u subgrupe sa većim odnosno manjim rizikom za razvoj toksičnosti radioterapije. To bi omogućilo dalju strategiju razvoja individualizovanog pristupa radioterapiji i poboljšanje kvaliteta života nakon lečenja pacijenata obolelih od karcinoma prostate.

7. LITERATURA

- 1.** Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. Basic Radiation Oncology 2010; (8): 363-385
- 2.** Oh WK, Hurwitz M, D'Amico AV, Richie JP, Kantoff PW. Biology of Prostate Cancer. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
- 3.** McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. Prostate. 1981;2(1):35-49.
- 4.** Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-249.
- 5.** Serbian Cancer Registry. Malignant tumors in Republic of Serbia: 2018. Belgrade: Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović - Batut"; 2020.
- 6.** Bechis SK, Carroll PR, Cooperberg MR. Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. J Clin Oncol. 2011 Jan 10;29(2):235-41.
- 7.** Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. Acta Med Indones. 2016 Jul;48(3):228-238.
- 8.** Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. World J Oncol. 2019 Apr;10(2):63-89.
- 9.** Akaza H, Kanetake H, Tsukamoto T, Miyanaga N, Sakai H, Masumori N et al. REDUCE Study Group. Efficacy and safety of dutasteride on prostate cancer risk reduction in Asian men: the results from the REDUCE study. Jpn J Clin Oncol. 2011 Mar;41(3):417-23.
- 10.** Ferlay J EM, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A et al. Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, Accessed 02 February 2019.
- 11.** Daniyal M, Siddiqui ZA, Akram M, Asif HM, Sultana S, Khan A. Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(22):9575-8.
- 12.** Brierley JD, Gospodariwicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumors. 8th ed. Wiley-Blackwell; 2016. 272 p.
- 13.** Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, Schalken JA, Rittenhouse H (2007) Molecular markers for prostate cancer. Cancer Lett. 2007; 249(1):5–13 (review)
- 14.** Zheng X-Y, Zhang P, Xie P, You QH, Cai BS, Qin J. Prostate specific antigen velocity (PSAV) and PSAV per initial volume (PSAVD) for early detection of prostate cancer in Chinese men. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13, 5529-33.
- 15.** Cooperberg MR, Moul JW and Carroll PR. The changing face of prostate cancer. Clin Oncol 2005; 23:8146-8151
- 16.** Gunelli R, Fragalà E, Fiori M. PCA3 in Prostate Cancer. Methods Mol Biol. 2021;2292:105-113.

17. Sanda M, Wei J, Broyles D, Shin S, Partin A, Klee G et al. (2013) Evaluation of the Prostate Health Index (PHI) for improving prostate cancer detection and identification of clinically significant prostate cancer in the 4 to 10 ng/mL PSA range. In: Proceedings of American Urological Association Annual Meeting, San Diego
18. Lazzeri M, Haese A, de la Taille A, Palou Redorta J, McNicholas T, Lughezzani G et al. Serum isoform [-2]proPSA derivatives significantly improve prediction of prostate cancer at initial biopsy in a total PSA range of 2–10 ng/ml: a multicentric European study. *Eur Urol.*2013;63: 986–994.
19. Loeb S, Catalona WJ. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. *Ther Adv Urol.* 2014 Apr;6(2):74-7.
20. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and Clinical Findings to Predict Tumor Extent of Nonpalpable (Stage T1c) Prostate Cancer. *JAMA* (1994) 271(5):368–74.
21. Chiu ST, Cheng YT, Pu YS, Lu YC, Hong JH, Chung SD et al. Prostate Health Index Density Outperforms Prostate Health Index in Clinically Significant Prostate Cancer Detection. *Front Oncol.* 2021 Nov 19;11:772182.
22. N. Mottet, R.C.N. van den Bergh, E. Briers, P. Cornford, M. De Santis, S. Fanti, et al. Prostate Cancer. [Internet]. European Association of Urology; [cited 2019 Jun 24]. Available from: <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer>.
23. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2017 Apr;71(4):618–29.
24. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL. ISUP grading committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29(9):1228-42.
25. Scher HI, Scardino PT, Zelefsky MJ. Cancer of the Prostate. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Divita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 10th ed. Wolters Kluwer Health; 2015. p. 932–80.
26. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. 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.
27. National Comprehensive Cancer Network. Prostate Cancer (Version 2.2019) [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 24]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf
28. NCCN Guidelines Version 4.2024 Prostate Cancer.
Available at: https://www.nccn.org/guidelines/category_1
29. Roach M. Re: The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol.* 1993 Dec;150(6):1923–4.
30. Carter HB. Optimizing Active Surveillance. *Eur Urol.* 2016 Dec;70(6):909-911.

- 31.** Cagiannos I, Karakiewicz P, Eastham JA, Ohori M, Rabbani F, Gerigk C et al. A preoperative nomogram identifying decreased risk of positive pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer. *J Urol* 2003;170:1798-803.
- 32.** Briganti A, Larcher A, Abdollah F, Capitanio U, Gallina A, Suardi N et al. Updated nomogram predicting lymph node invasion in patients with prostate cancer undergoing extended pelvic lymph node dissection: the essential importance of percentage of positive cores. *Eur Urol* 2012;61:480-487.
- 33.** Gandaglia G, Ploussard G, Valerio M, Mattei A, Fiori C, Fossati N et al. A novel nomogram to identify candidates for extended pelvic lymph node dissection among patients with clinically localized prostate cancer diagnosed with magnetic resonance imaging-targeted and systematic biopsies. *Eur Urol* 2019;75:506-514.
- 34.** Gandaglia G, Martini A, Ploussard G, Fossati N, Stabile A, De Visschere P et al; EAU-YAU Prostate Cancer Working Group. External validation of the 2019 Briganti nomogram for the identification of Prostate cancer patients who should be considered for an extended pelvic lymph node dissection. *Eur Urol* 2020;78:138-142.
- 35.** Hope TA, Eiber M, Armstrong WR, Juarez R, Murthy V, Lawhn-Heath C et al. Diagnostic accuracy of 68Ga-PSMA-11 PET for pelvic nodal metastasis detection prior to radical prostatectomy and pelvic lymph node dissection: A multicenter prospective phase 3 imaging trial. *JAMA Oncol* 2021;7:1635-1642.
- 36.** Pienta KJ, Gorin MA, Rowe SP, Carroll PR, Pouliot F, Probst S et al. A phase 2/3 prospective multicenter study of the diagnostic accuracy of prostate specific membrane antigen PET/CT with 18F-DCFPyL in prostate cancer patients (OSPReY). *J Urol* 2021;206:52-61.
- 37.** Grubb RL III, Vardi IY, Bhayani SB, Kibel AS. Minimally invasive approaches to localized prostate carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am.*2006;20(4): 879-895 (review)
- 38.** Foroudi F, Tyldesley S, Barbera L, Huang J, Mackillop WJ. Evidence-based estimate of appropriate radiotherapy utilization rate for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;55(1):51–63.
- 39.** Gomes ER, Franco MS. Combining Nanocarrier-Assisted Delivery of Molecules and Radiotherapy. *Pharmaceutics.* 2022;14(1):105.
- 40.** Kim JH, Jenrow KA, Brown SL. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiat Oncol J.* 2014;32(3):103-15.
- 41.** Zelefsky MJ, Daly ME, Valicenti RK. Low-Risk Prostate Cancer. In: Halperin EC, Wazer DE, Perez CA, Brady LW, editors. *Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology.* 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1280–311
- 42.** Izawa JI. Salvage radiotherapy after radical prostatectomy. *Can Urol Assoc J.* 2009 Jun;3(3):245-250.
- 43.** Koper PC, Stroom JC, van Putten WL, Korevaar GA, Heijmen BJ, Wijnmaalen A, et al. Acute morbidity reduction using 3DCRT for prostate carcinoma: a randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Mar;43(4):727-34.

44. Fischer-Valuck BW, Rao YJ, Michalski JM. Intensity-modulated radiotherapy for prostate cancer. *Transl Androl Urol.* 2018 Jun;7(3):297-307.
45. Higuchi D, Ono T, Kakino R, Aizawa R, Nakayasu N, Ito H, et al. Evaluation of internal margins for prostate for step and shoot intensity-modulated radiation therapy and volumetric modulated arc therapy using different margin formulas. *J Appl Clin Med Phys.* 2022 Sep;23(9):e13707
46. Doležel M, Odrážka K, Vaňásek J, Štuk J, Hlávka A, Vítková M, et al. Long-Term Clinical Results of IGRT in Prostate Cancer Treatment. *Klin Onkol.* 2020 Winter;33(1):49-54.
47. Zelefsky MJ, Kollmeier M, Cox B, Fidaleo A, Sperling D, Pei X, et al. Improved clinical outcomes with high-dose image guided radiotherapy compared with non-IGRT for the treatment of clinically localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Sep;84(1):125-9.
48. Michalski JM, Moughan J, Purdy J, Bosch W, Bruner DW, Bahary JP et al. Effect of Standard vs Dose-Escalated Radiation Therapy for Patients With Intermediate-Risk Prostate Cancer: The NRG Oncology RTOG 0126 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2018 Jun 14;4(6):e180039.
49. Steenbakkens RJ, Duppen JC, Betgen A, Lotz HT, Remeijer P, Fitton I et al. Impact of knee support and shape of tabletop on rectum and prostate position. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:1364-72.
50. International Commission on Radiation Units and Measurements ICRU report N050. Prescribing, recording and reporting photon beam therapy. Bethesda, MD: ICRU: 1993
51. International Commission on Radiation Units and Measurements ICRU report 62: Prescribing, recording and reporting photon beam therapy (supplement to ICRU report 50). Bethesda: International Commission on Radiation Units and Measurements; 1999.
52. International Commission on Radiation Units and Measurements. Prescribing, Recording, and Reporting Photon-Beam Intensity-Modulated Radiation Therapy (IMRT). ICRU Report 83. Vol. 10, Journal of the ICRU. Oxford University Press; 2010 Apr.
53. Purdy JA (2004) Current ICRU definitions of volumes: limitations and future directions. *Semin Radiat Oncol* 14(1):27-40 (review)
54. Kantor G, Maingon P, Mornex F, Mazon JJ. Target-volume contours in radiotherapy. General principles. *Cancer Radiother* 2002; 6 (suppl 1):56s-60s (review)
55. Marks LB, et al. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010(76-3):S10-S19
56. Expert Panel on Radiation Oncology-Prostate. Zaorsky NG, Showalter TN, Ezzell GA, Nguyen PL, Assimos DG, et al. ACR Appropriateness Criteria(®) external beam radiation therapy treatment planning for clinically localized prostate cancer, part I of II. *Adv Radiat Oncol.* 2017 Jan;2(1):62–84.
57. Boehmer D, Maingon P, Poortmans P, Baron MH, Miralbell R, Remouchamps V, et al. Guidelines for primary radiotherapy of patients with prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2006 Jun;79(3):259–69.
58. Michalski JM, Lawton C, El Naqa I, Ritter M, O’Meara E, Seider MJ, et al. Development of RTOG consensus guidelines for the definition of the clinical target volume for postoperative

- conformal radiation therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Feb 1;76(2):361–8.
- 59.** Hoskin PJ, Rojas AM, Bownes PJ, Lowe GJ, Ostler PJ, Bryant L. Randomised trial of external beam radiotherapy alone or combined with high-dose-rate brachytherapy boost for localised prostate cancer. *Radiother Oncol*. 2012;103(2):217–22.
- 60.** Spratt DE, Zumsteg ZS, Ghadjar P, Kollmeier MA, Pei X, Cohen G, et al. Comparison of high-dose (86.4 Gy) IMRT vs combined brachytherapy plus IMRT for intermediate-risk prostate cancer. *BJU Int*. 2014;114(3):360–7.
- 61.** Hoskin PJ, Colombo A, Henry A, Niehoff P, Paulsen Hellebust T, Siebert F-A, et al. GEC/ESTRO recommendations on high dose rate afterloading brachytherapy for localised prostate cancer: an update. *Radiother Oncol*. 2013 Jun;107(3):325–32.
- 62.** Tharmalingam H, Hamada M, Tsang YM, Hoskin P, Alonzi R. Salvage High-Dose Rate (HDR) Brachytherapy as a Treatment for Locally Recurrent Prostate Cancer after Primary Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2018;102.(3):e118-119
- 63.** Narayan V, Ross AE, Parikh RB, Nohria A, Morgans AK. How to Treat Prostate Cancer With Androgen Deprivation and Minimize Cardiovascular Risk: A Therapeutic Tightrope. *JACC CardioOncol*. 2021 Dec 21;3(5):737-741.
- 64.** Mitsogiannis I, Tzelves L, Dellis A, Issa H, Papatsoris A, Moussa M. Prostate cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2022 May;22(5):577-590.
- 65.** Abdel-Messeih PL, Nosseir NM, Bakhe OH. Evaluation of inflammatory cytokines and oxidative stress markers in prostate cancer patients undergoing curative radiotherapy. *Cent Eur J Immunol*. 2017;42(1):68-72.
- 66.** Stenmark MH, Cai XW, Shedden K, Hayman JA, Yuan S, Ritter T, et al. Combining physical and biologic parameters to predict radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Oct 1;84(2):e217-22.
- 67.** Wang K, Tepper JE. Radiation therapy-associated toxicity: Etiology, management, and prevention. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(5):437–54
- 68.** West CM, Barnett GC. Genetics and genomics of radiotherapy toxicity: towards prediction. *Genome Med*. 2011;3(8):52
- 69.** Berkey FJ. Managing the adverse effects of radiation therapy. *Am Fam Physician*. 2010 Aug;82(4):381-8, 394.
- 70.** Stankovic V, Nikitovic M, Pekmezovic T, Pekmezovic D, Kistic Tepavcevic D, Stefanovic Djuric A, et al. Toxicity of the lower gastrointestinal tract and its predictive factors after 72Gy conventionally fractionated 3D conformal radiotherapy of localized prostate cancer. *J BUON*. 2016 Sept-Oct;21(5):1224-1232.
- 71.** Michalski JM, Winter K, Purdy JA, Parliament M, Wong H, Perez CA, et al. Toxicity after three-dimensional radiotherapy for prostate cancer on RTOG 9406 dose Level V. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Jul 1;62(3):706-13.

- 72.** Cozzarini C, Fiorino C, Da Pozzo LF, Alongi F, Berardi G, Bolognesi A, et al. Clinical factors predicting late severe urinary toxicity after postoperative radiotherapy for prostate carcinoma: a single-institute analysis of 742 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Jan 1;82(1):191-9.
- 73.** Rancati T, Palorini F, Cozzarini C, Fiorino C, Valdagni R. Understanding urinary toxicity after radiotherapy for prostate cancer: first steps forward. *Tumori.* 2017 Sep 18;103(5):395-404.
- 74.** Rattay T, Talbot CJ. Finding the genetic determinants of adverse reactions to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2014 May;26(5):301-8.
- 75.** Cox JD, Stetz JA, Pajak TF. Toxicity criteria of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1341- 1346.
- 76.** Klusa D, Lohaus F, Furesi G, Rauner M, Benešová M, Krause M, et al. Metastatic Spread in Prostate Cancer Patients Influencing Radiotherapy Response. *Front Oncol.* 2021 Mar;10:627379.
- 77.** Pollack A, Zagars GK, Starkschall G, Antolak JA, Lee JJ, Huang E, et al. Prostate cancer radiation dose response: results of the M. D. Anderson phase III randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002 Aug;53(5):1097-105.
- 78.** Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Evidence-based radiation oncology: definitive, adjuvant and salvage radiotherapy for non-metastatic prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2007 Aug;84(2):197-215.
- 79.** Massi MC, Gasperoni F, Ieva F, Paganoni AM, Zunino P, Manzoni A, et al. A Deep Learning Approach Validates Genetic Risk Factors for Late Toxicity After Prostate Cancer Radiotherapy in a REQUITE Multi-National Cohort. *Front Oncol.* 2020;10:541281.
- 80.** Christensen E, Pintilie M, Evans KR, Lenarduzzi M, Ménard C, Catton CN, et al. Longitudinal cytokine expression during IMRT for prostate cancer and acute treatment toxicity. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5576-83.
- 81.** Bower JE, Ganz PA, Tao ML, Hu W, Belin TR, Sepah S, et al. Inflammatory biomarkers and fatigue during radiation therapy for breast and prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep;15(17):5534-40.
- 82.** Mališić E, Petrović N, Brengues M, Azria D, Matić IZ, Srbljak Ćuk I, et al. Association of polymorphisms in TGFB1, XRCC1, XRCC3 genes and CD8 T-lymphocyte apoptosis with adverse effect of radiotherapy for prostate cancer. *Sci Rep.* 2022 Dec;12(1):21306.
- 83.** Penson DF. Quality of life after therapy for localized prostate cancer. *Cancer J.* 2007;13:318–26
- 84.** Singh J, Sohal SS, Ahuja K, Lim A, Duncan H, Thachil T et al. Investigation of circulatory cytokines in patients undergoing intensity-modulated radiotherapy (IMRT) for adenocarcinoma of the prostate and association with acute RT-induced toxicity: A prospective clinical study. *Cytokine.* 2020 Jul;131:155108.
- 85.** Dancea HC, Shareef MM, Ahmed MM. Role of Radiation-induced TGF-beta Signaling in Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol.* 2009;1:44–56.

- 86.** Di Maggio FM, Minafra L, Forte GI, Cammarata FP, Lio D, Messa C et al. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J Inflamm (Lond)*. 2015 Feb 18;12:14.
- 87.** Rubin P, Johnston C. J, Williams J. P, McDonald S, Finkelstein, J. N. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1995;33(1), 99–109.
- 88.** Dirksen, S. R., Kirschner, K. F., Belyea, M. J. Association of symptoms and cytokines in prostate cancer patients receiving radiation treatment. *Biol. Res. Nurs.* 2014;16(3): 250–257 (2014).
- 89.** Bonkhof, H. Factors implicated in radiation therapy failure and radiosensitization of prostate cancer. *Prostate Cancer* 2012, 593241. <https://doi.org/10.1155/2012/593241> (2012).
- 90.** Miao, L., Holley, A. K., Zhao, Y., St Clair, W. H. & St Clair, D. K. Redox-mediated and ionizing-radiation-induced inflammatory mediators in prostate cancer development and treatment. *Antioxid. Redox Signal.* 2014;20(9), 1481–1500.
- 91.** Hong JH, Chiang CS, Campbell IL, Sun JR, Withers HR, McBride WH. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;33:619–26.
ec ima Kim et al
- 92.** Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000 May;342(18):1350-8.
- 93.** Anscher MS, Marks LB, Shafman TD, Clough R, Huang H, Tisch A et al. Risk of long-term complications after TFG-beta1-guided very-high-dose thoracic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:988-95.
- 94.** Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A et al. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* 2002;160:1057-68.
- 95.** Stankovic V, Džamic Z, Pekmezovic T, Tepavcevic DK, Dozic M, Saric M et al. Acute and Late Genitourinary Toxicity after 72 Gy of Conventionally Fractionated Conformal Radiotherapy for Localised Prostate Cancer: Impact of Individual and Clinical Parameters. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2016 Sep;28(9):577-86.
- 96.** Okunieff P, Chen Y, Maguire DJ, Huser AK. Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. *Cancer Metastasis Rev.* 2008 Sep;27(3):363-74.
- 97.** Sprung CN, Forrester HB, Siva S, Martin OA. Immunological markers that predict radiation toxicity. *Cancer Lett.* 2015 Nov;368(2):191-7.
- 98.** Wu CT, Chen MF, Chen WC, Hsieh CC. The role of IL-6 in the radiation response of prostate cancer. *Radiat Oncol.* 2013 Jun;8:159.
- 99.** Janko M, Ontiveros F, Fitzgerald TJ, Deng A, DeCicco M, Rock KL. IL-1 generated subsequent to radiation-induced tissue injury contributes to the pathogenesis of radiodermatitis. *Radiat Res.* 2012;178:166-72.

- 100.** Brown SL, Kolozsvary A, Jenrow KA, Lapanowski K, Kim JH. TNF alpha receptor antagonist mitigates radiation induced acute and sub-acute skin injury in mice (poster PS4-47). In: Presented at the 58th Annual Meeting of the Radiation Research Society; 2012 Sep 29-Oct 4; Puerto Rico.
- 101.** Egidi MG, Cochetti G, Serva MR, Guelfi G, Zampini D, Mechelli L et al. Circulating microRNAs and kallikreins before and after radical prostatectomy: Are they really prostate cancer markers? *Biomed Res Int.* 2013; 24:1780, 2013.
- 102.** Petrović N, Stanojković TP, Nikitović M. MicroRNAs in Prostate Cancer Following Radiotherapy: Towards Predicting Response to Radiation Treatment. *Curr Med Chem.* 2022;29(9):1543-1560.
- 103.** Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116(2): 281–97
- 104.** Fabian MR, Sonenberg N. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Jun 5;19(6):586-93.
- 105.** Petrovic N, Ergün S, Isenovic ER. Levels of MicroRNA Heterogeneity in Cancer Biology. *Mol Diagn Ther.* 2017 Oct;21(5):511-523.
- 106.** Gounaris-Shannon S, Chevassut T. The Role of miRNA in Haematological Malignancy. *Bone Marrow Res.* 2013;2013:269107.
- 107.** Petrovic, N.; Ergun, S. miRNAs as Potential Treatment Targets and Treatment Options in Cancer. *Mol. Diagn. Ther.*, 2018, 22(2), 157-168.
- 108.** Calin GA, Croce CM: MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6: 857–66
- 109.** Chen CZ: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*, 2005; 353: 1768–71
- 110.** Caldas C, Brenton JD: Sizing up miRNAs as cancer genes. *Nat Med*, 2005; 11: 712–14
- 111.** Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle.* 2008;7(16):2591–600.
- 112.** Duan Q, Mao X, Xiao Y, Liu Z, Wang Y, Zhou H et al. Super enhancers at the miR-146a and miR-155 genes contribute to self-regulation of inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1859(4):564-71.
- 113.** Pan X, Wang Z-X, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 2010, 10(12), 1224-1232.
- 114.** Yang Y, Guo JX, Shao ZQ. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. *Asian Pac J Trop Med.* 2017 Jan;10(1):87-91.

- 115.** Hatano K, Kumar B, Zhang Y, Coulter JB, Hedayati M, Mears B et al. A functional screen identifies miRNAs that inhibit DNA repair and sensitize prostate cancer cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res.* 2015 Apr 30;43(8):4075-86.
- 116.** Gwak HS, Kim TH, Jo GH, Kim YJ, Kwak HJ, Kim JH et al. Silencing of microRNA-21 confers radio-sensitivity through inhibition of the PI3K/AKT pathway and enhancing autophagy in malignant glioma cell lines. *PLoS One.* 2012;7(10):e47449.
- 117.** Liu J, Zhu H, Yang X, Ge Y, Zhang C, Qin Q et al. MicroRNA-21 is a novel promising target in cancer radiation therapy. *Tumour Biol.* 2014 May;35(5):3975-9.
- 118.** Lacombe J, Zenhausern F. Emergence of miR-34a in radiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Jan;109:69-78.
- 119.** Anastasov N, Höfig I, Vasconcellos IG, Rappl K, Braselmann H, Ludyga N et al. Radiation resistance due to high expression of miR-21 and G2/M checkpoint arrest in breast cancer cells. *Radiat Oncol.* 2012 Dec 5;7:206.
- 120.** Atarod S, Smith H, Dickinson A, Wang XN. MicroRNA levels quantified in whole blood varies from PBMCs. *F1000Res.* 2014 Aug 5;3:183.
- 121.** Korpela E, Vesprini D, Liu SK. MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador? *Br J Cancer.* 2015 Mar 3;112(5):777-82.
- 122.** Ni J, Bucci J, Chang L, Malouf D, Graham P, Li Y. Targeting MicroRNAs in Prostate Cancer Radiotherapy. *Theranostics.* 2017 Jul 23;7(13):3243-3259.
- 123.** Folini M, Gandellini P, Longoni N, Profumo V, Callari M, Pennati M et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol Cancer.* 2010 Jan 21;9:12.
- 124.** Wei JT, Dunn RL, Litwin MS, Sandler HM, Sanda MG. Development and validation of the expanded prostate cancer index composite (EPIC) for comprehensive assessment of health-related quality of life in men with prostate cancer. *Urology.* 2000;56(6):899–905.
- 125.** Jereczek-Fossa BA, Zerini D, Fodor C, Santoro L, Serafini F, Cambria R et al. Correlation between acute and late toxicity in 973 prostate cancer patients treated with three-dimensional conformal external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 Sep 1;78(1):26-34.
- 126.** Mathieu R, Arango JD, Beckendorf V, Delobel JB, Messai T, Chira C et al. Nomograms to predict late urinary toxicity after prostate cancer radiotherapy. *World J Urol.* 2014 Jun;32(3):743-51.
- 127.** Schmid MP, Pötter R, Bombosch V, Sljivic S, Kirisits C, Dörr W, Goldner G. Late gastrointestinal and urogenital side-effects after radiotherapy--incidence and prevalence. Subgroup-analysis within the prospective Austrian-German phase II multicenter trial for localized prostate cancer. *Radiother Oncol.* 2012 Jul;104(1):114-8.
- 128.** Schultheiss T.E, Hanks G.E, Hunt M.A, Lee R. Incidence of and factors related to late complications in conformal and conventional radiation treatment of cancer of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32:643–649.
- 129.** Schultheiss, T.E., Lee, R., Hunt, M.A., Hanlon, A.L., Peter, R.S., Hanks, G.E. Late GI and GU complications in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37: 3–11

- 130.** Takeda K, Umezawa R, Ishikawa Y, Yamamoto T, Takahashi N, Takeda K et al. Clinical predictors of severe late urinary toxicity after curative intensity-modulated radiation therapy for localized prostate cancer. *J Radiat Res.* 2021 Aug 31;rrab074.
- 131.** Gardner BG, Zietman AL, Shipley WU, Skowronski UE, McManus P. Late normal tissue sequelae in the second decade after high dose radiation therapy with combined photons and conformal protons for locally advanced prostate cancer. *J Urol.* 2002 Jan;167(1):123-6.
- 132.** Valdagni R, Vavassori V, Rancati T, Fellin G, Baccolini M, Bianchi C et al. Increasing the risk of late rectal bleeding after high-dose radiotherapy for prostate cancer: the case of previous abdominal surgery. Results from a prospective trial. *Radiother Oncol.* 2012 May;103(2):252-5.
- 133.** Peeters STH, Heemsbergen WD, Putten W LJ et al. Acute and late complications after radiotherapy for prostate cancer: results of a multicentric randomized trial comparing 68Gy to 78Gy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 61:1019-34.
- 134.** Fiorino C, Fellin G, Rancati T, Vavassori V, Bianchi C, Borca VC et al. Clinical and dosimetric predictors of late rectal syndrome after 3D-CRT for localized prostate cancer: preliminary results of a multicenter prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Mar 15;70(4):1130-7.
- 135.** Song DY, Lawrie WT, Abrams RA, Kafonek DR, Bayless TM, Welsh JS et al. Acute and late radiotherapy toxicity in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001 Oct 1;51(2):455-9.
- 136.** Sleator RD, Cronin M, Hill C. Why appendectomies may lead to an increased risk of functional gastrointestinal disorders. *Med Hypotheses.* 2008 Nov;71(5):814-6.
- 137.** Yahya N, Ebert MA, Bulsara M, Haworth A, Kennedy A, Joseph DJ et al. Dosimetry, clinical factors and medication intake influencing urinary symptoms after prostate radiotherapy: An analysis of data from the RADAR prostate radiotherapy trial. *Radiother Oncol.* 2015;116(1):112–8.
- 138.** Kalakota K, Liauw SL. Toxicity after external beam radiotherapy for prostate cancer: an analysis of late morbidity in men with diabetes mellitus. *Urology.* 2013;81(6):1196–201.
- 139.** Herold DM, Hanlon AL, Hanks GE. Diabetes mellitus: a predictor for late radiation morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Feb 1;43(3):475-9.
- 140.** Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* 2003;4(9):529–36.
- 141.** Alashkham A, Paterson C, Hubbard S, Nabi G. What is the impact of diabetes mellitus on radiation induced acute proctitis after radical radiotherapy for adenocarcinoma prostate? A prospective longitudinal study. *Clin Transl Radiat Oncol.* 2017;14:59–63.
- 142.** Emami B, Lyman J, Brown A Coia L, Goitein M, Munzenrider JE et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;21:109-122.
- 143.** Milano MT, Constine LS, Okunieff P. Normal tissue tolerance dose metrics for radiation therapy of major organs. *Semin Radiat Oncol* 2007;17:131-140.

- 144.** Diser Stank. Vavassori V, Fiorino C, Rancati T et al. Predictor for rectal and intestinal acute toxicities during prostate cancer high-dose 3D-CRT: Results of a prospective multicenter study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007 ; 67 (5):1401- 1410 35
- 145.** Diser Stank. Vadagni R, Rancati T, Fioriono C et al. Development of set of nomograms to predict acute lower gastrointestinal toxicity for prostate cancer 3D-CRT. . *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 ; 74 (4):1065- 73 36
- 146.** Hasterok M, Szołtysik M, Nowicka Z, Goc B, Gräupner D, Majewski W et al. Rectum and Bladder Toxicity in Postoperative Prostate Bed Irradiation: Dose-Volume Parameters Analysis. *Cancers (Basel).* 2023 Nov 9;15(22):5334.
- 147.** Son CH, Melotek JM, Liao C, Hubert G, Pelizzari CA, Eggener SE et al. Bladder dose-volume parameters are associated with urinary incontinence after postoperative intensity modulated radiation therapy for prostate cancer. *Pract Radiat Oncol.* 2016 Sep-Oct;6(5):e179-e185.
- 148.** Nuotio M, Jylha M, Koivisto AM, Tammela TL. Association of smoking with urgency in older people. *Eur Urol.* 2001;40:206-212
- 149.** Solanki AA and Liauw SL. Tobacco Use and EBRT for Prostate cancer: Influence on biochemical control and late toxicity. *Cancer* 2013;119:2807-14
- 150.** Budäus L, Bolla M, Bossi A, Cozzarini C, Crook J, Widmark A, Wiegel T. Functional outcomes and complications following radiation therapy for prostate cancer: a critical analysis of the literature. *Eur Urol.* 2012;61(1):112–27
- 151.** Ishiyama H, Hirayama T, Jhaveri P et al. Is there an increase in genitourinary toxicity in patients treated with transurethral resection of the prostate and radiotherapy? A systematic review. *Am J Clin Oncol* 2014;37:297–304.
- 152.** Heemsbergen WD, Al-Mamgani A, Witte MG, van Herk M, Pos FJ, Lebesque JV. Urinary obstruction in prostate cancer patients from the dutch trial (68 gy vs. 78gy):relationships with local dose, acute effects, and baseline characteristics. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;78:19–25.
- 153.** Dutz A, Agolli L, Baumann M, Troost EGC, Krause M, Hölscher T et al. Early and late side effects, dosimetric parameters and quality of life after proton beam therapy and IMRT for prostate cancer: a matched-pair analysis. *Acta Oncol.* 2019 Jun;58(6):916-925.
- 154.** Dhadda A, lakshman D, Sokal M , Sundar S. Age does not influence acute toxicity during radiotherapy dose escalation for prostate cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2006;18:506-507.
- 155.** Valdagni R, Rancati T, Fiorino C. Predictive models of toxicity with external radiotherapy for prostate cancer: clinical issues. *Cancer* 2009;115:3141-3149.
- 156.** Delobel JB, Gnep K, Ospina JD, Beckendorf V, Chira C, Zhu J et al. Nomogram to predict rectal toxicity following prostate cancer radiotherapy. *PLoS One.* 2017 Jun 22;12(6):e0179845.
- 157.** Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis.* 2002;19:247–58.
- 158.** Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001;357:539–45.

- 159.** Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C. Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1028:1–13.
- 160.** Schae D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review. *Radiat Res.* 2012;178:505–23.
- 161.** Rube CE, Palm J, Erren M, Fleckenstein J, König J, Remberger K et al. Cytokine plasma levels: reliable predictors for radiation pneumonitis? *PLoS One.* 2008 Aug 6;3(8):e2898.
- 162.** Siva, S, MacManus M, Kron T, Best N, Smith J, Lobachevsky P et al. A pattern of early radiation-induced inflammatory cytokine expression is associated with lung toxicity in patients with non-small cell lung cancer. *PLOS ONE* 9(10), e109560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109560> (2014).
- 163.** Citrin DE, Hitchcock YJ, Chung EJ, Frandsen J, Urick ME, Shield W et al. Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies. *Radiat Oncol.* 2012 Apr 26;7:64.
- 164.** Bravatà V, Cammarata FP, Forte GI, Minafra L. “Omics” of HER2-positive breast cancer. *OMICS.* 2013;17:119–29.
- 165.** Scola L, Vaglica M, Crivello A, Palmeri L, Forte GI, Macaluso MC, et al. Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1089:104–9.
- 166.** Scola L, Di Maggio FM, Vaccarino L, Bova M, Forte GI, Pisano C, et al. Role of TGF- β pathway polymorphisms in sporadic thoracic aortic aneurysm: rs900 TGF- β 2 is a marker of differential gender susceptibility. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:165758.
- 167.** Hong JH, Chiang CS, Tsao CY, Lin PY, McBride WH, Wu CJ. Rapid induction of cytokine gene expression in the lung after single and fractionated doses of radiation. *Int J Radiat Biol.* 1999;75:1421–7.
- 168.** Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.* 2011;71:2488–96.
- 169.** Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol.* 2009;10:281–8.
- 170.** Han SK, Song JY, Yun YS, Yi SY. Effect of gamma radiation on cytokine expression and cytokine-receptor mediated STAT activation. *Int J Radiat Biol.* 2006;82:686–97.
- 171.** Shan YX, Jin SZ, Liu XD, Liu Y, Liu SZ. Ionizing radiation stimulates secretion of pro-inflammatory cytokines: dose–response relationship, mechanisms and implications. *Radiat Environ Biophys.* 2007;46:21–9.
- 172.** Dancea HC, Shareef MM, Ahmed MM. Role of Radiation-induced TGF-beta Signaling in Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol.* 2009;1:44–56.
- 173.** Pasi F, Facoetti A, Nano R. IL-8 and IL-6 bystander signalling in human glioblastoma cells exposed to gamma radiation. *Anticancer Res.* 2010;30:2769–72.

- 174.** McDonald TL, Hung AY, Thomas CR, Wood LJ. Localized External Beam Radiation Therapy (EBRT) to the Pelvis Induces Systemic IL-1 β and TNF- α Production: Role of the TNF- α Signaling in EBRT-Induced Fatigue. *Radiat Res.* 2016 Jan;185(1):4-12.
- 175.** Holliday EB, Dieckmann NF, McDonald TL, Hung AY, Thomas CR Jr, Wood LJ. Relationship between fatigue, sleep quality and inflammatory cytokines during external beam radiation therapy for prostate cancer: A prospective study. *Radiother Oncol.* 2016 Jan;118(1):105-11.
- 176.** Bedini N, Cicchetti A, Palorini F, Magnani T, Zuco V, Pennati M et al. Evaluation of Mediators Associated with the Inflammatory Response in Prostate Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *Dis Markers.* 2018 Feb 25;2018:9128128
- 177.** Dirksen SR, Kirschner KF, Belyea MJ. Association of symptoms and cytokines in prostate cancer patients receiving radiation treatment. *Biol Res Nurs.* 2014 Jul;16(3):250-7.
- 178.** Culig, Z. Proinflammatory cytokine interleukin-6 in prostate carcinogenesis. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 2014;2(3): 231–238.
- 179.** Tazaki, E. et al. Serum cytokine profiles in patients with prostate carcinoma. *Exp. Ter. Med.* 2011;2(5): 887–891.
- 180.** Tanji N, Kikugawa T, Ochi T, Taguchi S, Sato H, Sato T, et al. Circulating Cytokine Levels in Patients with Prostate Cancer: Effects of Neoadjuvant Hormonal Therapy and External-beam Radiotherapy. *Anticancer Res.* 2015;35(6):3379–83.
- 181.** Johnke RM, Edwards JM, Evans MJ, Nangami GN, Bakken NT, Kilburn JM et al. Circulating cytokine levels in prostate cancer patients undergoing radiation therapy: influence of neoadjuvant total androgen suppression. *In Vivo.* 2009 Sep-Oct;23(5):827-33.
- 182.** Kovacs CJ, Daly BM, Evans MJ, Johnke RM, Lee TK, Karlsson UL et al. Cytokine profiles in patients receiving wide-field + prostate boost radiotherapy (xRT) for adenocarcinoma of the prostate. *Cytokine.* 2003 Sep 21;23(6):151-63.
- 183.** Zhao L, Wang L, Ji W, Wang X, Zhu X, Hayman JA, et al. Elevation of plasma TGF- β 1 during radiation therapy predicts radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer: a combined analysis from Beijing and Michigan. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;74(5):1385–90
- 184.** Li C, Wilson PB, Levine E, Barber J, Stewart AL, Kumar S. TGF- β 1 levels in pre-treatment plasma identify breast cancer patients at risk of developing post-radiotherapy fibrosis. *Int J Cancer.* 1999;84(2):155–9.
- 185.** Boothe DL, Coplowitz S, Greenwood E, Barney CL, Christos PJ, Parashar B, et al. Transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) is a serum biomarker of radiation induced fibrosis in patients treated with intracavitary accelerated partial breast irradiation: preliminary results of a prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;87(5):1030–6.
- 186.** Meirovitz A, Gross M, Cohen S, Popovtzer A, Barak V. Effect of irradiation on cytokine production in cancer patients. *Int J Biol Markers.* 2022 Dec;37(4):360-367.

- 187.** Xavier S, Piek E, Fujii M, Javelaud D, Mauviel A, Flanders KC et al. Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem* 2004;279:15167-76.
- 188.** Brown SL, Kolozsvary A, Jenrow KA, Lapanowski K, Kim JH. TNF alpha receptor antagonist mitigates radiation induced acute and sub-acute skin injury in mice (poster PS4-47). In: Presented at the 58th Annual Meeting of the Radiation Research Society; 2012 Sep 29-Oct 4; Puerto Rico.
- 189.** Hill RP, Rodemann HP, Hendry JH, Roberts SA, Anscher MS. Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:353-65.
- 190.** Lombaert IM, Wierenga PK, Kok T, Kampinga HH, deHaan G, Coppes RP. Mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced damage to salivary glands. *Clin Cancer Res* 2006; 12:1804-12.
- 191.** Kim JH, Kolozsvary A, Jenrow KA, Brown SL. Plerixafor, a CXCR4 antagonist, mitigates skin radiation-induced injury in mice. *Radiat Res* 2012;178:202-6.
- 192.** Yu H, Wu H, Wang W, Jolly S, Jin JY, Hu C et al. Machine Learning to Build and Validate a Model for Radiation Pneumonitis Prediction in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(14):4343-50.
- 193.** Xu S, Ding N, Pei H, Hu W, Wei W, Zhang X et al. MiR-21 is involved in radiation-induced bystander effects. *RNA Biol*. 2014;11(9):1161-70.
- 194.** Bonci D, Coppola V, Patrizii M, Addario A, Cannistrà A, Francescangeli F et al. A microRNA code for prostate cancer metastasis. *Oncogene*, 2016, 35(9), 1180-1192.
- 195.** Amankwah EK, Anegebe E, Park H, Pow-Sang J, Hakam A, Park JY. miR-21, miR-221 and miR-222 expression and prostate cancer recurrence among obese and non-obese cases. *Asian J Androl*. 2013 Mar;15(2):226-30.
- 196.** Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA*. 2008 Mar;14(3):417-24.
- 197.** Xu B, Huang Y, Niu X, Tao T, Jiang L, Tong N et al. Hsa-miR-146a-5p modulates androgen-independent prostate cancer cells apoptosis by targeting ROCK1. *Prostate*. 2015 Dec;75(16):1896-903.
- 198.** Chaudhry MA, Omaruddin RA, Brumbaugh CD, Tariq MA, Pourmand N. Identification of radiation-induced microRNA transcriptome by next-generation massively parallel sequencing. *J Radiat Res*. 2013 Sep;54(5):808-22.
- 199.** Metheerairut C, Slack FJ. MicroRNAs in the ionizing radiation response and in radiotherapy. *Curr Opin Genet Dev*. 2013 Feb;23(1):12-9.
- 200.** Cai ZK, Chen Q, Chen YB, Gu M, Zheng DC, Zhou J et al. microRNA-155 promotes the proliferation of prostate cancer cells by targeting annexin 7. *Mol Med Rep*. 2015 Jan;11(1):533-8.
- 201.** Buscaglia LE, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chin J Cancer*. 2011 Jun;30(6):371-80.

- 202.** Hu B, Wang X, Hu S, Ying X, Wang P, Zhang X et al. MiR-21-mediated radioresistance Is via promoting repair of DNA double strand breaks. *J.Biol.Chem.*292(2017)3531-3540
- 203.** Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Apr 18;13(5):328-35.
- 204.** Chang S, Wang RH, Akagi K, Kim KA, Martin BK, Cavallone L et al. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat Med.* 2011;17(10):1275-82.
- 205.** Zhao L, Bode AM, Cao Y, Dong Z. Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity. *Carcinogenesis.* 2012 Nov;33(11):2220-7.
- 206.** Hess AK, Müer A, Mairinger FD, Weichert W, Stenzinger A, Hummel M et al. MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2017 May;77:3-12.
- 207.** Atarod S, Smith H, Dickinson A, Wang XN. MicroRNA levels quantified in whole blood varies from PBMCs. *F1000Res.* 2014 Aug 5;3:183.
- 208.** Belver L, Papavasiliou FN, Ramiro AR. MicroRNA control of lymphocyte differentiation and function. *Curr Opin Immunol.* 2011 Jun;23(3):368-73.
- 209.** S Moertl, L. Mutschelknau, T Heider, M. J. Atkinson. MicroRNAs as novel elements in personalized radiotherapy, *Transl. Cancer.Res.* 5 (2016) S1262-S1269.
- 210.** Sun Y, Hawkins PG, Bi N, Dess RT, Tewari M, Hearn JWD et al. Serum MicroRNA Signature Predicts Response to High-Dose Radiation Therapy in Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2018 Jan 1;100(1):107-114.
- 211.** Xiaoli Z, Yawei W, Lianna L, Haifeng L, Hui Z. Screening of Target Genes and Regulatory Function of miRNAs as Prognostic Indicators for Prostate Cancer. *Med Sci Monit.* 2015 Dec 2;21:3748-59.
- 212.** Szczyrba J, Löprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S et al: The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Mol Cancer Res,* 2010; 8(4): 529–38
- 213.** Kim WT, Kim WJ: MicroRNAs in prostate cancer. *Prostate Int,* 2013; 1(1): 3
- 214.** Xu T, Liao Z, O'Reilly MS, Levy LB, Welsh JW, Wang LE et al. Serum inflammatory miRNAs predict radiation esophagitis in patients receiving definitive radiochemotherapy for non-small cell lung cancer. *Radiother Oncol.* 2014 Dec;113(3):379-84.
- 215.** Isomura M, Oya N, Tachiiri S, Kaneyasu Y, Nishimura Y, Akimoto T et al. IL12RB2 and ABCA1 genes are associated with susceptibility to radiation dermatitis. *Clin Cancer Res* 14: 6683-6689, 2008.
- 216.** Singh J, Thachi T, Misir S, Altay D. U., Yaman S. O., Singh, G et al. Expression of microRNAs following radiation therapy and association with severity of radiotherapy-induced toxicity among patients with prostate adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *World Academy of Sciences Journal.*2024; 6(3): 1-12.

- 217.** Stepanović A, Nikitović M, Stanojković TP, Grujičić D, Bukumirić Z, Srbljak I et al: Association between microRNAs 10b/21/34a and acute toxicity in glioblastoma patients treated with radiotherapy and temozolomide. *Sci Rep* 2022;12: 7505
- 218.** Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.*2014; 11: 145-156.
- 219.** Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10513-10518, 2008.

SPISAK SKRAĆENICA

PSA-prostata specifični antigen (eng.prostata specific antigen)
BPH- benigna hipertrofija prostate (eng. benign prostatic hypertrophy)
PCa- karcinom prostate (eng. prostate cancer)
DRE- digitorektalni pregled (eng. digital rectal examination)
CT-kompjuterizovana tomografija (eng. computer tomography)
MR- magnetna rezonanca (eng. magnetic resonance)
PH- patohistološki (eng. pathohistological)
PSAD- gustina PSA (eng.PSA density)
PSAV- brzina promene vrednosti PSA (eng. PSA velocity)
f-PSA- slobodan PSA (eng. free PSA)
csPCa- klinički značajni karcinom prostate (eng. clinical significant prostate cancer)
ISUP- međunarodno udruženje za urološku patologiju (eng. International Society of Urological Pathology)
GS-Glisonov skor
GG- gradus grupa
SCI-scintigrafija skeleta
PET- pozitronska emisiona tomografija
mpMRI- multiparametrijski MR prostate (eng. multiparametric magnetic resonance imaging)
PSMAPET/CT (eng. prostate-specific membrane antigen PET/CT)
EAU- evropsko udruženje urologa (eng. European Association of Urology)
ADT-antiandrogena hormonska terapija (eng. androgen deprivation therapy)
AS- aktivno praćenje (eng. active surveillance)
WW- pažljivo čekanje (eng. watchful waiting)
RRP- radikalna retropubična prostatektomija
PLND- disekciju karličnih limfnih čvorova (eng. pelvic lymph node dissection)
EBRT- transkutana radioterapija (eng. external beam radiotherapy)
BT- brahiterapija (eng. brachytherapy)
3D-CRT- 3 D konformalna radioterapija (eng. 3-D Conformal Radiotherapy)
IMRT - Intenzitetom modulirana radioterapija (eng. Intensity Modulated Radiotherapy)
VMAT- Volumetrijski modulirana lučna terapija (eng. Volumetric Modulated Arc Therapy)
IGRT- slikom vođena radioterapija (eng. image-guided radiotherapy)
ICRU- Međunarodna komisija za radijacione jedinice i merenja (engl. International Commission on Radiation Units and Measurements)
GTV-Volumen tumora (eng. Gross Tumor Volume)
CTV-Klinički volumen mete (eng. Clinical target Volume)
PTV- Planirani ciljni volumen (eng. Planning Target Volume)
OAR- organi od rizika (eng. organs at risk)
QUANTEC- The Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic summary
DVH - histograma volumene doze (eng. Dose Volume Histogram)
HDR- high dose rate
LDR- low dose rate
LHRH- lutenizing-hormone-releasing hormone
QOL- kvalitet života (eng. Quality of Life)
GU-genitourinarna
GI- gastrointestinalna
EORTC- eng. European Organization for Research and Treatment of Cancer
RTOG- eng. Radiation Therapy Oncology Group
miRNK- mikro RNK (eng.miRNA)
TGF-β1-transformišući faktor rasta β1 (eng. transforming growth factor β1)
TNF-α- faktor tumorske nekroze alfa (eng. Tumor necrosis factor-α)

IL-1 α - Interleukin 1 α

IL-1 β - Interleukin 1 β

IL-6-Interleukin 6

type I IFN- tip I interferon

GM-CSF- faktor stimulacije granulocitno-makrofagnih kolonija (eng. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

PBMCs - mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. peripheral blood mononuclear cells)

ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay

EPIC- The Expanded Prostate Cancer Index Composite

PAPS- prethodne operacije abdomena ili male karlice (eng. prior abdominal or pelvic surgery)

Publikovani radovi iz teze:

1. Kopcalic K, Petrovic N, Stanojkovic TP, Stankovic V, Bukumiric Z, Roganovic J, Malisic E, Nikitovic M. Association between miR-21/146a/155 level changes and acute genitourinary radiotoxicity in prostate cancer patients: A pilot study. *Pathol Res Pract.* 2019;215(4):626-631. doi: 10.1016/j.prp.2018.12.007 **M22 IF 2,050**
2. Stanojković TP, Matić IZ, Petrović N, Stanković V, Kopčalić K, Besu I, Đorđić Crnogorac M, Mališić E, Mirjačić-Martinović K, Vuletić A, Bukumirić Z, Žižak Ž, Veldwijk M, Herskind C, Nikitović M. Evaluation of cytokine expression and circulating immune cell subsets as potential parameters of acute radiation toxicity in prostate cancer patients. *Sci Rep.* 2020;10(1):19002. doi: 10.1038/s41598-020-75812-0. **M21 IF 4,380**
3. Kopčalić K, Matić IZ, Besu I, Stanković V, Bukumirić Z, Stanojković TP, Stepanović A, Nikitović M. Circulating levels of IL-6 and TGF- β 1 in patients with prostate cancer undergoing radiotherapy: associations with acute radiotoxicity and fatigue symptoms. *BMC Cancer.* 2022;22(1):1167. doi:10.1186/s12885-022-10255-6. **M22 IF 4,638**
4. Kopcalic K, Nikitovic M, Matic I. Association between serum cytokine levels and the development of acute radiotoxicity in prostate cancer patients. *Medicinski podmladak.*2024; doi:10.5937/mp75-45225 (**M52**)

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Katarina Kopčalić rođena je u Prištini 19.06.1983. godine. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2002/2003. godine na kome je diplomirala 2010. godine sa prosečnom ocenom 9,17 i stekla zvanje doktor medicine. Od septembra 2013. godine zaposlena je u Klinici za radiološku onkologiju i dijagnostiku, Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Oktobra 2015. god upisala je specijalističke studije iz radijacione onkologije. U junu 2016. god završila je specijalističke akademske studije iz radiologije. Školske 2017/2018. godine upisuje doktorske akademske studije, modul Biologija tumora i oksidativna oboljenja, na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Marine Nikitović i VNS dr sc. Ivane Matić. Juna 2021. godine položila je specijalistički ispit iz radijacione onkologije sa odličnom ocenom na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i stekla stručno zvanje Specijalista radijacione onkologije. Nakon položenog specijalističkog ispita postaje član na više konzilijuma iz oblasti urološke i digestivne onkologije. Autor je i koautor više stručnih i naučnih radova. Aktivno učestvuje na brojnim nacionalnim i međunarodnim kongresima i seminarima. Dr Katarina Kopčalić je u aprilu 2020. god izabrana u istraživačko zvanje istraživač-pripravnik od strane Naučnog veća Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, a jula 2024. godine u zvanje istraživač-saradnik. Od oktobra 2024. angažovana je na projektu Horizon Europe Twinning Project (RadExIORSBoost, br No 101158832), finansiran od strane Evropske unije. U oktobru 2024. godine upisuje subspecijalističke studije iz onkologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Катарина Копчалић

Број индекса 2017/5067

Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом

„Предиктивни значај клиничких карактеристика и молекуларних биомаркера за настанак токсичности током и након зрачне терапије код болесника са карциномом простате“

- 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
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора др Катарина Копчалић

Број индекса 2017/5067

Студијски програм Биологија тумора и оксидативна обољења

Наслов рада „Предиктивни значај клиничких карактеристика и молекуларних биомаркера за настанак токсичности током и након зрачне терапије код болесника са карциномом простате“

Ментор Проф. др Марина Никитовић, ВНС др сц. Ивана Матић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: „Предиктивни значај клиничких карактеристика и молекуларних биомаркера за настанак токсичности током и након зрачне терапије код болесника са карциномом простате“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у 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, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.