
TEZĂ DE DOCTORAT – REZUMAT

Managementul diagnostic și terapeutic al cancerului de prostată localizat

Doctorand **Ioan Juravle (Juravle-Bogdan)**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ioan Coman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTERII	13
1. Cancerul de prostată	15
1.1. Epidemiologia cancerului de prostată	15
1.2. Etiologia cancerului de prostată	15
1.3. Factori de risc	18
1.4. Clasificarea cancerului de prostată	20
1.5. Cancerul de prostată semnificativ clinic	22
1.6. Relevanța prognostică a stadializării	23
2. Diagnosticul cancerului de prostată	25
2.1 Examinarea clinică	25
2.2 Antigenul specific prostatic	25
2.3. Alți biomarkeri sangvini și urinari	26
2.4. Biomarkeri folosiți în cazul repetării biopsiei de prostată	28
2.5. Imagistica în cancerul de prostată	28
2.6. Biopsia de prostată	29
2.7. Aspecte histopatologice pe fragmentele de biopsie de prostată și pe piesa de prostatectomie	31
3. Tratamentul cancerului de prostată	33
3.1. Prostatectomia radicală	33
3.2. Radioterapia externă	36
3.3. Terapia hormonală	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	41
1. Ipoteza de lucru/obiective	43
2. Metodologia de lucru	43
3. Studiul 1. Identificarea de noi biomarkeri proteici în cancerul de prostată	45
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru	46
3.3. Materiale și metode	46
3.4. Rezultate	55
3.5. Discuții	65
3.6. Concluzii	67

4. Studiul 2. Validarea analitică a biomarkerilor prin Western Blotting	69
4.1. Introducere	69
4.2. Ipoteza de lucru	70
4.3. Materiale și metodă	70
4.4. Rezultate	71
4.5. Discuții	73
4.6. Concluzii	74
5. Studiul 3. Traducerea și validarea în limba română a Chestionarului Extins al Indicelui Compus pentru Cancerul de Prostată la pacienții supuși prostatectomiei radicale	75
5.1. Introducere	75
5.2. Ipoteza de lucru	76
5.3. Materiale și metode	76
5.4. Rezultate	79
5.5. Discuții	81
5.6. Concluzii	83
6. Discuții generale	85
7. Concluzii generale	87
8. Originalitatea și contribuții inovative ale tezei	89
REFERINȚE	91

INTRODUCERE

Cancerul de prostată (PCa) este a doua cea mai frecventă formă de cancer diagnosticată și a cincea cauză principală de deces prin cancer la bărbați în întreaga lume, cu aproximativ 1.414.000 de cazuri noi de cancer și 375.304 decese în 2020. Perspectivele viitoare sugerează o creștere a ponderei cancerului de prostată, pe fondul îmbătrânirii populației și al creșterii economice globale, cu impact semnificativ asupra stării de sănătate a populației și a sistemelor de îngrijire medicală.

Vârsta înaintată, apartenența la rasa de culoare neagră și istoricul familial sunt factori de risc bine cunoscuți pentru PCa. În plus, au fost identificați și alți factori de risc legați de stilul de viață și alimentație care pot contribui la creșterea riscului de PCa, precum obezitatea, diabetul zaharat și suplimentarea cu vitamina E.

De la introducerea sa la sfârșitul anilor '80, antigenul specific prostatic (PSA) a schimbat evoluția naturală a PCa. Însa în "era PSA", s-a observat o lipsă de sensibilitate și specificitate diagnostică, ceea ce duce la rezultate fals negative și fals pozitive. În plus, PSA nu poate distinge între forme agresive și forme indolente ale bolii, ceea ce determină un număr crescut de biopsii necesare, tratamente excesive pentru cancerule cu risc scăzut, toate având ca rezultat compromisuri nejustificate ale calității vieții urinare și sexuale. După PSA, o serie de alți biomarkeri au fost identificați. Fiecare dintre aceștia prezintă avantaje specifice, dar și limitări, subliniind nevoia urgentă de biomarkeri specifici și sensibili, validați clinic, care să îmbunătățească diagnosticul și managementul PCa. Dat fiind heterogeneitatea PCa, este foarte probabilă necesitatea unui panel de biomarkeri. Astfel, s-au investigat diverse tipuri de probe, inclusiv urină, ser, linii celulare și țesuturi proaspete sau fixate în formol și incluse în parafină (FFPE), utilizând o gamă largă de tehnologii „omice” avansate. Cu toate acestea, studiile proteomice în PCa, la scară largă, cu rezultate validate rămân rare. În plus, majoritatea studiilor de proteomică raportate au utilizat tehnologii proteomice cu rezoluție relativ scăzută (2DE, 2D-DIGE, RPPA), care sunt semicantitative și oferă o acoperire proteomică inadecvată.

Chestionarul EPIC este recunoscut pe scară largă și utilizat la nivel global ca instrument standard pentru evaluarea calității vieții legate de sănătate la pacienții cu PCa după tratament.

Pornind de la aceste neajunsuri, teza de față își propune să contribuie la extinderea cunoștințelor și îmbunătățirea managementului diagnostic și terapeutic al cancerului de prostată localizat prin cele două obiective specifice ale sale:

- (i) identificarea de biomolecule cu rol clasificator, care ar putea servi drept noi biomarkeri pentru cancerul de prostată localizat, prin analizarea unor probe de țesut tumoral prostatic încorporate în parafină, folosind tehnici avansate de proteomică bazată pe spectrometrie de masă.

- (ii) evaluarea calitatății vieții pacienților tratați pentru cancer de prostată prin traducerea, adaptarea culturală și validarea chestionarului EPIC pentru populația din România.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul de prostată (PCa) este al doilea cel mai frecvent diagnosticat cancer la bărbați, cu aproximativ 1,4 milioane de cazuri în întreaga lume în 2020.

Istoricul familial și originea etnică sunt asociate cu o incidență crescută a PCa, sugerând o predispoziție genetică.

O mare varietate de factori exogeni sau de mediu au fost discutați ca fiind asociați cu riscul de a dezvolta PCa sau ca fiind importanți din punct de vedere etiologic pentru progresia de la PCa asimptomatic la forma clinică.

Stadializarea TNM este o reprezentare schematică a extinderii tumorii anatomice, iar gradul patologic al tumorii reflectă caracteristicile intrinseci ale agresivității tumorii. Clasificarea grupurilor de risc EAU, care se bazează în esență pe sistemul de clasificare al lui D'Amico pentru PCa, combină informații clinice despre extinderea tumorii, PSA și criteriile de patologie.

Cancerul de prostată este de obicei suspectat pe baza tușeului rectal și/sau PSA. Diagnosticul definitiv depinde de verificarea histopatologică a adenocarcinomului în probele de biopsie de prostată.

Mai multe teste care măsoară un panou de kalikreine în ser sau plasmă sunt acum disponibile comercial, inclusiv testul Indexul sănătății prostatei (PHI) aprobat de Administrația pentru Alimente și Medicamente din SUA (FDA) (combinând PSA liber și total și izoforma [-2]pro-PSA). [p2PSA]), și testul cu patru scoruri de kalikreină (4K) (măsurând PSA liber, intact și total și peptidaza 2 asemănătoare kalikreinei [hK2] în plus față de vârstă, DRE și starea anterioară de biopsie). Ambele teste sunt menite să reducă numărul de biopsii inutile de prostată la bărbații testați cu PSA. Câteva studii prospective multicentrice au demonstrat că atât testul PHI, cât și testul scor 4K au depășit detectarea f/t PSA PCa, cu o predicție îmbunătățită a csPCa la bărbații cu un PSA între 2-10 ng/mL.

Testul Stockholm3 este un model de predicție care se bazează pe mai multe variabile clinice (vârsta, antecedente familiale de PCa de gradul întâi și biopsie anterioară), biomarkeri din sânge (PSA total, PSA liber, raportul dintre PSA liber și PSA total, kalikreină 2 umană, macrofage, citokină inhibitoare-1 și microseminoproteină-β [MSMB]) și un scor de risc poligenic pentru precizarea riscului de PCa cu ISUP > 2 și s-a demonstrat că reduce procentul de cancere ne semnificative clinic atunci când este utilizat în combinație cu RMN.

Testul Proclarix® este un test pe bază de sânge care estimează probabilitatea apariției csPCa în funcție de rezultatele măsurătorilor pentru trombospondin-1, catepsină D, PSA total, PSA liber și vârsta pacientului. Acest test a fost corelat cu

detectarea PCa semnificativ clinic, în special în cazul RMN-ului echivoc (leziuni PI-RADS 3).

Gena 3 a cancerului de prostată (PCA3) este un biomarker ARN lung non-coding (lncRNA) supraexprimat care este detectabil în sedimentul urinar obținut după masaj prostatic în timpul DRE. Cu toate acestea, utilitatea clinică a testului de urină ProgenSA disponibil comercial pentru PCA3 pentru luarea deciziilor privind biopsia rămâne incertă. Cu toate acestea, combinarea rezultatelor RMN cu scorul PCA3 poate îmbunătăți stratificarea riscului

Testul SelectMDX se bazează în mod similar pe izolarea biomarkerului mARN din urină. Prezența nivelurilor de ARNm HOXC6 și DLX1 este evaluată pentru a oferi o estimare a riscului atât a prezenței PCa la biopsie, cât și prezenței cancerului cu risc ridicat.

Ecografia transrectală standard nu reprezintă un instrument de încredere în detectarea PCa și randamentul diagnostic al biopsiilor suplimentare efectuate pe leziuni hipoecogene este neglijabil. Noile modalități ecografice, cum ar fi micro-Doppler, sonoelastografia sau ecografie îmbunătățită cu contrast, au furnizat constatări preliminare promițătoare, fie singure, fie combinate în așa-numitul „US multiparametric”

Micro-US de înaltă rezoluție funcționează la 29 MHz în loc de 8-12 MHz cu TRUS convențional. Deoarece undele ultrasonice de înaltă frecvență sunt rapid atenuate, micro-US este intrinsec limitat pentru explorarea părții anterioare a prostatelor mari. Micro-US ar putea fi, de asemenea, o alternativă interesantă la fuziunea RMN/US, deoarece majoritatea leziunilor RMN par vizibile pe micro-US.

Imagistica prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) este o modalitate imagistică importantă pentru detectarea și localizarea cancerului de prostată.

Biopsiile țintite prin RMN pot fi utilizate în două căi de diagnosticare diferite: 1) „calea combinată”, în care pacienții cu RMN pozitiv sunt supuși unei biopsii combinate sistematice și țintite, iar pacienții cu RMN negativ sunt supuși biopsiei sistematice; sau 2) „calea RMN”, în care pacienții cu RMN pozitiv sunt supuși doar biopsiei RMN-țintite și pacienții cu RMN negativ care nu sunt deloc biopsiați.

Tratamentul cancerului de prostată

Prostatectomia radicală

Scopul prostatectomiei radicale (RP) prin orice abordare este eradicarea cancerului, ori de câte ori este posibil, cu păstrarea funcției organelor pelvine. Procedura presupune îndepărtarea întregii prostatei cu capsula intactă și a veziculelor seminale, urmata de anastomoza vezico-uretrală. Abordările chirurgicale s-au extins de la abordările deschise perineale și retropubiene la tehnici laparoscopice și asistate de robot. Anastomozele au evoluat de la suturile de aproximare la anastomozele etanșe cu sutură continuă sub vedere directă, iar cartografierea anatomiei complexului venos

dorsal și a nervilor cavernoși a condus la vizualizare excelentă și la potențialul de conservare a funcției erectile.

Radioterapia externă

Radioterapia cu intensitate modulată (IMRT) și metoda de iradiere VMAT (volumetric modulated arc therapy) folosesc colimatoare dinamice, care se adaptează automat și continuu la contururile volumului țintă văzut de fiecare fascicul.

Terapia hormonală neoadjuvantă/adjuvantă plus radioterapie

Combinarea radioterapiei cu cea hormonală adjuvantă și-a dovedit definitiv superioritatea în comparație cu RT în monoterapie urmată de terapia adjuvantă amânată la recidivă. Pentru toate bolile cu risc intermediar o durată scurtă de 4-6 luni este optimă, în timp ce una mai lungă, în jur de 3 ani, este necesară pentru pacienții cu risc ridicat.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Scopul general al tezei de față este investigarea managementului diagnostic și terapeutic al cancerului de prostată localizat, utilizând atât metode analitice moderne pentru identificarea de posibili noi biomarkeri cu rol de diagnostic, cât și metode tradiționale, bazate pe culegerea datelor prin chestionare, care să urmărească impactul tratamentului urmat asupra calității vieții pacienților cu cancer de prostată.

Obiectivele specifice au fost următoarele:

- (i) identificarea de biomolecule cu rol clasificator, care ar putea servi drept noi biomarkeri pentru cancerul de prostată localizat, prin analiza unor probe de țesut tumoral prostatic încorporate în parafină, folosind tehnici avansate de proteomică bazată pe spectrometrie de masă.
- (ii) evaluarea calității vieții pacienților tratați pentru cancer de prostată prin traducerea, adaptarea culturală și validarea chestionarului EPIC pentru populația din România.

Pentru atingerea primului obiectiv propus, au fost analizate probe de țesut încorporate în parafină și fixate în formol (FFPE) prelevate de la 23 de pacienți diagnosticați cu adenocarcinom prostatic. Într-o primă etapă, detaliată în studiul 1 al tezei, s-a efectuat extracția proteinelor din țesuturi, apoi acestea au fost supuse analizei prin cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă tandem (LC-MS/MS), o metodă sensibilă și precisă pentru identificarea și cuantificarea proteinelor din probe complexe. Datele obținute au fost procesate folosind programe software specializate pentru identificarea proteinelor, iar apoi s-a efectuat o analiză bioinformatică pentru a identifica căile semnificative și un posibil panel de biomarkeri asociat cancerului de prostată. Studiul a fost aprobat de Comitetul Etic al Spitalului Clinic Municipal Cluj-Napoca (Decizia nr. 1/2021) și s-a desfășurat respectând standardele etice stabilite în

Declarația de la Helsinki. Toți participanții au furnizat consimțământul lor informat în mod individual înainte de a fi incluși în studiu.

Cel de-al doilea studiu al tezei reprezintă o continuare a celui anterior, și presupune validarea biomarkerilor identificați prin tehnici imunochimice de Western blotting. Western blot, cunoscut și sub numele de imunoblot, este o tehnică biochimică utilizată pentru detectarea specifică și identificarea proteinelor într-o probă de țesut sau de celule. Procesul implică separarea proteinelor prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă în condiții denaturante, apoi transferarea acestora pe o membrană nitrocelulozică. Proteinele transferate sunt apoi detectate utilizând anticorpi specifici care se leagă de proteinele de interes. Această tehnică este esențială în cercetarea biomedicală și în diagnosticul medical, fiind utilizată pentru studii de expresie proteică, identificarea modificărilor post-tranlaționale și pentru validarea biomarkerilor în diverse afecțiuni, inclusiv cancer.

Prin validarea celor patru candidați propuși pentru biomarkeri de diagnostic (GDF15, KLK3, MIF, AZGP1) a oferit o perspectivă detaliată asupra specificității și variabilității acestora în cancerul de prostată.

Pentru atingerea celui de-al doilea obiectiv propus, de evaluare a calității vieții pacienților tratați pentru cancer de prostată, s-a recurs la traducerea, adaptarea culturală și validarea chestionarului "Expanded Prostate Cancer Index" (EPIC), dezvoltată de Școala de Medicină din Michigan. Traducerea a fost realizată de urologi experimentați folosind tehnica de traducere înapoi, corespunzătoare adaptării transculturale a versiunii originale din limba engleză a chestionarului. Versiunea în limba română a EPIC a fost testată în două studii care au evaluat calitatea vieții unui grup de pacienți cu cancer de prostată: o analiză retrospectivă a 112 pacienți care au suferit prostatectomie radicală robotică și un studiu prospectiv care a inclus 120 de pacienți spitalizați înainte de tratamentul chirurgical. Această versiune a chestionarului EPIC a fost revizuită, îmbunătățită, și aplicată pentru a evalua al doilea grup de pacienți la șase luni, doi ani și respectiv cinci ani după intervenția chirurgicală.

După cum se poate observa, metodologia propusă cuprinde atât tehnici moderne de analiză proteomică bazată pe spectrometrie de masă și prelucrarea datelor cu ajutorul programelor software și bazelor de date avansate, cât și metode tradiționale, bine-cunoscute, cum ar fi investigațiile bazate pe chestionar. Aceste abordări sunt fundamentale în cercetarea medicală și în evaluarea impactului asupra calității vieții pacienților. Utilizarea chestionarelor facilitează colectarea sistematică a informațiilor despre simptome, funcționalitatea și efectele tratamentelor, contribuind la o înțelegere comprehensivă a nevoilor și progresului pacienților cu cancer de prostată.

Concluzii generale

În prezent, managementul PCa include dozarea PSA din ser, examenul digital rectal și biopsiile sistemice ghidate ecografic transrectal (TRUS). Biomarkerii moleculari completează instrumentele clinicopatologice existente, oferind informații suplimentare valoroase despre comportamentul biologic al tumorilor de PCa. Recent, progrese semnificative în proteomica globală sau țintită, bazată pe spectrometria de masă au condus la dezvoltarea mai multor biomarkeri moleculari, însă foarte puțini au fost aprobați pentru utilizare clinică, iar integrarea lor în rutina clinică este foarte lentă.

Astfel, cercetarea de față și-a propus să vină în completarea studiilor deja existente despre acești posibili biomarkeri, prin identificarea de noi biomolecule cu rol clasificator în cancerul de prostată localizat, prin analizarea unor probe de țesut tumoral prostatic încorporate în parafină, folosind tehnici avansate de proteomică bazată pe spectrometrie de masă. Studiul reprezintă o abordare inovatoare, multi-modală, care integrează proteomica bazată pe spectrometrie de masă, bioinformatica avansată și analiza de îmbogățire a căilor funcționale. Aceasta abordare a condus la identificarea unui nou panou de proteine capabile să distingă cu acuratețe între țesutul normal și cel tumoral în PCa, marcând un progres semnificativ în domeniu.

Validarea celor patru candidați propuși pentru biomarkeri de diagnostic în PCa prin tehnica Western blot a oferit informații detaliate despre specificitatea și variabilitatea acestora. GDF15 și KLK3 au demonstrat specificitate ridicată pentru țesuturile tumorale, în timp ce MIF a prezentat variații individuale semnificative. Deși nivelurile AZGP1 au scăzut în general în tumorile de prostată, a fost observată o variabilitate individuală considerabilă. Aceste descoperiri subliniază complexitatea expresiei biomarkerilor în PCa și evidențiază necesitatea de a lua în considerare variabilitatea individuală în evaluările diagnostice și prognostice.

În final, ultimul studiu al tezei a arătat ca traducerea, adaptarea și validarea în limba română a chestionarului EPIC, pentru evaluarea calității vieții legate de sănătate (HRQoL), a fost realizată cu succes, fără a întâmpina dificultăți în înțelegere sau completare din partea pacienților. Chestionarul EPIC în limba română pare să prezinte proprietăți psihometrice adecvate, comparabile cu cele ale versiunii originale din limba engleză.

Originalitatea și contribuții inovative ale tezei

Studiile incluse în această teză de doctorat utilizează o varietate de metode analitice, toate convergând spre un obiectiv comun: îmbunătățirea managementului diagnostic și terapeutic al Pca localizat. Majoritatea rezultatelor obținute sunt în concordanță cu datele existente în literatură, consolidând astfel validitatea acestora. Cu

toate acestea, prezenta teză aduce numeroase contribuții inovatoare, evidențiindu-se prin descoperiri semnificative ce promovează progresul în domeniul diagnosticării și tratamentului PCa. Astfel, cercetarea de față nu doar confirmă cunoștințele actuale, ci și extinde orizonturile prin perspective și soluții noi, esențiale pentru avansarea acestui domeniu medical.

Teza de doctorat aduce o contribuție semnificativă și inovatoare în domeniul diagnosticului și tratamentului PCa localizat. Studiile incluse au utilizat atât metode moderne de analiză, de ultima oră, cât și tehnici tradiționale de investigare. Rezultatele obținute au confirmat majoritatea datelor existente în literatură și au introdus noi perspective în cercetarea proteomică și în adaptarea instrumentelor de evaluare a calității vieții, cum este chestionarul EPIC, pentru populația din România. Aceste progrese nu doar că consolidează baza de cunoștințe în domeniu, dar și deschid noi oportunități pentru îmbunătățirea diagnosticului precoce și a managementului personalizat al pacienților cu PCa.

PHD THESIS – RESUME

Diagnostic and therapeutic management of localized prostate cancer

PhD Student **Ioan Juravle (Juravle-Bogdan)**

Scientific supervisor **Prof. Dr. Ioan Coman**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	11
STATE OF THE ART	13
1. Prostate cancer	15
1.1. Epidemiology of prostate cancer	15
1.2. Etiology of prostate cancer	15
1.3. Risk factors	18
1.4. Classification of prostate cancer	20
1.5. Clinically significant prostate cancer	22
1.6. The prognostic relevance of staging	23
2. Diagnosis of prostate cancer	25
2.1 Clinical examination	25
2.2 The prostate-specific antigen	25
2.3. Other blood and urine biomarkers	26
2.4. Biomarkers used in repeat prostate biopsy	28
2.5. Imaging in prostate cancer	28
2.6. Prostate biopsy	29
2.7. Histopathological aspects of prostate biopsy fragments and prostatectomy specimen	31
3. Prostate cancer treatment	33
3.1. Radical prostatectomy	33
3.2. External radiotherapy	36
3.3. Hormonal therapy	38
PERSONAL CONTRIBUTION	41
1. Working hypothesis/objectives	43
2. Work methodology	43
3. Study 1. Identification of new protein biomarkers in prostate cancer	45
3.1. Introduction	45
3.2. Working hypothesis	46
3.3. Materials and methods	46
3.4. Results	55
3.5. Discussions	65
3.6. Conclusions	67

4. Study 2. Analytical validation of biomarkers by Western Blotting	69
4.1. Introduction	69
4.2. Working hypothesis	70
4.3. Materials and methods	70
4.4. Results	71
4.5. Discussions	73
4.6. Conclusions	74
5. Study 3. Translation and validation in Romanian of the Extended Prostate Cancer Composite Index Questionnaire in patients undergoing radical prostatectomy	75
5.1. Introduction	75
5.2. Working hypothesis	76
5.3. Materials and methods	76
5.4. Results	79
5.5. Discussions	81
5.6. Conclusions	83
6. General discussions	85
7. General conclusions	87
8. Originality and innovative contributions of the thesis	89
REFERENCES	91

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is the second most frequently diagnosed form of cancer and the fifth leading cause of cancer-related deaths among men worldwide, with approximately 1.414.000 new cancer cases and 375.304 deaths in 2020. Future projections suggest an increase in the prevalence of prostate cancer due to population aging and global economic growth, with significant impacts on public health and healthcare systems.

Advanced age, being of black race, and family history are well-known risk factors for PCa. Additionally, other lifestyle and dietary factors have been identified that may contribute to an increased risk of PCa, such as obesity, diabetes, and vitamin E supplementation.

Since its introduction in the late 1980s, the prostate-specific antigen (PSA) has changed the natural course of PCa. However, in the "PSA era," a lack of diagnostic sensitivity and specificity has been observed, leading to false negative and false positive results. Moreover, PSA cannot distinguish between aggressive and indolent forms of the disease, resulting in an increased number of unnecessary biopsies and overtreatment of low-risk cancers, all of which lead to unjustified compromises in urinary and sexual quality of life. After PSA, a number of other biomarkers have been identified. Each of these molecules presents specific advantages but also limitations, highlighting the urgent need for specific and sensitive biomarkers, clinically validated, to improve the diagnosis and management of PCa. Given the heterogeneity of PCa, the necessity of a biomarker panel is highly likely. Thus, various types of samples have been investigated, including urine, serum, cell lines, and fresh or formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues, using a wide range of advanced "omics" technologies. However, large-scale proteomic studies in PCa with validated results remain rare. Additionally, most reported proteomic studies have utilized relatively low-resolution proteomic technologies (2DE, 2D-DIGE, RPPA), which are semi-quantitative and provide inadequate proteomic coverage.

The EPIC questionnaire is widely recognized and globally used as a standard tool for assessing health-related quality of life in PCa patients after treatment.

Building on these shortcomings, the present thesis aims to contribute to expanding knowledge and improving the diagnostic and therapeutic management of localized prostate cancer through its two specific objectives:

- (i) identification of classifier biomolecules that could serve as new biomarkers for localized PCa by analyzing paraffin-embedded prostate tumor tissue samples using advanced mass spectrometry-based proteomic techniques.
- (ii) assessment of the life quality of patients treated for PCa by translating, culturally adapting, and validating the EPIC questionnaire for the Romanian population.

STATE OF THE ART

Prostate cancer (PCa) is the second most frequently diagnosed cancer in men, with approximately 1.4 million cases worldwide in 2020. Family history and ethnic background are associated with an increased incidence of PCa, suggesting a genetic predisposition.

A wide variety of exogenous or environmental factors have been discussed as being associated with the risk of developing PCa or as being etiologically important for the progression from asymptomatic PCa to its clinical form. The TNM staging system provides a schematic representation of the anatomical extent of the tumor, while the pathological grade of the tumor reflects the intrinsic characteristics of its aggressiveness. The EAU risk group classification, essentially based on D'Amico's classification system for PCa, combines clinical information about tumor extent, PSA levels, and pathological criteria.

Prostate cancer is usually suspected based on a digital rectal examination (DRE) and/or PSA levels. Definitive diagnosis depends on the histopathological verification of adenocarcinoma in prostate biopsy samples.

Several tests that measure a panel of kallikreins in serum or plasma are now commercially available, including the Prostate Health Index (PHI) test, approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) (combining free and total PSA with the [-2]pro-PSA isoform [p2PSA]), and the 4Kscore test (measuring free, intact, and total PSA along with human kallikrein-related peptidase 2 [hK2] in addition to age, DRE, and prior biopsy status). Both tests are designed to reduce the number of unnecessary prostate biopsies in men tested with PSA. Several prospective multicenter studies have demonstrated that both the PHI and 4Kscore tests outperform free/total PSA in detecting PCa, with improved prediction of clinically significant PCa in men with a PSA between 2-10 ng/mL.

The Stockholm3 test is a prediction model based on several clinical variables (age, first-degree family history of PCa, and previous biopsy), blood biomarkers (total PSA, free PSA, the ratio of free to total PSA, human kallikrein 2, macrophage inhibitory cytokine-1, and microseminoprotein- β [MSMB]), and a polygenic risk score for predicting the risk of PCa with ISUP > 2. It has been shown to reduce the percentage of clinically insignificant cancers when used in combination with MRI.

The Proclarix® test is a blood-based test that estimates the likelihood of clinically significant PCa based on measurements of thrombospondin-1, cathepsin D, total PSA, free PSA, and patient age. This test has been correlated with the detection of clinically significant PCa, especially in cases with equivocal MRI findings (PI-RADS 3 lesions).

Prostate Cancer Antigen 3 (PCA3) is a long non-coding RNA (lncRNA) biomarker that is overexpressed and detectable in urinary sediment obtained after prostatic massage during DRE. However, the clinical utility of the commercially available

Progenitor urine test for PCA3 in biopsy decision-making remains uncertain. Nonetheless, combining MRI results with the PCA3 score may improve risk stratification.

The SelectMDX test similarly relies on the isolation of mRNA biomarkers from urine. The presence of HOXC6 and DLX1 mRNA levels is assessed to provide an estimate of the risk for both the presence of PCa at biopsy and the presence of high-risk cancer.

Standard transrectal ultrasound (TRUS) is not a reliable tool for detecting PCa, and the diagnostic yield of additional biopsies performed on hypoechoic lesions is negligible. New ultrasound modalities, such as micro-Doppler, sonoelastography, or contrast-enhanced ultrasound, have provided promising preliminary findings, either alone or combined in the so-called "multiparametric US."

High-resolution micro-US operates at 29 MHz instead of the conventional TRUS frequency of 8-12 MHz. Since high-frequency ultrasound waves are rapidly attenuated, micro-US is inherently limited for exploring the anterior part of large prostates. Micro-US could also be an interesting alternative to MRI/US fusion, as most MRI lesions seem visible on micro-US.

Magnetic resonance imaging (MRI) is an important imaging modality for the detection and localization of prostate cancer.

MRI-targeted biopsies can be used in two different diagnostic pathways: 1) the "combined pathway," where patients with a positive MRI undergo both systematic and targeted biopsies, and patients with a negative MRI undergo systematic biopsy; or 2) the "MRI pathway," where patients with a positive MRI undergo only MRI-targeted biopsy and patients with a negative MRI do not undergo biopsy at all.

Prostate Cancer Treatment

Radical Prostatectomy

The goal of radical prostatectomy (RP), regardless of the approach, is to eradicate the cancer whenever possible while preserving the function of the pelvic organs. The procedure involves the removal of the entire prostate along with its intact capsule and the seminal vesicles, followed by vesicourethral anastomosis. Surgical approaches have evolved from open perineal and retropubic approaches to laparoscopic and robot-assisted techniques. Anastomoses have advanced from approximation sutures to watertight continuous sutures under direct visualization, and the detailed mapping of the dorsal venous complex and cavernous nerves has led to excellent visualization and the potential for preserving erectile function.

External Radiotherapy

Intensity-modulated radiotherapy (IMRT) and volumetric modulated arc therapy (VMAT) use dynamic collimators that automatically and continuously adjust to the contours of the target volume as seen by each beam.

Neoadjuvant/Adjuvant Hormone Therapy Plus Radiotherapy

Combining radiotherapy with adjuvant hormone therapy has definitively proven superior compared to monotherapy with radiotherapy followed by delayed adjuvant therapy in case of recurrence. For all intermediate-risk cases, a short duration of 4-6 months is optimal, while a longer duration, around 3 years, is necessary for high-risk patients.

PERSONAL CONTRIBUTION

The overall aim of this thesis is to investigate the diagnostic and therapeutic management of localized prostate cancer, utilizing both modern analytical methods for identifying potential new biomarkers with diagnostic roles and traditional methods based on data collection through questionnaires to assess the impact of treatment on the quality of life of prostate cancer patients.

The specific objectives were as follows:

- (i) Identifying classifier biomolecules that could serve as new biomarkers for localized prostate cancer by analyzing paraffin-embedded prostate tumor tissue samples using advanced mass spectrometry-based proteomics techniques.
- (ii) Evaluating the quality of life of patients treated for prostate cancer by translating, culturally adapting, and validating the EPIC questionnaire for the Romanian population.

To achieve the first objective, formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples were analyzed from 23 patients diagnosed with prostate adenocarcinoma. In the first phase, detailed in the study 1 of the thesis, proteins were extracted from the tissues and then analyzed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), a sensitive and precise method for identifying and quantifying proteins in complex samples. The data obtained were processed using specialized software for protein identification, followed by a bioinformatic analysis to identify significant pathways and a potential biomarker panel associated with prostate cancer. The study was approved by the Ethics Committee of the Cluj-Napoca Municipal Clinical Hospital (Decision no. 1/2021) and was conducted in compliance with the ethical standards set out in the Declaration of Helsinki. All participants provided individual informed consent before being included in the study.

The second study in the thesis is a continuation of the previous one, involving the validation of the identified biomarkers using Western blot immunochemical techniques. Western blot, also known as immunoblot, is a biochemical technique used for the specific detection and identification of proteins in a tissue or cell sample. The process involves separating proteins by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing

conditions, followed by transferring them onto a nitrocellulose membrane. The transferred proteins are then detected using specific antibodies that bind to the proteins of interest. This technique is essential in biomedical research and medical diagnosis, being used for protein expression studies, identification of post-translational modifications, and validation of biomarkers in various conditions, including cancer.

The validation of the four proposed diagnostic biomarker candidates (GDF15, KLK3, MIF, AZGP1) provided detailed insights into their specificity and variability in prostate cancer.

To achieve the second objective, assessing the quality of life of patients treated for prostate cancer, the "Expanded Prostate Cancer Index" (EPIC) questionnaire, developed by the University of Michigan Medical School, was translated, culturally adapted, and validated. The translation was done by experienced urologists using a back-translation technique suitable for the transcultural adaptation of the original English version of the questionnaire. The Romanian version of EPIC was tested in two studies that evaluated the quality of life of a group of prostate cancer patients: a retrospective analysis of 112 patients who underwent robotic radical prostatectomy and a prospective study that included 120 patients hospitalized before surgical treatment. This version of the EPIC questionnaire was reviewed, improved, and applied to evaluate the second group of patients at six months, two years, and five years post-surgery.

As can be seen, the proposed methodology includes both modern proteomics analysis techniques based on mass spectrometry and data processing using advanced software and databases, as well as well-known traditional methods, such as questionnaire-based investigations. These approaches are fundamental in medical research and in assessing the impact on the quality of life of patients. The use of questionnaires facilitates the systematic collection of information on symptoms, functionality, and treatment effects, contributing to a comprehensive understanding of the needs and progress of prostate cancer patients.

General Conclusions

Currently, the management of prostate cancer (PCa) includes measuring serum PSA levels, digital rectal examination, and systematic transrectal ultrasound (TRUS)-guided biopsies. Molecular biomarkers complement existing clinicopathological tools, providing additional valuable information about the biological behavior of PCa tumors. Recently, significant advances in global or targeted proteomics, based on mass spectrometry, have led to the development of several molecular biomarkers, but very few have been approved for clinical use, and their integration into routine clinical practice is very slow.

Thus, the present research aimed to supplement existing studies on these potential biomarkers by identifying new classifier biomolecules in localized prostate cancer by analyzing paraffin-embedded prostate tumor tissue samples using advanced mass spectrometry-based proteomics techniques. The study represents an innovative, multi-modal approach that integrates mass spectrometry-based proteomics, advanced bioinformatics, and functional pathway enrichment analysis. This approach led to the identification of a new panel of proteins capable of accurately distinguishing between normal and tumor tissue in PCa, marking a significant advancement in the field.

The validation of the four proposed diagnostic biomarker candidates in PCa using Western blot techniques provided detailed information about their specificity and variability. GDF15 and KLK3 demonstrated high specificity for tumor tissues, while MIF exhibited significant individual variability. Although AZGP1 levels generally decreased in prostate tumors, considerable individual variability was observed. These findings highlight the complexity of biomarker expression in PCa and underscore the need to consider individual variability in diagnostic and prognostic assessments.

Finally, the last study of the thesis showed that the translation, adaptation, and validation of the EPIC questionnaire into Romanian, for evaluating health-related quality of life (HRQoL), was successfully achieved, with no difficulties in understanding or completing it reported by patients. The Romanian version of the EPIC questionnaire appears to have appropriate psychometric properties, comparable to those of the original English version.

Originality and Innovative Contributions of the Thesis

The studies included in this doctoral thesis employ a variety of analytical methods, all converging towards a common objective: improving the diagnostic and

therapeutic management of localized PCa. Most of the results obtained are consistent with existing literature, thereby reinforcing their validity. However, this thesis introduces numerous innovative contributions, standing out through significant discoveries that promote progress in the diagnosis and treatment of PCa. Thus, this research not only confirms current knowledge but also extends horizons through new perspectives and solutions, essential for advancing this medical field.

The doctoral thesis makes a significant and innovative contribution to the field of localized PCa diagnosis and treatment. The studies included have utilized both state-of-the-art modern analysis methods and traditional investigative techniques. The results obtained have confirmed most of the existing literature data and introduced new perspectives in proteomic research and in adapting quality-of-life assessment tools, such as the EPIC questionnaire, for the Romanian population. These advances not only strengthen the knowledge base in the field but also open up new opportunities for improving early diagnosis and personalized management of PCa patients.