



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
KLINIČKA MEDICINA

**EKSPRESIJA PROANGIOGENIH
FAKTORA VASKULARNOG
ENDOTELNOG FAKTORA RASTA I
MATRIKS METALOPROTEINAZE-9 I
NJIHOVA POVEZANOST SA
ANGIOGENEZOM U KARCINOMU
PROSTATE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Slavica Knežević Ušaj

Kandidat: Aleksandra Salapura Dugonjić

Novi Sad, 2014. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET NOVI SAD**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Aleksandra Salapura Dugonjić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Slavica Knežević Ušaj
Naslov rada: NR	Ekspresija proangiogenih faktora vaskularnog endotelnog faktora rasta i matriks metaloproteinaze - 9 i njihova povezanost sa angiogenezom u karcinomu prostate
Jezik publikacije: JP	srpski/latinica
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(Rad sadrži 7 poglavlja / 189 stranica / 20 slika / 27 grafikona / 27 tabela / 368 referenci)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Patologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Neoplazme prostate; Dijagnoza; Patološka neovaskularizacija; Prostataktomija; Vaskularni endotelijalni faktor rasta; Matriks metaloproteinaza 9; Prognoza
UDK	616.65-006.6-07
Čuva se: ČU	Univerzitet u Novom Sadu Biblioteka Medicinskog fakulteta Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad, Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Povećan broj rano dijagnostikovanih karcinoma prostate na uzorcima dobijenim iglenom biopsijom prostate, praćenih posljedičnim radikalnim prostatektomijama, ubrzao je potragu za metodama i markerima primjenjivim na inicijalnim iglenim biopsijama pomoću kojih bi se mogao predvidjeti patološki stadijum i ishod bolesti. Kod više od 50 % muškaraca kojima je nakon primjenjenih standardnih kliničkih i patohistoloških parametara i klinički određenog lokalno ograničenog karcinoma prostate, urađena radikalna prostatektomija i regionalna limfadenektomija, na postoperativnom materijalu dijagnostikovana je lokalno invazivna, a u nekim slučajevima i metastatski proširena bolest. Iako su se parametri, poput histološkog gradusa, nivoa serumskog PSA, klinički određenog stadijuma bolesti ili DNK – ploidijske, dosad pokazali da koreliraju, pojedinačno ili kombinovano, sa patološkim stadijumom bolesti, oni su ipak nedovoljno tačni i prikladni kad se primjenjuju kod svakog pacijenta pojedinačno. Dodatni biomarkeri su neophodni da bi se povećala tačnost u procjeni patološkog stadijuma, ali svaki od ovih markera mora biti primjenjiv na iglenim biopsijama prostate, budući da je to jedini uzorak tkiva koji je moguće uzeti preoperativno. Smatra se da angiogeneza igra važnu ulogu u progresiji i metastaziranju tumora. Ispitivanu populaciju činio je šezdeset i jedan pacijent koji je bio podvrgnut radikalnoj prostatektomiji nakon klinički dijagnostikovanog lokalno ograničenog karcinoma prostate, a koji prethodno nije uzimao hemo-, radio-, niti hormonalnu terapiju preoperativno. Prognostička vrijednost gustine krvnih sudova (eng. microvessel density, MVD) i</p>

	<p>proangiogenih faktora, vaskularnog endotelnog faktora (eng. vascular endothelial factor (VEGF) i matriks-metaloproteinaze – 9 (eng. matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9) procjenjivana je u odnosu na Gleason skor karcinoma prostate i predoperativnog serumskog PSA u radi procjene patološkog stadijuma bolesti, odnosno ekstraprostatične proširenosti bolesti.</p> <p>Neovaskularizacija adenokarcinoma prostate bila je ispitivana na ukalupljenim, serijski sječenim uzorcima iglenih biopsija i tkiva dobijenih radikalnom prostatektomijom. Normalno tkivo prostate je, generalno, pokazivalo negativnu ili nisku ekspresiju VEGF i MMP-9, dok je značajno povećanje ekspresije i VEGF i MMP-9 bilo u skoro svim uzorcima karcinoma prostate, krećući se od ekspresije niskog intenziteta prema ekspresiji visokog intenziteta, koja je bila u pozitivnoj korelaciji sa patološkim stadijumom bolesti (VEGF: $p < 0,0001$; MMP-9: $p < 0,05$), Gleason skorom (VEGF i MMP-9: $p < 0,001$) i MVD (VEGF: $p < 0,05$; MMP-9: $p < 0,001$). Karcinomi prostate u kojima je bila snažnija ekspresija VEGF, imali su i jaču ekspresiju MMP-9. Nije bilo povezanosti između ekspresije VEGF i MMP-9 i predoperativnog serumskog nivoa PSA ($p > 0,1$).</p> <p>Rezultati ovih analiza koji ukazuju na to da su veći nivoi ekspresije VEGF i MMP-9, kao i MVD, povezani sa višim stadijumom tumora (pT3), kao i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (pN1), kao i većim Gleason skorom ($GS \geq 7$), time potvrđujući ulogu angiogeneze, ćelijske kohezije i invazije u procesu metastaziranja.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	Predsednik: Član: Član: Član: Član:

University of Novi Sad

ACI

MSI

Key word
documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. Thesis
Author: AU	Aleksandra Salapura Dugonjić
Mentor: MN	Prof. dr Slavica Knežević Ušaj
Title: TI	Expression of the proangiogenic factors, Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix – metalloproteinase – 9, and their correlation with angiogenesis in prostate carcinoma
Language of text: LT	Serbian (Roman) (scr.)
Language of abstract: LA	English / Serbian (Roman) (scr)
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad

Physical description: PD	7 parts, 189 pages, 368 citates, 27 graphicons, 27 tables and 20 microphotographs
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pathology
Subject, Key words SKW	Prostatic neoplasms; Diagnosis; Neovascularization Pathologic; Prostatectomy; Vascular Endothelial Growth Factor; Matrix Metalloproteinase 9; Prognosis
UC	616.65-006.6-07
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad 21 000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>The increased early detection and subsequent radical surgery of prostatic cancer has prompted the search for methods and markers applicable to the initial core biopsy specimens and predictive for pathological stage and disease outcome. More than 50% of men with clinically localized prostate cancer who are treated by pelvic lymph node dissection and radical prostatectomy (RP) are understaged using established preoperative clinical and pathologic results. Although parameters like histological grade, PSA serum levels, clinical staging or DNA ploidy have been shown to correlate alone or in combination with the final pathological stage, they are inaccurate and inappropriate on an individual basis. Aditonal biomarkers are needed to increase the predictive accuracy for pathologic stage, but each must be evaluable from a needle core biopsy core with cancer, recognizing that this is the only tissue specimen obtained from patients who are not treated surgically.</p> <p>Angiogenesis is believed to play an important role in tumor progression and metastasis. The study population included sixty-one patients who underwent radical prostatectomy (RP) for clinically localized prostate carcinoma and did not receive chemo-, hormone, or radiation therapy before surgery. Predictive value of microvessel density (MVD) and proangiogenic factors, vascular endothelial factor (VEGF) and matrix-metalloproteinase-9 (MMP-9), was evaluated in combination with Gleason score and preoperative serum PSA concentration, for extraprostatic</p>

	<p>extension. The neovascularization of prostatic adenocarcinomas in core biopsies and corresponding prostatectomies was investigated on totally embedded, serially sectioned prostate tissues.</p> <p>Normal prostate tissue generally showed no or only low VEGF and MMP-9 expression, there was a significant increase in VEGF and MMP-9 expression in almost all prostate cancer specimens, the intensity of the immunoreaction ranging from low to strong and being correlated positively with the tumor stage (VEGF: $p < 0,0001$; MMP-9: $p < 0,05$), Gleason score (VEGF and MMP-9: $p < 0,001$) and MVD (VEGF: $p < 0,05$; MMP-9: $p < 0,001$) in prostate carcinoma. Patients who had stronger expression VEGF in prostate carcinoma tissue, also had stronger expression of MMP-9 ($p < 0,05$). There was no correlation between VEGF and MMP-9 expression and preoperative serum PSA ($p > 0,1$).</p> <p>These results showed that stronger expression of VEGF I MMP-9 and higher MVD were present in organ - extending prostate carcinoma (pT3), and in metastatic disease (pN1), and also in tumors with higher Gleason score ($GS \geq 7$), confirming a role of angiogenesis, cell cohesion and invasion in metastatic spread of disease.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	President: Member: Member: Member: Member:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ANATOMIJA I HISTOLOGIJA PROSTATE.....	1
1.2. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA PROSTATE	3
1.2.1. Epidemiološke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na geografsku raspoređenost.....	4
1.2.2. Epidemiologija KP u Srbiji i Vojvodini.....	4
1.2.3. Epidemiološke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na dob	5
1.3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA KARCINOMA PROSTATE.....	5
1.3.1. Etiologija karcinoma prostate.....	5
1.3.2. Porodična istorija.....	5
1.3.3. Hormoni	5
1.3.4. Rasa.....	6
1.3.5. Starenje i oksidativni stres	6
1.3.6. Ishrana	6
1.3.7. Hemikalije koje utiču na endokrini sistem (EDC, eng. endocrine disrupting chemicals)	7
1.3.8. Zanimanje i drugi faktori	7
1.3.9. Patogeneza karcinoma prostate	7
1.3.10. Genotoksični mehanizam.....	8
1.3.11. Negenotoksični mehanizam	8
1.3.12. Benigna prostatična hiperplazija	8
1.3.13. Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN).....	8
1.3.14. Atipična sitno acinusna proliferacija (Atypical small acinar proliferation, ASAP).....	9
1.4. KLINIČKA DIJAGNOSTIKA KARCINOMA PROSTATE.....	10
1.4.1. Klinički znaci i simptomi	10
1.4.2. Skrining i dijagnostika karcinoma prostate.....	11
1.4.2.1. Skrining karcinoma prostate.....	11
1.4.2.2. Dijagnostičke pretrage za karcinom prostate.....	11
1.4.2.2.1. Digitorektalni pregled prostate.....	12
1.4.2.2.2. Prostata specifični antigen (PSA).....	12
1.4.2.2.3. Transrektalni ultrazvučni pregled prostate	13
1.4.2.2.4. Biopsija prostate.....	13
1.4.2.3. Tkivne metode dijagnostikovanja karcinoma prostate.....	14
1.4.2.3.1. Iglena biopsija prostate.....	14
1.4.2.3.2. Aspiraciona citologija prostate tankom iglom (Fine needle aspiration cytology, FNAC).....	14
1.4.2.3.3. Transuretralna resekcija prostate (TURP)	14
1.4.2.3.4. Prostatična enukleacija (suprapubična prostatektomija, adenektomija)	15
1.4.2.3.5. Radikalna prostatektomija.....	15
1.5. PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE KARCINOMA PROSTATE.....	16
1.5.1. Makroskopske karakteristike adenokarcinoma prostate	16

1.5.2. Mikroskopske karakteristike adenokarcinoma prostate	16
1.5.3. Incidentalni karcinom.....	17
1.5.4. "Vanishing" karcinom prostate u radikalnim prostatektomijama	18
1.5.5. Diferencijalna dijagnoza adenokarcinoma prostate	18
1.5.6. Imunohistohemijska analiza karcinoma prostate	19
1.5.7. Histološka diferentovanost karcinoma prostate (histološki gradus)	20
1.5.8. Varijante adenokarcinoma prostate	22
1.5.9. Određivanje stadijuma bolesti.....	25
1.6. PROGNOŠTIČKI PARAMETRI KARCINOMA PROSTATE	26
1.7. PROCES METASTAZIRANJA TUMORA	30
1.8. ZNAČAJ ANGIOGENEZE U TUMORSKOM RASTU I PROCESU METASTAZIRANJA... 34	
1.8.1. Regulacija angiogeneze i faktori angiogeneze	41
1.8.2. Angiogeni faktori.....	43
1.9. VASKULARNI ENDOTELNI FAKTOR RASTA (VEGF).....	45
1.9.1. Biološka aktivnost VEGF-a	45
1.9.2. Struktura VEGF gena i osobine VEGF izoforma	48
1.9.3. Regulacija ekspresije VEGF gena.....	49
1.9.4. VEGF receptori	50
1.9.5. Uloga VEGF i njegovih receptora u fiziološkoj angiogenezi	51
1.9.6. Uloga VEGF u patološkoj angiogenezi.....	52
1.9.6.1. Uloga VEGF u tumorskoj angiogenezi.....	54
1.9.6.1.1. Angiogeni mehanizmi u karcinomu prostate.....	57
1.9.7. Tumorska angiogeneza indukovana VEGF-om kao meta antitumorske terapije.....	59
1.10. ULOGA MATRIKS METALOPROTEINAZA U PROCESU TUMORSKE INVAZIJE I METASTAZIRANJA	60
1.10.1. Podjela matriks metaloproteinaza.....	60
1.10.2. Regulacija aktivnosti matriks metaloproteinaza	63
1.10.2.1. Regulacija ekspresije gena odgovornih za aktivnost MMP-a	63
1.10.2.2. Aktivacija latentnih matriks metaloproteinaza	64
1.10.2.3. Inhibitori matriks metaloproteinaza.....	64
1.10.2.4. Uloga matriks metaloproteinaza u procesu angiogeneze	65
1.10.2.5. Proangiogena uloga MMP	65
1.10.2.5.1. Proangiogena uloga MMP u tumorskoj angiogenezi	66
1.10.2.5.1.1. Uloga MMP-9 u tumorskoj angiogenezi	70
1.10.2.5.1.2. Povezanost VEGF i MMP	71
1.10.2.5.1.3. Uloga matriks metaloproteinaza u karcinomu prostate	72
1.10.2.6. Antiangiogena uloga MMP	73
1.10.3. Matriks metaloproteinaze kao meta antitumorske terapije	74

2.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	76
2.1.	HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	76
2.2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	77
3.	MATERIJAL I METODE.....	78
3.1.	MATERIJAL.....	78
3.2.	METODE RADA.....	79
3.2.1.	<i>Klasične patohistološke metode.....</i>	<i>79</i>
3.2.1.1.	Određivanje histološkog tipa adenokarcinoma prostate.....	79
3.2.1.1.1.	Određivanje histološke diferentovanosti adenokarcinoma prostate.....	79
3.2.1.2.	Određivanje stadijuma bolesti.....	79
3.2.1.3.	Određivanje vrijednosti predoperativnog serumskog PSA.....	80
3.2.2.	<i>Imunohistohemijske metode.....</i>	<i>80</i>
3.2.2.1.	Imunohistohemijska analiza tumorske angiogeneze – analiza ekspresije CD 31.....	81
3.2.2.2.	Imunohistohemijska analiza ekspresije VEGF.....	83
3.2.2.3.	Imunohistohemijska analiza ekspresije MMP-9.....	83
3.2.3.	<i>Statistička obrada podataka.....</i>	<i>84</i>
4.	REZULTATI.....	86
4.1.	DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA ISPITIVANE GRUPE.....	86
4.2.	ANATOMSKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PROSTATE U ISPITIVANOJ POPULACIJI.....	86
4.3.	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PROSTATE U ODNOSU NA PATOHISTOLOŠKI STADIJUM BOLESTI.....	91
4.4.	DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PROSTATE U ODNOSU NA <i>GLEASON</i> SKOR (GS) KARCINOMA PROSTATE.....	94
4.5.	ANALIZA EKSPRESIJE ISPITIVANIH MARKERA ANGIOGENEZE U KARCINOMU PROSTATE.....	96
4.5.1.	<i>Demografske i kliničke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na stepen gustine krvnih sudova (MVD) u tumorskom tkivu.....</i>	<i>96</i>
4.5.1.1.	Odnos gustine krvnih sudova karcinoma prostate i predoperativnih serumskih vrijednosti PSA.....	101
4.5.1.2.	Odnos gustine krvnih sudova karcinoma prostate i stadijuma bolesti.....	103
4.5.1.3.	Odnos gustine krvnih sudova i patohistološkog gradusa karcinoma prostate – <i>Gleason</i> skor (GS).....	104
4.5.1.4.	Odnos gustine krvnih sudova i pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod oboljelih od karcinoma prostate.....	105
4.5.2.	<i>Demografske i kliničke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta – VEGF.....</i>	<i>107</i>
4.5.2.1.	Odnos ekspresije VEGF i predoperativnih serumskih vrijednosti PSA.....	109
4.5.2.2.	Odnos ekspresije VEGF i patohistološkog gradusa karcinoma prostate – <i>Gleason</i> skor (GS).....	111

4.5.2.3. Odnos ekspresije VEGF i stadijuma bolesti kod oboljelih od karcinoma prostate	112
4.5.2.4. Odnos ekspresije VEGF i pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod oboljelih od karcinoma prostate.....	113
4.5.3. <i>Demografske i kliničke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na ekspresiju matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9)</i>	114
4.5.3.1. Odnos ekspresije MMP-9 i predoperativnih serumskih vrijednosti PSA.....	116
4.5.3.2. Odnos ekspresije MMP-9 i patohistološkog gradusa karcinoma prostate – <i>Gleason</i> skor (GS).....	117
4.5.3.3. Odnos ekspresije MMP-9 i stadijuma bolesti kod oboljelih od karcinoma prostate	118
4.5.3.4. Odnos ekspresije MMP-9 i pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod oboljelih od karcinoma prostate.....	119
4.5.4. <i>Odnos gustine krvnih sudova i proangiogenih faktora u adenokarcinomima prostate</i>	120
4.5.4.1. Odnos gustine krvnih sudova i ekspresije VEGF u adenokarcinomima prostate.....	120
4.5.4.2. Odnos gustine krvnih sudova i ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate.....	122
4.5.4.3. Odnos ekspresije VEGF i MMP-9 u karcinomima prostate	123
4.6. MULTIVARIJANTNA ANALIZA ODNOSA KLINIČKOPATOLOŠKIH PARAMETARA, GUSTINE KRVNIH SUDOVA, EKSPRESIJE PROANGIOGENIH FAKTORA I STADIJUMA BOLESTI (pT2 vs pT3) KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD KARCINOMA PROSTATE	124
4.6.1. <i>Karakteristike i homogenost stadijuma (pT2 vs pT3) u odnosu na različite kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore</i>	126
4.7. MULTIVARIJANTNA ANALIZA ODNOSA KLINIČKOPATOLOŠKIH PARAMETARA, GUSTINE KRVNIH SUDOVA, EKSPRESIJE PROANGIOGENIH FAKTORA I METASTAZA U REGIONALNIM LIMFNIM ČVOROVIMA (pN0 vs pN1) KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD KARCINOMA PROSTATE	127
4.8. MULTIVARIJANTNA ANALIZA ODNOSA KLINIČKOPATOLOŠKIH PARAMETARA, GUSTINE KRVNIH SUDOVA, EKSPRESIJE PROANGIOGENIH FAKTORA I HISTOLOŠKE DIFERENTOVANOSTI, GLEASON SKORA (< 7 vs ≥ 7) KARCINOMA PROSTATE	128
4.9. KARAKTERISTIKE I HOMOGENOST HISTOLOŠKE DIFERENTOVANOSTI KP IZRAŽENE PUTEM GLEASON SKORA (< 7 vs ≥ 7) U ODNOSU NA RAZLIČITE KLINIČKOPATOLOŠKE PARAMETRE, MVD I PROANGIOGENE FAKTORE	129
5. DISKUSIJA	131
6. ZAKLJUČCI	153
7. LITERATURA	155

Korišćene skraćenice

A

aFGF - kiseli fibroblastni faktor rasta (eng. *acidic fibroblast growth factor*)

AJCC - Američki udruženi odbor za karcinome (eng. *American Joint Committee on Cancer*)

AMACR - (eng. *alpha-methylacyl-CoA-racemase*)

AMF - autokrini faktor motiliteta (eng. *autocrine motility factor*)

AP-1 - (eng. *activator protein 1*)

ASAP - atipična sitno acinusna proliferacija (eng. *Atypical small acinar proliferation*)

B

BCH - hiperplazija bazalnih ćelija

bFGF - fibroblastni faktor rasta (eng. *basic fibroblast growth factor*)

BM - bazalna membrana

BPH - benigna prostatična hiperplazija (BPH)

C

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CAMs - ćelijske adhezivne molekule (eng. *cellular adhesive molecules*)

CAP - Kolegij američkih patologa (eng. *College of American Pathologists*)

CCCH - svijetloćelijska kribriformna hiperplazija (eng. *clear cell cribriform hyperplasia*)

CEUS – (eng. *contrast enhanced ultrasonography*)

COX-2 – ciklooksigenaza -2

D

DAB - 3,3'-diaminobenzin

DV - drenirajuće vene (*draining veins*)

E

ECM - ekstracelularni matriks

EDC - hemikalije koje utiču na endokrini sistem (eng. *endocrine disrupting chemicals*)

EGF - epidermalni faktor rasta (eng. *epidermal growth factor*)

EPE - ekstraprostatična ekstenzija

ETS - porodica transkripcionih faktora ETS – domene)

F

FA - opskrbljujuće arterije (eng. *feeder arteries*)

FGF - fibroblastni faktor rasta (eng. *fibroblast growth factor*)

G

GMP - glomeruloidne mikrovaskularne proliferacije (eng. *glomeruloid microvascular proliferations*)

GS - Gleason skor (eng. *Gleason score*)

H

HG PIN - PIN visokog stepena (eng. *high grade PIN*)

HGF - hepatocitni faktor rasta (eng. *hepatocyte growth factor*)

HIF-1 α - (eng. *factor inhibiting antibody*)

HMWCK - citokeratin visoke molekularne težine (eng. *high molecular weight cytokeratin*)

I

IB - iglena biopsije prostate

IGF - insulinu sličan faktor rasta I i II (eng. *insulin like growth factor I and II*),

IHC - imunohistohemija (eng. *immunohistochemistry*)

IL - interleukin

K

KP - karcinom prostate

L

LG PIN - PIN niskog stepena (eng. *low grade PIN*)

M

MAPKs - (eng. *mitogen activated protein kinases*)

MF- makrofagi

MHC - Kompleksi histokompatibilnosti (eng. *major histocompatibility complex*)

MMP - Matriks metaloproteinaza (eng. *Matrix metalloproteinase*)

MV - Krvni sudovi "majke" (eng. *mother vessels*)

MVD - gustina krvnih sudova (eng. *microvessel density*)

MRI – magnetna rezonanca (eng. *magnetic resonance imaging*)

N

NO - azotni oksid (eng. *Nitric oxyd*)

O

OMVD - optimizovana MVD

OPN - osteopontin

P

PAI - inhibitor aktivatora plazminogena-1 (eng. *Plasminogen activator inhibitor-1*)

PCA3 - Antigen karcinoma prostate 3 (eng. *prostate cancer antigen 3*)

PDGF - trombocitni faktor rasta (eng. *platelet- derived growth factor*)

PDGFR – receptor trombocitnog faktora rasta

PECAM-1 - trombocitni endotelijalni ćelijski adhezioni molekul

PhiP - 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b) pyridine)

PIN - prostatična intraepitelna neoplazija

PIGF - placentalni faktor rasta (eng. *placental growth factor*)

PMNG - polimorfonuklearni granulociti

PrAP - prostatična alkalna fosfataza (eng. *prostatic alkaline phosphatase*)

PSA - prostatični specifični antigen

PSAP - prostatična specifična kisela fosfataza (prostate-specific acid phosphatase)

PSMA - Prostatični specifični membranski antigen

PZ – periferna zona prostate (eng. *peripheral zone*)

R

RP - radikalna prostatektomija

S

SA - sklerozirajuća adenoza

SMA - glatkomišićni aktin (eng. *smooth muscle actin*)

SVI – invazija sjemenih kesica (eng. *seminal vesicle invasion*)

T

TAF - faktor tumorske angiogeneze (eng. *tumor angiogenesis factor*)

TBS - *Tris buffered saline* rastvor

TGF- α i β - transformišući faktor rasta α i β - (eng. *transforming growth factor – α and β*)

TIMP - tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (eng. *tissue inhibitors of metalloproteinases*)

TMA – tkivna mikroerej studija (eng. *tissue microarray study*)

TNF- α - faktor tumorske nekroze – α (eng. *tumor necrosis factor- α*)

TNM - tumor, nodus, metastaza

TSP-1 - trombospondin – 1

TURP - transuretralna resekcija prostate

TV - tumor volumen

TZ – tranzicionalna zona prostate (eng. *transitional zone*)

U

u-PA - u-PA urokinaza plazminogen aktivator

V

VEGF - vaskularni endotelni faktori rasta (eng. *vascular endothelial growth factor*)

VEGFR - VEGF receptor

VM - Vaskularne malformacije (eng. *vascular malformations*)

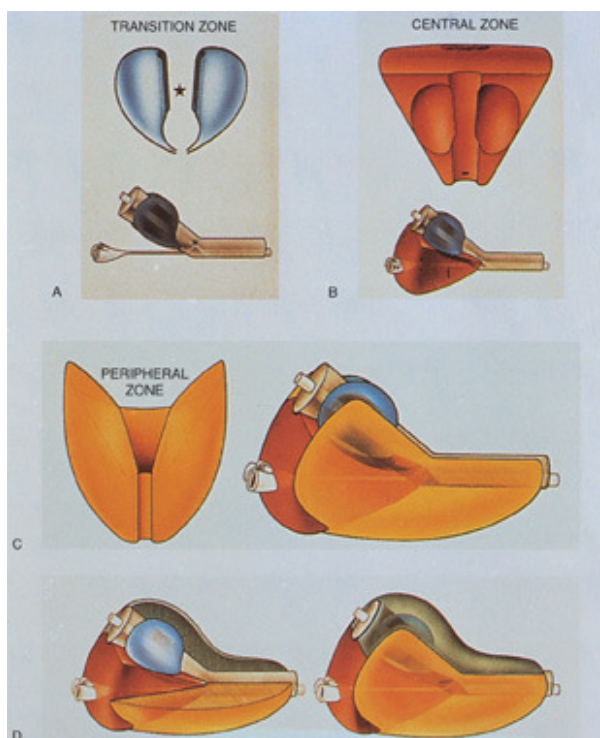
VPF - faktor vaskularnog permeabiliteta (eng. *vascular permeability factor*)

1. UVOD

1.1. ANATOMIJA I HISTOLOGIJA PROSTATE

Prostata u odraslih muškaraca teži prosječno 30–40 g (bez prominentne benigne prostatične hiperplazije (BPH), izgleda je konusa baze locirane proksimalno prema vratu mokraćne bešike i apeksa distalno na urogenitalnoj dijafragmi (1). Prostatični dio uretre prolazi kroz centar žlijezde. Prostata se anatomski dijeli na unutrašnje i spoljašnje regije, mada još uvijek postoji podjela na lijevi i desni lobus, koja se zasniva na palpaciji središnje brazde. U unutrašnjoj zoni najčešće se javlja BPH, a u perifernoj zoni karcinom, iako se neki karcinomi javljaju centralno, a BPH nodulusi se mogu naći i periferno (2).

Prostata se dijeli na četiri zone (slika 1):



Copyright © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

Slika 1. Zonalna anatomija prostate. (1) (Preuzeto iz: Epstein J., Netto G.: *Prostate biopsy interpretation*. 4th ed., Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 2008, p. 14)

- Prednja fibromuskularna stroma – obuhvata trećinu tkiva prostate; čine je glatkomišićna vlakna i gusto vezivno tkivo sa svega nekoliko žljezdanih formacija;
- Centralna zona – izgleda konusa koji okružuje ejakulatorne duktuse s apeksom na verumontanumu i bazom na vratu mokraćne bešike; neuobičajeno je područje porijekla karcinoma, češće je invadirana karcinomom iz periferne zone;
- Periferna zona – najveća zona koja sadrži 75% žljezdanog tkiva prostate; nalazi se distalno od centralne zone, oblika je potkovice koja se pruža posteriorno, posterolateralno i lateralno okružujući unutrašnje dijelove prostate; to je zona koju najčešće pogađa karcinom;
- Preprostatična regija – obuhvata periuretralne duktuse i veće najkritičnije područje, prelaznu zonu, koju najviše pogađa hiperplazija.

Uprkos ovim razlikama, stručnjaci iz oblasti uropatologije pojednostavljaju ovu zonalnu podjelu na dvije sekcije: unutrašnju (prelazna zona) i spoljašnju (periferna i centralna zona) (2, 3).

Prostata se sastoji od epitelnih i stromalnih ćelija. Epitelne ćelije tvore žlijezde koje se sastoje od duktusa razgranatih iz uretre (izdužene razgranate tubularne strukture) koji se završavaju acinusima (zaobljene strukture grupisane u lobuluse) (1).

Epitelne ćelije prostate su:

- a) Urotelne ćelije (epitel prelaznog tipa) – oblažu proksimalne dijelove prostatičnih duktusa, a u distalnim dijelovima duktusa mogu biti izmiješane sa sekretornim epitelom;
- b) cilindrične sekretorne epitelne ćelije – visoke ćelije svijetle do blijedoeozinofilne citoplazme koje oblažu distalne dijelove duktusa i acinuse; ove ćelije su pozitivne na prostatični specifični antigen (PSA) i prostatičnu specifičnu kiselu fosfatazu (prostate-specific acid phosphatase, PSAP), a negativne na citokeratin visoke molekularne težine (*high molecular weight cytokeratin*, HMWCK);
- c) bazalne ćelije – nalaze se ispod sekretornih cilindričnih ćelija uz bazalnu membranu. Smatra se da su one stem ćelije sekretornih ćelija od kojih su slabije diferentovane, pozitivne su na HMWCK i p63. One ne vode porijeklo od mioepitelnih ćelija, na šta ukazuje i njihov nedostatak imunohistohemijske

reakcije na glatkomišićni aktin (smooth muscle actin, SMA) i S-100. Ove ćelije nedostaju kod karcinoma prostate (4, 5, 6);

- d) neuroendokrine ćelije – prostata sadrži najviše endokrinih ćelija od bilo kog organa genitourinarnog sistema.

Stromalne ćelije su poprečnoprugasta i glatkomišićna vlakna, fibroblasti, nervi i endotelne ćelije (1).

1.2. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA PROSTATE

Karcinom prostate (KP) vodeći je uzrok morbiditeta i na trećem mjestu je u svijetu po mortalitetu (iza karcinoma pluća i karcinoma debelog crijeva) kod muškaraca, čineći oko 30% oboljelih od ukupnog broja novootkrivenih slučajeva karcinoma i 9–14% preminulih zbog karcinoma (7, 8). Globalna incidenca KP u izuzetnom je porastu, vjerovatno zahvaljujući programima rane detekcije koji obuhvataju digitalni rektalni pregled, određivanje serumskog PSA i transrektalnu ultrasonografiju. Također, incidenca je veća u državama u kojima je veći procenat starijih muškaraca u populaciji, kao i u razvijenim državama gdje KP čini 15% svih karcinoma u odnosu na zemlje u razvoju, u kojima iznosi 4% (9). Prema novijim istraživanjima, u razvijenim zemljama (USA) incidenca i mortalitet su u opadanju (7).

Prava epidemija KP dijelom je rezultat uspješnih napora u ranoj detekciji određivanjem serumskog PSA. Time je snižen još uvijek izrazit jaz između kliničke incidence (8% doživotnog rizika (eng. *lifetime risk*)) i prevalence dobijene na osnovu autopsijskih nalaza (80% do 80. godine života) (10).

Veliki klinički paradoks je da, uprkos velikoj incidenci KP, većina muškaraca će umrijeti sa tom bolešću, a ne od nje same (7, 10). Većina KP nikad ne progredira u klinički značajno oboljenje, manji dio ostaje lokalizovan i ograničen na samo tkivo prostate godinama, dok dio progredira rapidno do smrtnog ishoda. Velika dilema za kliničare i patologe je kako razlučiti o kojem se od ova tri biološki različita tipa radi (11). Smatra se da 20–40% pacijenata u momentu dijagnostikovanja imaju KP u uznapređovalom stadiju (7), odnosno oko 29% KP je lokalizovano u tkivu prostate, 33% je invazivno, dok su metastaze prisutne u 38% slučajeva (12).

1.2.1. Epidemiološke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na geografsku raspoređenost

Dijagnostikovani karcinom prostate je drugi po redu učestalosti kod muškaraca (899.000 novih slučajeva, 13,6% ukupnog broja) i peti po redu uopšte (13). Skoro tri četvrtine registrovanih slučajeva javljaju se u razvijenim zemljama (644.000 slučajeva). Procenti učestalosti širom svijeta variraju i do preko 25 puta više, od čega ih je najviše u Australiji / Novom Zelandu (104,2 na 100.000), te u Zapadnoj i Istočnoj Evropi i Sjevernoj Americi, većinom zbog činjenice da je testiranje serumskog PSA i uzimanja iglenih biopsija prostate u okviru istog postalo široko rašireno u tim regijama. Procenti učestalosti su relativno visoki u određenim regijama u razvoju, kao što su Karibi, Južna Amerika, te podsaharski dio Afrike. Najniža stopa učestalosti, što se tiče određene starosti, procijenjena je u Južnoj i Centralnoj Aziji (4,1 na 100.000). Sa procijenjenih 258.000 smrtnosti zbog karcinoma u 2008. godini, karcinom prostate je šesti po redu vodeći razlog smrti od karcinoma kod muškaraca (6,1% od ukupnog broja slučajeva). Zbog činjenice da PSA testiranje ima puno veći efekt na učestalost nego na smrtnost, širom svijeta su manje varijacije u smrtnosti (desetostruke), nego što je to slučaj kod procenta učestalosti (25 puta). Broj smrtnih slučajeva uzrokovanih karcinomom prostate je skoro jednak u razvijenim i nerazvijenim područjima. Smrtnost je generalno veća u područjima naseljenim crnim stanovništvom (Karibi, 26,3 na 100.00 i podsaharska Afrika, ASRs 18–19 na 100.000), jako niska u Aziji (ASR 2,5 na 100.000 u Istočnoj Aziji na primjer), te je srednja u Evropi i Okeaniji (13).

1.2.2. Epidemiologija KP u Srbiji i Vojvodini

U 2007. godini u Srbiji, izuzimajući Kosovo i Metohiju i Vojvodinu, od malignih oboljenja je oboljelo 25.662 osoba, a od tog broja 10,9% od karcinoma prostate (na trećem mjestu nakon karcinoma pluća i bronha i karcinoma debelog crijeva) (14). Broj umrlih od malignih oboljenja u Srbiji u 2007. godini bio je 14.373 osoba, a od toga 8,8% umrlih od karcinoma prostate (na trećem mjestu iza karcinoma pluća i bronha i karcinoma debelog crijeva) (14).

Kad je u pitanju incidenca, karcinom prostate se sa 6,5% slučajeva nalazi na trećem mjestu u Vojvodini, iza karcinoma pluća (27,9%) i kolorektalnog karcinoma (11,4%) (15). Prema novijim podacima iz 2009. godine, u Vojvodini je broj novooboljelih od karcinoma

prostate bio 520, stopa incidencije je iznosila 54,3/100.000, odnosno standardizovana stopa incidencije 29/100.000 (16).

1.2.3. Epidemiološke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na dob

Rizik od karcinoma prostate sa godinama raste veoma ubrzano. Incidenca obolijevanja je niska do 40-ih godina života (17), a zatim se naglo povećava (18). Širom svijeta, oko tri četvrtine svih slučajeva oboljelih od KP su muškarci životne starosti 65 godina i više (18,19). Oko 50 slučajeva KP prijavljeno je u svakoj od sljedećih grupa: kod djece mlađe od 12 godina, adolescenata, te kod mladih muškaraca između 20 i 25 godina starosti. U svim ovim slučajevima karcinom je bio loše diferentovan, klinički agresivan i otporan na hormonsku i zračnu terapiju (10).

1.3. ETIOLOGIJA I PATOGENEZA KARCINOMA PROSTATE

1.3.1. Etiologija karcinoma prostate

Faktori rizika mogu se klasifikovati kao endogeni i egzogeni, iako pojedini nisu striktno ni jedni ni drugi, npr. rasa, starenje, oksidativni stres (20). Kao rizični faktori navode se: porodična istorija, hormoni, rasa, starenje, oksidativni stres, ishrana, masnoće, kadmijum, cink, gojaznost, alkohol, pušenje, seksualna aktivnost, rana seksualna aktivnost, brojni seksualni partneri, profesionalna izloženost, poljoprivredni fertilizeri i pesticidi, guma, ionizirajuće zračenje, venerična oboljenja, herpes virus 2, citomegalovirus, vazektomija, benigna prostatična hiperplazija, prostatična intraepitelna hiperplazija, atipična proliferacija malih acinusa (ASAP) (10).

1.3.2. Porodična istorija

U epidemiološkim studijama porodična istorija karcinoma prostate je značajno povezana sa rizikom obolijevanja od karcinoma prostate. Rizik od obolijevanja od karcinoma prostate je dva puta veći ukoliko je najbliži srodnik obolio od karcinoma (otac ili brat) i pet do jedanaest puta veći ako dvojica ili trojica najbližih srodnika imaju karcinom prostate (10).

1.3.3. Hormoni

Androgeni značajno utiču na rast i razvoj tumorskih ćelija karcinoma prostate, te progresija iz pretkliničkog stadijuma do klinički ispoljenog karcinoma može biti dijelom rezultat izmijenjenog metabolizma androgena. Povećane koncentracije testosterona i njegovog

metabolita dihidrotestosterona tokom više decenija mogu povećati rizik, mada su rezultati ovih istraživanja oprečni (10).

1.3.4. Rasa

Rasne razlike kod povećanog rizika karcinoma prostate mogu odražavati tri faktora: razlike u izloženosti rizičnim faktorima, razlike u detektovanju karcinoma prostate i biološkim razlikama. Najveća stopa incidencije u svijetu je kod Afroamerikanaca, koji imaju viši rizik od dobijanja karcinoma prostate od Amerikanaca bijele puti. Međutim, rasne razlike mogu biti i uzrokovane različitim mogućnostima dobijanja zdravstvene njege, različitim odluka u smislu liječenja i praćenja bolesti, kao i različitosti u alelskim frekvencijama mikrosatelita na lokusima androgenih receptora ili polimorfnim varijacijama (10).

1.3.5. Starenje i oksidativni stres

Teoretski, karcinom prostate može nastati usljed povećanja oksidativnog stresa, ali su dokazi koji govore u prilog ovoj teoriji ograničeni (20). Kliničke studije ukazuju da uzimanje antioksidansa kao što su likopen, selen i vitamin E nude bolju zaštitu od nastanka karcinoma prostate. Dosadašnja saznanja povezanosti starenja i prooksidativne – antioksidativne homeostaze prostate čovjeka ostaju i dalje virtuelno nepostojeća (20).

Brojni su egzogeni rizični faktori za nastanak karcinoma prostate, uključujući ishranu, zanimanje, hemikalije koje utiču na endokrini sistem (EDC: *endocrine disrupting chemicals*) i drugi (20).

1.3.6. Ishrana

Brojni faktori ishrane dovode se u vezu sa nastankom i razvojem karcinoma prostate. Masnoće u ishrani, naročito polinezasićene masne kiseline, pokazuju snažnu povezanost sa incidencom i mortalitetom zbog KP po nekim epidemiološkim studijama (vjerovatno uzrokovanjem promjene hormona ili povećanjem oksidativnog stresa indukovano masnim kiselinama) (10).

Retinoidi, uključujući vitamin A, pomažu u regulaciji diferencijacije i proliferacije epitelnih ćelija, djelujući protektivno. Nedostatak vitamina D može biti rizični faktor nastanka KP (hormonalni oblik 1-25-dihidroksivitamin D sprečava invazivnost tumorskih ćelija i djeluje antiproliferativno, sprečavajući diferencijaciju tumorskih ćelija KP) (10). Vitamin E je

antioksidant koji inhibira rast tumorskih ćelija karcinoma prostate putem apoptoze (21). Povezanost selena i cinka, kao elemenata u tragovima, i karcinoma prostate je vjerovatna, ali još uvijek nedovoljno ispitana. Likopen, kao najefikasniji karotenoidni antioksidans, ima značajno protektivno dejstvo (10).

Kadmijum, kao značajan zagađivač okoline, u nekim studijama je povezan sa povećanim rizikom obolijevanja od KP (10).

1.3.7. Hemikalije koje utiču na endokrini sistem (EDC, eng. *endocrine disrupting chemicals*)

EDC se mogu definisati kao hemikalije koje pozitivno ili negativno mijenjaju hormonsku aktivnost utičući na reprodukciju i razvoj (10). Izloženost EDC putem ingestije hrane, vode ili putem vazduha može uticati ili posredovati u karcinogenezi. Neki muškarci mogu tokom mnogo godina hronično biti izloženi malim dozama EDC, koje mogu doprinijeti nastanku KP (ostaci određenih pesticida u hrani, fitoestrogeni u soji, i slično). Izloženost EDC može biti naročito značajna kod muškaraca koji imaju relativno visok endogeni estrogen ili koncentracije androgena (10).

1.3.8. Zanimanje i drugi faktori

Izloženost brojnim industrijskim i profesionalnim faktorima kao faktorima rizika KP izučavana je u brojnim studijama, ali su rezultati tih studija neuvjerljivi; najviše zabrinjavaju rezultati koji se odnose na poljoprivrednike i proizvodnju gume (10).

Brojni izučavani faktori pokazali su oprečne rezultate, negativnu povezanost ili vrlo ograničen uticaj na razvoj KP, kao što su pušenje, seksualna aktivnost, bračni status, vazektomija, socijalni faktori (stil življenja, socioekonomski status, obrazovanje), fizička aktivnost, antropometrija (10).

1.3.9. Patogeneza karcinoma prostate

Mehanizam kojim nastaje karcinom prostate je nejasan, ali može se klasifikovati kao genotoksični i negenotoksični (20).

1.3.10. Genotoksični mehanizam

Genetske mutacije mogu biti nasljedne, kao rezultat porodične ili rasne predispozicije, ili mogu biti inducirane različitim faktorima (20). Jedan mogući genotoksični okidač može biti kontinualna podjela ćelija prouzrokovana hormonima kao što je testosteron, rezultujući u akumulaciji spontanijh mutacija i posljedičnom aktivacijom određenih onkogenaa i inaktivacijom tumor supresor gena (20). Drugi mogući okidač mogu biti male količine karcinogena iz hrane, kao što je PhiP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-b) pyridine) u kuhanoj ribi i mesu, koji uzrokuje mutacije u tkivu prostate tokom života (PhiP je mutagen i karcinogen). Trenutno nema jakog dokaza da hemijski karcinogeni i EDC imaju ulogu u indukciji i evoluciji humanog karcinoma prostate, budući da su ova dva puta karcinogeneze karcinoma prostate dokazane na eksperimentalnim životinjama, ali još nisu dokazane i u humanom tumorskom tkivu karcinoma prostate (20).

1.3.11. Negenotoksični mehanizam

Po jednoj hipotezi, testosteron ima značajnu ulogu u evoluciji humanog karcinoma prostate u vidu stimulatora rasta ćelija prostate (20). Ovaj hormon može djelovati kao mitogen ili tumorski promoter. Testosteron indukuje podjelu ćelija, te tokom životnog vijeka velik broj ćelijskih podjela može rezultirati akumulacijom spontanijh mutacija u ćelijama prostate. Testosteron je u najmanju ruku neophodan faktor u karcinogenezi KP, ali prije bi mogao služiti kao kofaktor nego kao neposredni okidač (20).

Drugi okidač mogao bi biti oksidativni stres indukovao tinjajućom dugotrajnom hroničnom upalom i jedinstvenim biohemijskim miljeom prostate (pr. visoki nivoi cinka i citrata) koji na kraju rezultuju mitogeneozom (20).

1.3.12. Benigna prostatična hiperplazija

Prostatična hiperplazija često je udružena sa prostatičnim adenokarcinomom; zajednička im je povećana prevalenca i incidenca sa godinama, hormonalna ovisnost za rast i razvoj, ali do sada uzročna povezanost nije ozbiljno sugerisana niti ustanovljena (20).

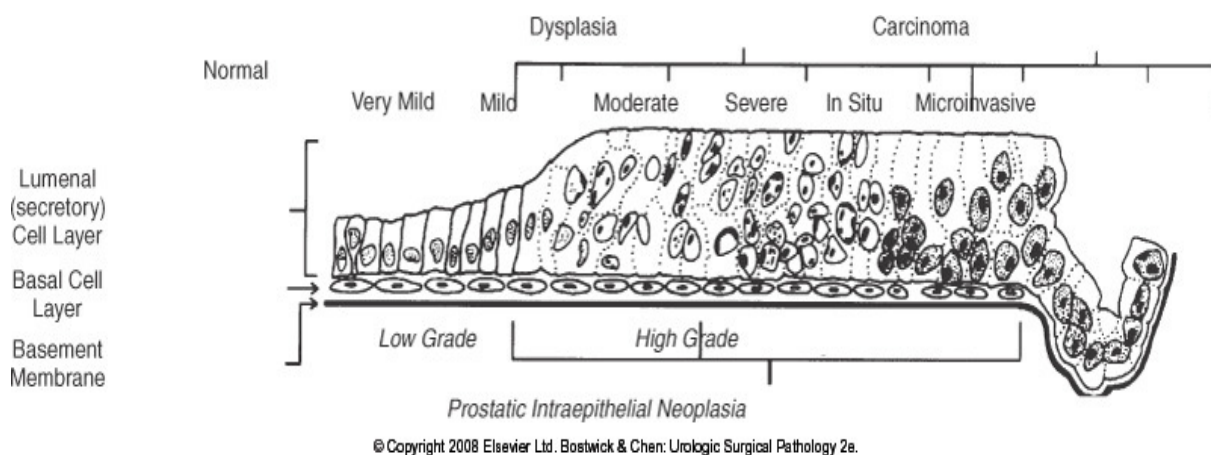
1.3.13. Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN)

Ovu leziju je prvi put opisao McNeal 1960. godine, a preciznije su je definisali McNeal i Bostwick sredinom osamdesetih godina prošlog vijeka, kao preinvazivni završetak kontinuiteta ćelijske proliferacije u duktusima, duktulusima i acinusima prostate (1, 22, 23).

PIN je podijeljen u dvije kategorije: PIN niskog stepena (eng. *low grade* PIN, LG PIN) koji je bez dijagnostičkog značaja, i PIN visokog stepena (eng. *high grade* PIN, HG PIN). HG PIN je najraniji stadijum u karcinogenezi, koji posjeduje mnoge fenotipske, biohemijske i genetske promjene kao i karcinom prostate, ali bez invazije u fibrovaskularnu stromu (24, 25) (slika 2). Iako bi se moglo pretpostaviti da je PIN univerzalna prekursora lezija prostatičnog adenokarcinoma, postoje činjenice koje dovode u pitanje povezanost HG PIN i karcinoma prostate (KP). Sakr je utvrdio da je početak KP prethodio početku HG PIN (26). To je suprotno od onoga što bi se očekivalo ako se smatra da je PIN prekursora lezija svih KP. Čak u 70% prostata u kojima je dijagnostikovano KP u ranom stadijumu nedostaje HG PIN. Pa čak i u onim prostatama gdje su postojali i rani KP i HG PIN, samo u jednoj trećini slučajeva se HG PIN nalazio neposredno uz KP (1). Još jedan dokaz protiv toga da je PIN univerzalni prekursor svih KP jeste da se HG PIN izuzetno rijetko nalazi uz karcinome prostate tranzicionalne zone (prelazne zone). Čini se da je HG PIN prekursora lezija mnogim perifernim umjereno do loše diferentovanim adenokarcinomima prostate. Dobro diferentovani karcinomi, naročito oni lokalizovani u tranzicionalnoj zoni prostate, nisu usko povezani sa HG PIN (1).

1.3.14. Atipična sitno acinusna proliferacija (Atypical small acinar proliferation, ASAP)

ASAP je visoko suspektna, ali nedovoljno dijagnostička lezija za KP, koja se manifestuje prisustvom sitnih atipičnih acinusa u iglenim biopsijama prostate koje pokazuju neke histološke osobine KP (1, 27). Najčešće su to sitni fokusi (ponekad svega nekoliko žljezdanih formacija), nepravilni acinusi sa arhitekturnim obilježjima maligniteta kojima nedostaju ubjedljive citološke karakteristike (nedostatak nukleolusa, nedostatak nuklearnog uvećanja), kao i acinarna atrofija ili izražena inflamacija u kojima obližnji acinusi pokazuju distorziju ili reaktivnu atipiju sa nuklearnim ili nukleolarnim uvećanjem, kao i arteficialno oštećenje tkiva, ali i gubitak sumnjivog fokusa na dubljim presjecima tkiva, što onemogućuje primjenu imunohistohemijske analize u cilju diferenciranja bazalnog sloja ćelija (10). KP je dijagnostikovano u većini rebiopsiranih uzoraka prostate (oko 90%), što navodi na to da je ASAP značajan pretkazivač invazivnog karcinoma prostate (1, 28, 29), te se nakon postavljanja dijagnoze ASAP preporučuje uraditi rebiopsiju prostate bez obzira na nivo serumskog PSA (1).



Slika 2. Morfološki kontinuum od normalnog prostatičnog epitela preko povećavanja gradusa PIN prema ranom invazivnom karcinomu prostate (u skladu sa konceptom kontinuuma oboljenja). LG PIN (gradus 1) odgovara veoma blagoj do blagoj displaziji. HG PIN (gradus 2 i 3) odgovara umjerenoj do izraženoj displaziji i carcinoma in situ. Prekancerozni oblici završavaju onog trenutka kad maligne ćelije invadiraju stromu; ova invazija se javlja na mjestu proboja bazalne membrane. Displastične promjene pojavljuju se u superficijalnom (luminalnom) sekretornom ćelijskom sloju, vjerovatno kao odgovor na luminalne karcinogene. Proboj sloja bazalnih ćelija prati arhitekturnalna i citološka obilježja HG PIN i čini se da to predstavlja jak preduslov za stromalnu invaziju. Bazalna membrana je očuvana kod HG PIN i ranog invazivnog karcinoma (10). (Preuzeto iz: Bostwick D.G., Meiers I. Neoplasms of the prostate. In: Bostwick D.G., Cheng L. (ed). *Urologic surgical pathology*, 2nd ed, Mosby Elsevier, 2008).

1.4. KLINIČKA DIJAGNOSTIKA KARCINOMA PROSTATE

1.4.1. Klinički znaci i simptomi

KP ne pokazuje specifičnu simptomatologiju i najčešće je klinički nijem, mada može prouzrokovati urinarne opstruktivne simptome, imitirajući nodularnu hiperplaziju (10). Kao posljedica toga, KP se često inicijalno manifestuje simptomima metastatskih depozita (vratni limfni čvorovi, kosti). Pacijent može imati simptome uremije. Krvarenje iz urinarnog trakta je rijetko. Zbog metastaza pacijent može imati bolove u kostima, anemiju i limfedem. U slučaju patološkog preloma kičme može nastati paraplegija.

Klinički, dijagnoza se najčešće postavi:

- Ako, tokom rutinskog pregleda muškaraca starijih od 40 godina, digitorektalni pregled pokaže nodularno ili difuzno uvećanu prostatu (klinički stadijum T2, T3 ili

T4); serumski nivo PSA veći od 2,5 ili 4 ng/mL (klinički stadijum T1c); ili transrektalni ultrazvuk i biopsije su pozitivni (nasumično uzete biopsije, ciljane biopsije ili rutinske sextant iglene biopsije);

- Incidentalni karcinom dijagnostikovao u uzorcima dobijenim transuretralnom resekcijom prostate (klinički stadijum T1a i T1b);
- Metastatski adeokarcinom nepoznate primarne lokalizacije;
- KP koji se prezentuje kao rektalna masa (KP veoma rijetko raste kao ekscentrična ili cirkumferentna rektalna ili perirektalna tumorska promjena sa ili bez zahvatanja sluznice rektuma) (10).

1.4.2. Skrining i dijagnostika karcinoma prostate

1.4.2.1. Skrining karcinoma prostate

Skrining je pregled asimptomatskih osoba sa povećanim rizikom za neku bolest. Uglavnom teče u okviru programa organizovanih istraživanja i finansiranih od strane državnih institucija. Nasuprot tome, rana detekcija se sprovodi na inicijativu pacijenta ili njegovog porodičnog ljekara. Cilj skrininga je smanjiti specifičnu smrtnost zbog karcinoma prostate i povećati kvalitet života. Za skrining karcinoma prostate koristi se digitorektalni pregled i test PSA.

Skriningom se otkrije veći procenat ranijih stadijuma karcinoma prostate. Karcinom prostate ima veoma različit biološki potencijal i puno pacijenata ne umire zbog karcinoma, već sa karcinomom prostate (7). Do sada još niti jedno istraživanje nije zasigurno pokazalo da se zbog skrininga smanjuje smrtnost zbog karcinoma prostate. Skrining postupci za karcinom prostate, koji uključuju određivanje koncentracije PSA u serumu i digitorektalni pregled, često se koriste u SAD i nekim evropskim državama, uprkos tome što korist od skrininga kod ovog tipa karcinoma još uvijek nije potvrđena odgovarajućim randomiziranim istraživanjima. Uprkos nepotvrđenom efektu skrininga, „American Cancer Society“ preporučuje određivanje PSA kod muškaraca starijih od 50 godina jedanput godišnje. Kod muškarca starijeg od 75 godina skrining uz pomoć određivanja PSA se ne preporučuje (30, 31).

1.4.2.2. Dijagnostičke pretrage za karcinom prostate

Najznačajnije metode za dijagnostiku karcinoma prostate su digitorektalni pregled, određivanje prostata specifičnog antigena (PSA) u serumu i transrektalni ultrazvučni pregled

prostate (TRUZ). Za konačnu dijagnozu su uvijek potrebni biopsija i histopatološki pregled tkiva prostate (31, 32, 33).

1.4.2.2.1. Digitorektalni pregled prostate

Digitorektalni pregled prostate je još uvijek najjednostavniji i najjeftiniji dijagnostički zahvat za otkrivanje karcinoma prostate (palpira se tvrđina u prostati, asimetrija ili je cijela prostata nešto tvrđa i neravna). Glavni nedostatak digitorektalnog pregleda je njegova relativno mala osjetljivost kod početnih stadijuma karcinoma. Pošto incidenca karcinoma prostate nakon 50. godine starosti naglo raste, transrektalni palpatorni pregled prostate morao bi biti obavezan dio opšteg kliničkog pregleda (33).

1.4.2.2.2. Prostata specifični antigen (PSA)

Godine 1979. izolovan je antigen iz tkiva prostate, nazvan prostatični specifični antigen (PSA), nađen u normalnom tkivu prostate, tkivu benigne hiperplazije i tkivu karcinoma prostate. PSA se rutinski koristi u ranoj detekciji KP. Otkrivene su značajno veće koncentracije PSA u serumu kod pacijenata sa uznapredovalim karcinomom prostate i zato se pretraga koristi u dijagnostičke svrhe kod karcinoma prostate (34).

PSA sintetišu isključivo ćelije acinusa prostate i dukalnog epitela koji u serum prelazi difuzijom iz žljezdanih ćelija kroz bazalnu membranu epitela u stromu prostate, gdje zatim ulazi u kapilare kroz bazalnu membranu (34).

PSA se u serumu nalazi u slobodnom i vezanom obliku (čini kompleks sa alpha-1-antichymotrypsinom) (10). Produkcija PSA je pod kontrolom cirkulišućih androgena koji djeluju preko androgenih receptora. Pacijenti sa karcinomom prostate imaju veću koncentraciju vezanog oblika PSA, odnosno manju koncentraciju slobodnog oblika PSA u serumu. Premda karcinom prostate najviše utiče na koncentraciju PSA u serumu, on nije jedini uzrok povećane koncentracije PSA. Na koncentraciju PSA u serumu značajno utiče prostatitis, PIN, akutna urinarna retencija i zatajenje bubrega. Detekcija povećane vrijednosti PSA je naročito osjetljiva i tačna u procjeni volumena prostate, rezidualnog karcinoma, rekurencije i progresije karcinoma prostate nakon terapije (10). PSA tačno predskazuje stadijum karcinoma i može detektovati rekurenciju nekoliko mjeseci prije bilo koje druge metode (10). Koncentraciju PSA u serumu smanjuju lijekovi, koji se koriste za hormonsko

liječenje karcinoma prostate i lijekovi za liječenje hipertrofije prostate (androgena deprivaciona terapija, blokatori 5 α -reduktaze) (10).

1.4.2.2.3. Transrektalni ultrazvučni pregled prostate

Ultrazvučni pregled prostate se izvodi transabdominalno, perinealno, transuretralno ili transrektalno. Pokazuje ultrazvučnu morfologiju prostate i omogućava otkrivanje karcinoma prostate, ocjenjivanje diseminacije i praćenje uspješnosti liječenja.

Karcinom prostate je moguće otkriti transrektalnim ultrazvučnim pregledom samo u perifernoj zoni i veoma nepouzdana u prelaznoj zoni, koja je i sama slabo ehogena. Karcinomi prostate su najčešće hipoehogeni, ali mogu biti izo- ili hiperehogeni. U 70% slučajeva karcinom prostate nastane u perifernoj zoni, a kod 60% slučajeva izgleda kao hipoehogeno područje, uglavnom nepravilnog oblika blizu kapsule prostate (35, 36).

1.4.2.2.4. Biopsija prostate

Za konačnu dijagnozu karcinoma prostate potrebna je histološka ili citološka potvrda. Biopsija prostate može biti aspiracijska transrektalna digitalno vođena, pri kojoj dobijamo materijal za citološku pretragu, ili pak transrektalna ultrazvučno vođena sa posebnim instrumentom i iglom za uzimanje materijala za histološku pretragu. Transrektalna ultrazvučno vođena biopsija prostate može biti ciljana ili sistematska. Kod sistematske biopsije prostate su biopsijska mesta ravnomjerno raspoređena. Koriste se različiti načini punktiranja prostate. Najčešće se izvodi šest do 12 sistematskih biopsija prostate (35, 36, 37).

Indikacije za transrektalnu ultrazvučno vođenu biopsiju prostate su:

- Sumnjiv digitorektalni pregled;
- PSA > 4 ng/l (neki autori koriste nižu graničnu vrijednost PSA (2,5 mg/l) kao indikaciju za biopsiju prostate);
- Sumnjiv nalaz transrektalnog ultrazvučnog pregleda prostate.

Uprkos tome što je transrektalna ultrazvučno vođena biopsija prostate značajno poboljšala dijagnostiku karcinoma prostate, ona ima i svojih nedostataka (38). Incidenca lažno negativnih biopsija je oko 11%, te se radi rebiopsija kad je negativan nalaz i trajno povećana koncentracija PSA, kao i u slučaju dijagnostikovanog HG PIN ili ASAP (37, 38).

1.4.2.3. Tkivne metode dijagnostikovanja karcinoma prostate

1.4.2.3.1. Iglena biopsija prostate

Revoluciju u ranoj detekciji KP izazvao je početak upotrebe transrektalne biopsije prostate 80-ih godina prošlog vijeka zajedno sa određivanjem serumskog PSA, koji je zamijenio dotad upotrebljavane transperinealne iglene biopsije i isključivo oslanjanje na nalaz digitorektalnog pregleda prostate (10).

Lažno negativni rezultati smanjili su se sa 11–25% na 11%, a poboljšan je i kvalitet uzetih biopičkih uzoraka (arteficijalno kompresivno oštećenje tkiva prostate svedeno je na minimum). Upotreba igala sa promjerom 18 dozvoljava uzimanje multiplih biopsija prostate uz minimalnu neprijatnost za pacijenta (10).

Broj iglenih biopsija prostate svakim danom raste i danas je veći nego ikad, stvarajući veliko opterećenje patologu u smislu interpretacije. Danas se uzima 10 ili više biopsija po pacijentu (pet ili više iz svake strane prostate), a prije samo 15-ak godina uzimala se samo jedna biopsija sa svake strane. Situacija se dalje usložnjava brojnim faktorima koji otežavaju interpretaciju biopsija. Mnogim pacijentima se radi iglena biopsija prostate zbog povišenog serumskog PSA bez ikakvih drugih kliničkih dokaza o postojanju KP, što stvara velik broj biopsija koje sadrže samo mali ili mikroskopski sumnjiv fokus (10). Dalje, brojne dijagnostičke greške (zamke) i imitatori KP nedavno su opisani (ASAP, PIN, postatrofična hiperplazija). Ogroman broj uzoraka iglene biopsije prostate koji stalno raste povećava mogućnost greške, odnosno pogrešne interpretacije sumljivih malih fokusa ili rijetkih i neobičnih lezija (10).

1.4.2.3.2. Aspiraciona citologija prostate tankom iglom (*Fine needle aspiration cytology, FNAC*)

Interes za korišćenje ove metode je minimalna zbog lakoće kojom se uzima i interpretira tkivo dobijeno iglenom biopsijom (igla promjera 18). Obje tehnike imaju sličnu senzitivnost u postavljanju dijagnoze KP i obje su ograničene malom veličinom uzorka, a najbolje ih je posmatrati kao komplementarne tehnike (10).

1.4.2.3.3. Transuretralna resekcija prostate (TURP)

Područja prostate koja budu zahvaćena TURP su različita u odnosu na dijelove prostate dobijene iglenom biopsijom prostate. Uzorci dobijeni TURP sadrže tkivo prelazne

zone, uretre, periuretralnog područja, vrata mokraćne bešike i fibromuskulare strome prednjeg dijela prostate, a ponekad i djeliće sjemenih kesica. Najčešće TURP-om nisu zahvaćene periferna i centralna zona prostate, kao i dio prelazne zone. Većina tkiva dobijenog iglenom biopsijom prostate sadrže samo tkivo periferne zone prostate, a rijetko i strukture centralne i prelazne zone (10). Dobro diferentovan adenokarcinom nađen slučajno na TURP-om uzetim isječcima najčešće potiče iz prelazne zone, a loše diferentovan KP najčešće predstavlja dio veće tumorske promjene koja potiče iz periferne zone i invadira prelaznu zonu (10).

1.4.2.3.4. Prostatična enukleacija (suprapubična prostatektomija, adenektomija)

Kod pacijenata sa masivnom prostatičnom hiperplazijom ona predstavlja metodu izbora u odnosu na TURP, a sadrži najčešće tkivo periuretralnog tkiva i prelazne zone prostate (10).

1.4.2.3.5. Radikalna prostatektomija

Dva su načina izvođenja radikalne prostatektomije – češći, retropubični, koji dozvoljava i limfadenektomiju tokom same operacije (određivanje postojanja metastaskih depozita na ex tempore uzorcima radi utvrđivanja stadijuma bolesti), te perinealni, kod kojeg nije moguće uzeti u istom aktu i limfne čvorove radi procjene stadijuma bolesti. Modaliteti u operativnom zahvatu su prostatektomije sa očuvanjem nervnih vlakana, robotičke prostatektomije, kao i laparoskopske prostatektomije (10).

Kompletnost uzimanja materijala nakon radikalne prostatektomije utiče na određivanje patohistološkog stadijuma (39, 40, 41), odnosno što je potpunije uzorkovanje materijala za patohistološku analizu, to je procjena zahvaćenosti hirurških margina veća (12% kod nekompletnog uzorkovanja u odnosu na 59% nakon kompletnog uzorkovanja), kao i procjena patološkog stadijuma bolesti (42). Ustanovljeno je da je nakon kompletnog uzorkovanog materijala procjena ekstraprostatične ekstenzije (34% kod nekompletnog u odnosu na 55% kod kompletnog), kao i zahvatanja sjemenih vrećica (8% kod nekompletnog u odnosu na 15% nakon kompletnog) veća (42). Iako se kompletno uzorkovanje materijala nakon radikalne prostatektomije smatra zlatnim standardom (43), u sadašnjim vodičima za evaluaciju takvog materijala odluka da li će se raditi kompletno ili parcijalno uzorkovanje materijala ostavljena je patologu (20, 44).

1.5. PATOHISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE KARCINOMA PROSTATE

1.5.1. Makroskopske karakteristike adenokarcinoma prostate

Makroskopska identifikacija KP najčešće je teška ili nemoguća, te definitivna dijagnoza zahtijeva mikroskopsku evaluaciju. U uzorcima dobijenim TURP-om, KP je rijetko makroskopski uočljiv, izuzev ako je ekstenzivan, zbog sličnosti sa nekim makroskopskim osobinama nodularne hiperplazije prostate. U prostatektomijama, KP je najčešće multifokalan, sa predilekcijom u periferoj zoni prostate (10). Makroskopski vidljiv tumorski fokus je najmanje 5 mm prečnika, žućkastobjeličast, čvrste konzistencije usljed stromalne dezmozplazije. Pojedini tumori su žućkaste boje, granulirani, jasno ograničeni u odnosu na normalan suđerast parenhim prostate. Muciozni adenokarcinomi mogu biti mekše konzistencije (10).

1.5.2. Mikroskopske karakteristike adenokarcinoma prostate

Dijagnoza KP predstavlja kombinaciju arhitekturnih i citoloških promjena i može biti potpomognuta nekim pomoćnim metodama poput imunohistohemije (10). Kod skrininga KP u bioptičkom iglenom uzorku ili uzorcima dobijenim TURP-om, veoma je korisno pravilo '*three toos*' (tri "suviše" – suviše malene žlijezde, suviše nagomilane žlijezde sa položajem '*back-to-back*', suviše svijetle žlijezde). Da bi se potvrdila dijagnoza KP, tri dijagnostička kriterijuma – uvećanje nukleusa, prominentni nukleolusi i nedostatak bazalnih ćelija – moraju biti prisutna (7).

Mikroskopski, većina KP sačinjena je od proliferisanih malih acinusa različito aranžiranih, od diskretne do jasno infiltrativne invazije u okolni parenhim, atipičnih žljezdanih formacija obloženih jednim slojem ćelija, sa gubitkom bazalnog sloja ćelija, nukleomegalijom i uvećanim eozinofilnim nukleolusima (7).

Arhitekturna obilježja se posmatraju na malom i srednjem uveličanju; predstavljaju varijacije u veličini, obliku i razmaku među acinusima. Acinusi su obično mali ili srednje veličine, iregularnih ili izduženih kontura, primitivnih lumena na periferiji, nasumično raspoređenih, dijelom gusto zbijenih ('*back-to-back*') (7).

Citološka obilježja KP podrazumijevaju nuklearno i nukleolarno uvećanje, crvenkastih ekscentrično postavljenih nukleolusa najmanje 1 μm prečnika, ponekad i multiplih (7).

Intraluminalni kristaloidi, plavi mucin, glomerulacije, kolageni mikronoduli i perineuralna invazija su dodatne promjene koje se najčešće javljaju kod KP. Intraluminalni kristaloidi i plavi mucin nisu patognomonični, ali su često udruženi sa KP. Međutim, kolageni mikronoduli (okruglast gust hijalini materijal unutar i neposredno uz neoplastične acinuse), glomerulacija (kribriformne formacije), cirkumferencijalna invazija nervnih vlakana, kao i žlijezde u masnom tkivu, smatraju se patognomoničnim za KP (7).

Kristaloidi su izduženi, romboidni ili igličasti svijetloružičasti, smješteni intraluminalno u malignim acinusima, u lumenima žlijezda koje se nalaze neposredno uz KP (najčešće u lumenima žlijezda koje pokazuju PIN, ASAP ili sklerozirajuću adenozu – SA) (7).

Intraluminalni plavi mucin (kiseli mucin) se javlja kod dobro i umjereno diferentovanih KP (alcian blue i mucicarmin +), ali i unutar lumena žlijezda u ASAP, PIN i SA (7).

1.5.3. Incidentalni karcinom

Incidentalni karcinomi prostate su slučajno otkriveni, klinički nijemi KP, dijagnostikovani postmortalno na autopsijskom materijalu i na radikalnim cistoprostatektomijama učinjenim zbog karcinoma mokraćne bešike (10). Oni su manje agresivni od klinički ispoljenih KP, uzimajući u obzir klinički stadijum, status hirurških margina i *Gleason* zbir (eng. *Gleason score*, GS). Incidentalni KP na cistoprostatektomijama najčešće su nižeg stadijuma pT2a ili pT2b (59% i 29% nižeg *Gleason* zbira 5 ili 6 (5% i 21%), a samo 9% incidentalnih KP ima GS8-10. Učestalost pozitivnih hirurških margina je niža nego u klinički ispoljenim KP (7% vs 52%) (10).

Povezanost klinički ispoljenog KP i incidentalnog KP mogla bi se objasniti dvjema hipotezama; po jednoj, incidentalni KP su histološki identični klinički ispoljenim KP, ali su predodređeni da nikad ne steknu biološki agresivna obilježja. Po drugoj hipotezi, klinički neupadljivi KP su tumori najmanjeg volumena. Smatra se da karcinomi stiču sposobnost metastaziranja tokom vremena, kao i povećanjem svog volumena, ali i "biološkom tumorskom progresijom", odnosno povećanom mutacionom nestabilnosti (45).

1.5.4. "Vanishing" karcinom prostate u radikalnim prostatektomijama

Radikalne prostatektomije ne sadrže rezidualni karcinom (pT0) u 0,5% slučajeva (1 na 200 prostatektomija) i ova incidenca će biti u porastu zbog povećanog broja pacijenata koji primaju preoperativnu deprivacionu androgenu terapiju (ili zračnu terapiju) koja uzrokuje vidljivu redukciju volumena KP, kao i zbog boljeg skrininga, gdje se KP otkriva u nižim stadijumima i dok je malog volumena (46, 47, 48). Različitosti u uzorkovanju materijala dobijenog radikalnom prostatektomijom, uključujući i parcijalno uzimanje isječaka, mogu povećavati rizik "nestajućeg" karcinoma prostate, te se u tim slučajevima preporučuje preuzeti sav operativni materijal. Nemogućnost identifikacije rezidualnog KP dovodi u pitanje tačnost dijagnoze postavljene na materijalu dobijenim iglenom biopsijom (dijagnoze su "precijenjene" u dva od četiri slučaja). Kod pacijenata kod kojih nije nađen rezidualni KP, nije se pojavio rekurentni KP ni nakon desetogodišnjeg preživljavanja, niti se kod pacijenata koji su ranije umrli zbog drugih uzroka nije našao KP u vrijeme smrti (47).

1.5.5. Diferencijalna dijagnoza adenokarcinoma prostate

Većinu KP nije teško dijagnostikovati, međutim postoje neke problematične i diskutabilne promjene. Kao prvo, nije lako razlučiti dobro diferentovani KP od značajnog broja benignih ili atipičnih proliferacija malih žlijezda. Drugo, teško je prepoznati izuzetno sitan fokus KP na iglenoj biopsiji. Treće, veoma loše diferentovani KP teško se mogu razlikovati od zapaljenskih infiltrata, metastatskih karcinoma i tranziciocelularnih karcinoma koji zahvataju prostatu (7).

Važne diferencijalne dijagnoze adenokarcinoma prostate uključuju proliferaciju prelazne zone prostate: sklerozirajuću adenozu (SA), hiperplaziju bazalnih ćelija (BCH), atipičnu proliferaciju malih acinusa (ASAP), HG PIN, svijetloćelijsku kribriformnu hiperplaziju (eng. *clear cell cribriform hyperplasia*, CCCH) (7). Gubitak mioepitelnih ćelija koje se nalaze uz bazalnu membranu žlijezda prostate nalazi se kod karcinoma prostate, dok su kod prethodno navedenih promjena prisutne bar pojedinačne rijetke bazalne ćelije koje se pozitivne na HMW CK (klon 34βe12), p63 i CK5/6. Ostali imitatori karcinoma su i mezonefrična hiperplazija, hiperplazija mukoznih žlijezda verumontanuma, nefrogena metaplazija, postatrofična hiperplazija, kao i normalne anatomske strukture poput atrofije, epitela sjemenih kesica, Cowperove žlijezde (1, 7, 49).

Atrofična varijanta KP u odnosu na atrofične žlijezde prostate može se dokazati upotrebom AMACR (alpha-methylacyl-CoA-racemase), HMWCK i p63. Tumorske žlijezde su pozitivne na AMACR, a negativne na p63 i HMWCK (7).

Ako se radi o loše diferentovanom KP teško ga je razlikovati od tranziciocelularnog karcinoma visokog gradusa, bilo primarnog (porijekla prostatičnih duktusa i acinusa), bilo sekundarnog (porijekla mokraćne bešike) (7). Upotreba PSA, kao markera prostatičnih ćelija, nekad nije od koristi zbog prethodne upotrebe hormonalne terapije, ali fokalna pozitivnost na prostatičnu alkalnu fosfatazu (*prostatic alkaline phosphatase*, PrAP) može se smatrati dovoljnom za postavljanje dijagnoze (7).

1.5.6. Imunohistohemijska analiza karcinoma prostate

U slučajevima kad je teško postaviti dijagnozu KP, imunohistohemija je od velike koristi.

Za utvrđivanje prisustva bazalnog sloja ćelija koristi se HMWCK (klon 34βe12), CK 5/6 ili p63. I HMWCK i p63 su visoko specifični za jedra bazalnih ćelija, međutim koktel ovih markera nudi veću senzitivnost, smanjujući varijabilnost u bojenju ćelija (7).

Noviji tumorski marker za citoplazmu tumorskih ćelija KP, alpha-methyl-acyl-CoA-racemase (AMACR), monoklonalni (P504S) i poliklonalni (AMACR-p), sve se više koristi zajedno sa markerima za bazalne ćelije prilikom rješavanja komplikovanih prostatičnih iglenih biopsija. Najkorisniji je kad se AMACR koristi uz pažljiv histološki pregled zajedno sa markerima za bazalne ćelije. Međutim, prilikom tumačenja reakcija ćelija na AMACR, mora se imati u vidu da nisu svi KP pozitivni (oko 20%), a da neke benigne promjene daju pozitivnu reakciju (ASAP, HGPIN), kao i neprostatični tumori (limfomi, melanomi, kolorektalni karcinom, karcinomi dojke, jajnika, pluća, mokraćne bešike i bubrega) (50).

Da bi se povećala senzitivnost i specifičnost prilikom postavljanja dijagnoze KP koristi se koktel p504s/p63. Kombinovanom upotrebom ova dva markera, jednim (p504s) kao pozitivnim markerom i drugim (p63) kao negativnim markerom, jednostavnim imunohistohemijskom procedurom, može se poboljšati senzitivnost i specifičnost u postavljanju dijagnoze, dovodeći do manjeg rizika od lažno negativnih rezultata (naročito u slučajevima ASAP) (51).

1.5.7. Histološka diferentovanost karcinoma prostate (histološki gradus)

Postoji oko 40 gradus sistema KP, od kojih najširu primenu ima *Gleason* gradus sistem, ustanovljen u periodu od 1960. godine do 1975. godine (obuhvatio je studiju više od 4000 pacijenata), superioran u odnosu na ostale jer predstavlja nezavisan jak prognostički faktor (19); smatra se "zlatnim standardom" za kliničare jer je u korelaciji sa ekstraprostatičnom ekstenzijom, invazijom sjemenih kesica i metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (7).

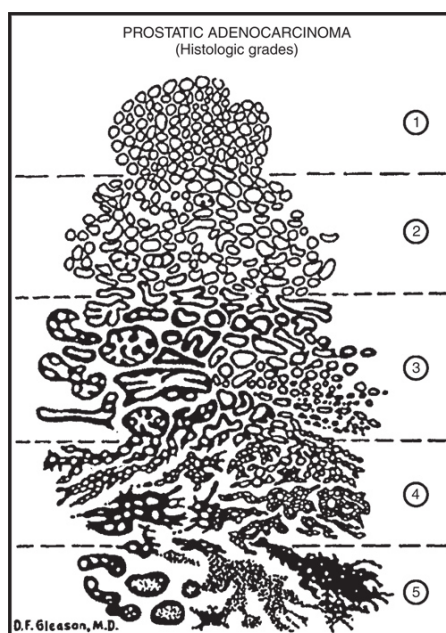
Gleason je stvorio ovaj sistem imajući u vidu da adenokarcinom prostate ima različite forme rasta, da svaka može varirati od dobro diferentovane do loše diferentovane, te da se najčešće u svim adenokarcinomima prostate nalazi više od jednog oblika. *Gleason* gradus sistem bazira se na stepenu arhitekturne glandularne diferencijacije (52, 53).

Osnovu ovog sistema predstavlja pet histoloških slika (gradusa) označenih brojevima od 1 do 5, koji na malom i srednjem mikroskopskom uvećanju obuhvataju analizu poremećaja žljezdane arhitekture, oblika, veličine i stepena glandularne diferencijacije i stromalne invazije, ali ne i stepena nuklearne anaplazije (slika 3, tabela 1) (52, 53).

Tabela 1. *Gleason* gradus sistem

<i>GLEASON</i> GRADUS 1	Jasno ograničen čvor gusto pakovanih, ali odvojenih, uniformnih, okruglih do ovalnih acinusa srednje veličine.
<i>GLEASON</i> GRADUS 2	Kao gradus 1, relativno jasno ograničeni tumorski čvorovi, ali sa mogućom minimalnom infiltracijom na periferiji. Žlijezde su rastresito aranžirane i ne tako uniformne kao kod gradusa 1.
<i>GLEASON</i> GRADUS 3	Diskretne glandularne formacije tipično manjih žlijezda nego u gradusu 1 i gradusu 2, koje se propagiraju unutar i između neneoplastičnih acinusa prostate. Izraženih su varijacija u veličini i obliku, ponekad izgleda malih kribriformnih tumorskih nodula zaobljenih ivica.
<i>GLEASON</i> GRADUS 4	Stopljene mikroacinarne žlijezde ili loše ograničene žlijezde sa slabo formiranim lumenima. Mogu biti i u obliku velikih kribriformnih žlijezda, odnosno kribriformnih žljezdanih formacija nepravilnih granica, kao i hipernefromatoidnog izgleda
<i>GLEASON</i> GRADUS 5	U suštini bez žljezdane diferencijacije, sačinjeni od solidnih plaža, traka ili pojedinačnih tumorskih ćelija. Mogu imati i sliku komedokarcinoma sa centralnom nekrozom okruženom papilarnim, kribriformnim ili solidnim tumorskim formacijama

Zbir dvije histološke slike tumorskog rasta označene kao prva dominantna, primarni oblik (>50% histološki analiziranog uzorka) i druga dominantna, sekundarni oblik (<50%, ali >5% uzorka), kreće se 2–10 i predstavlja *Gleason gradus score* (GGS), tj. zbirni *Gleason gradus* (52, 53). *Gleason* zbirni gradus (GS) je mjerenje zasnovano na skali koje kombinuje zasebno primarni i sekundarni oblik u zajednički oblik koji čini devet zasebnih grupa (GS 2–10) (tabela 2) (52, 53).



Slika 3. Shematski prikaz histoloških *Gleason* gradusa karcinoma prostate (53, 55). (Preuzeto iz Gleason D.F.: Histologic grading of prostate cancer: *A perspective*. *Hum Pathol* 23:273-279, 1992; text from Epstein J.I., Allsbrook W.C. Jr., Amin M.B., Egevad L.L; ISUP Grading Committee: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of prostatic carcinoma, *Am J Surg Pathol* 29:1228-1242, 2005.)

Tabela 2. *Gleason* skor (GS) karcinoma prostate (53). (Modifikovano iz: Gleason D.F. Histologic grading of prostate cancer: *A perspective*. *Hum Pathol*, 1992; 23:273-279)

<i>Gleason</i> skor	
2–4	Dobro diferentovani
5–6	Umjereno diferentovani
7	Umjereno loše diferentovani
8–10	Loše diferentovani

Adenokarcinom prostate je heterogeno histološki diferentovan. Više od 50% adenokarcinoma prostate sadrži više od dva, pa čak i više od tri različita histološka oblika, te je uveden i tercijarni gradus (52, 53, 54). Godine 2005. održana je konferencija Međunarodnog udruženja uroloških patologa (ISUP, *International Society of Urological Pathology*) gdje je predložena modifikacija *Gleason* zbira (GS) koji bi činio zbir najčešćeg i najvišeg *Gleason* gradusa adenokarcinoma prostate u kojem su prisutna tri različita gradusa (55).

1.5.8. Varijante adenokarcinoma prostate

KP mogu poticati iz bilo koje zone prostate, ali je relativna distribucija različita u svakoj od zona: 68% potiče iz periferne zone, 24% iz prelazne zone i 8% iz centralne zone (56). Različite su i forme rasta: acinarni, fuzionisani acinarni, kribriformni, papilarni, trabekularni i solidni (57).

- **Klasični (konvencionalni) tip adenokarcinoma prostate** čini više od 90% epitelnih malignih neoplazmi ovog organa. Većina ovih tumora pokazuje acinarni ili acinarni/duktalni tip rasta (18). Ostatak KP od 5–10% pripada varijantama KP koje je bitno prepoznati budući da se nekad postavlja pitanje porijekla tumora, odnosno da li je tumor metastaza ili rezultat direktnog širenja okolnog malignog procesa koji zahvata prostatu. Takođe, kliničko ponašanje morfoloških varijanti može se razlikovati od klasičnog KP, u smislu bolje ili lošije prognoze. Ovi tumori su obično udruženi sa klasičnim KP, rijetko se javljaju u čistom obliku. Sistem gradiranja po *Gleasonu* često se može primijeniti na ove tipove KP, i on je najčešće tri ili više (58);

- **Duktalni adenokarcinom prostate** (adenokarcinom sa endometrioidnim obilježjima) javlja se u vidu polipodne, papilarne, kribriformne ili cistične tumorske promjene koja potiče iz prostatične uretre i velikih periuretralnih prostatičnih duktusa. Ovi tumori se ocjenjuju kao *Gleason* skor 8 (4+4) i imaju lošiju prognozu u odnosu na tipični acinarni adenokarcinom (59);

- **Mucinozni (koloidni) karcinom prostate** čine iregularne kribriformne atipične žljezdane formacije koje plutaju u jezercima ekstracelularnog mucina (najmanje 25% tumora). Ocjenjuju se kao *Gleason* zbir 8 (4+4), a prognoza im je slična prognozi klasičnog acinarnog KP istog gradusa (60);

- **Karcinom prostate tipa prstena pečatnjaka** (eng. *signet-ring cell carcinoma*) tumor čine ćelije tipa prstena pečatnjaka prisutne u više od 25% (po nekim autorima 50%) tumorske mase. Ocjenjuju se kao *Gleason* gradus 5 i imaju lošu prognozu (61);

- **Adenokarcinom sa neuroendokrinom diferencijacijom.** Neuroendokrini diferencijacija je prisutna, makar fokalno, u svim adenokarcinomima prostate. Neuroendokrine ćelije nemaju vidljiv prognostički i klinički značaj u primarnom karcinomu prostate, niti korelaciju sa stadijumom i metastatski proširenom bolesti (62). Budući da neuroendokrine ćelije nemaju androgene receptore, otporne su na androgenu terapiju. Adenokarcinom sa ćelijama sličnim Panethovim nije udružen sa bilo kojim faktorom agresivnog ponašanja KP, te ne predstavlja sam po sebi lošiju prognozu (prognozu mu definiše *Gleason* zbir ostatka tumorske promjene). Neuroendokrini karcinom niskog gradusa je sličnih imunofenotipskih i morfoloških obilježja, te biološkog ponašanja, kao i svi neuroendokrini karcinomi niskog gradusa drugih organa (63). Sitnoćelijski karcinomi (neuroendokrini karcinom visokog gradusa) često su velikog volumena, praćeni paraneoplastičnim sindromom, agresivni i fatalni (64);

- **Sarkomatoidni karcinom (karcinosarkom)** predstavlja epitelni tumor koji pokazuje i mezenhimnu diferencijaciju. Rijetki su i loše su prognoze. Polovina pacijenata ima prethodno dijagnostikovano, zračen ili androgenom deprivacijom tretiran, acinarni adenokarcinom prostate (65);

- **Karcinom džinovskih ćelija** je veoma agresivan tumor, u momentu dijagnostikovanja već široko metastatski proširen. Čine ga pleomorfne džinovske ćelije uz klasični visokogradusni adenokarcinom prostate (10);

- **Adenoid – cistični/bazaloidni karcinom** prvenstveno zahvata prelaznu zonu prostate. Ovaj tumor ima značajan potencijal za kasniju rekurencu i metastaziranje. Često je udružen sa klasičnim KP. Otporan je na androgenu deprivacionu terapiju (10);

- **Karcinom sličan limfoepiteliomu, medularni karcinom** (eng. *lymphoepithelioma-like carcinoma*) je karcinom udružen sa gustim limfocitnim infiltratom. Ocjenjuje se *Gleason* gradusom 5 i ima lošu prognozu (10);

- **Karcinom sa onkocitnim obilježjima** je rijedak acinarni KP sa difuznim onkocitnim promjenama tumorskih ćelija, koji se klinički ponaša shodno gradusu klasičnog karcinoma prostate (10);

- **Adenokarcinom sa glomeruloidnim promjenama** predstavlja acinarni adenokarcinom sa glomeruloidnim strukturama, a ocjenjuje se *Gleason* gradusom 3 (10).

- **Adenokarcinom sa atrofičnim obilježjima** čine atrofični acinusi obloženi zaravnjenim tumorskim ćelijama. Ocjenjuje se varijabilnim *Gleason* gradusom, najčešće 3 (10);

- **Skvamozni i adenoskvamozni karcinom prostate** su izuzetno rijetki u prostati i ne daju povišen nivo sPSA. Agresivno se ponašaju, daju osteolitične koštane metastaze. Ovi tumori se ne ocjenjuju *Gleason* gradus sistemom (10);

- **Karcinom prelazne zone prostate (svijetloćelijski karcinom).** Svijetloćelijski KP (karcinom visokocilindričnih ćelija, karcinom prelazne zone prostate) predstavlja varijantu dobro diferentovanog KP koji može imitirati benignu hiperplaziju prostate (BPH), pa se stoga i zove "pseudohiperplastičnim oblikom" KP. Većinom potiče od žlijezda prelazne zone prostate; najčešće se viđa na materijalu dobijenim TURP-om, mada se može naći i na uzorcima iglene biopsije prostate. Čine ga atipične žlijezde, male, dijelom srednje veličine, ponekad sa papilarnim izdancima, velikim razgranatim žlijezdama, obložene jednim slojem visokocilindričnih ćelija, svijetle ili amfofilne citoplazme, lako uvećanih nukleusa, rijetkih do brojnih nukleolusa, intraluminalnih kristaloida i ružičastog amornog sekreta, sa rijetko prisutnim mitozama, plavičastim mucinom, perineuralnom invazijom, okolnim HG PIN. Mioepitelne bazalne ćelije nedostaju. (56, 66);

- Slična, najčešće dobro diferentovana, posebna histološka varijanta KP je **karcinom pjenušavih žlijezda (eng. foamy gland carcinoma)** koji čine male žlijezde obložene visokocilindričnim jednoslojnim epitelom, svijetle pjenušave citoplazme, bazalno postavljenih hiperhromatičnih jedara, intraluminalno prisutnog ružičastog sekreta. Ovaj KP je najčešće agresivnog biološkog ponašanja (66).

1.5.9. Određivanje stadijuma bolesti

Stadijum tumorske bolesti karcinoma prostate utvrđuje se na osnovu procjene tumora, limfnih čvorova (nodus) i metastaza – TNM sistema Američkog udruženog odbora za karcinome (AJCC – *American Joint Committee on Cancer 7th edition*) (tabela 3) (18).

Primarni tumor (T)

- TX: Procjena prisustva primarnog tumora nije moguća;
- T0: Nema primarnog tumora;
- T1: Klinički neopažen tumor, nije palpatoran i ne vidi se na dijagnostičkim snimcima:
 - T1a: Tumor koji je slučajno otkriven, zahvata $\leq 5\%$ reseciranog tkiva prostate;
 - T1b: Tumor koji je slučajno otkriven, zahvata više od 5% reseciranog tkiva prostate;
 - T1c: Tumor, uključujući i tumore nađene u oba lobusa, dijagnostikovan na iglenoj biopsiji prostate (npr. zbog povišenog PSA);
- T2: Tumor, ograničen na prostatu*
 - T2a: Tumor zahvata 50% jednog lobusa ili manje;
 - T2b: Tumor zahvata više od 50% jednog lobusa, ali ne oba;
 - T2c: Tumor zahvata oba lobusa;
- T3: Tumor se širi izvan kapsule prostate:
 - T3a: Ekstraprostatična ekstenzija ili mikroskopska invazija vrata mokraćne bešike[†];
 - T3b: Tumor zahvata sjemene kesice;
- T4: Tumor zahvata rektum, mm. levator i/ili karlični zid:

*(Tumor koji je nađen na iglenoj biopsiji prostate jednog ili oba lobusa, premda nije palpabilan i ne vidi se na dijagnostičkim snimcima, klasifikuje se kao T1c.)

[†] Pozitivne hirurške margine trebalo bi označiti kao R1 (rezidualna mikroskopska bolest).

Regionalni limfni čvorovi (N)

- NX: Procjena regionalnih limfnih čvorova nije moguća

- N0: Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
- N1: Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima

Regionalne limfne žlezde su pelvične žlijezde ispod bifurkacije aa. iliacae communis. Obuhvataju sljedeće grupe: pelvične (NOS), hipogastrične, obturatorne, iliacae (odn. internaе, externaе ili NOS) i sakralne. Metastaze u udaljenim limfnim žlezdama (izvan karlice) klasifikuju se kao M1a.

Udaljene metastaze (M)

- MX: Procjena prisustva udaljenih metastaza nije moguća;
- M0: Nema udaljenih metastaza;
- M1: Udaljene metastaze;
- M1a: U neregionalnim limfnim čvorovima;
- M1b: U kostima;
- M1c: Na drugim mjestima sa/bez zahvaćenih kostiju.

Napomena: Ova klasifikacija se ne odnosi na sarkome i urotelne karcinome.

Tabela 3. AJCC definicija pTNM klasifikacije karcinoma prostate

1.6. PROGNOŠTIČKI PARAMETRI KARCINOMA PROSTATE

Kolegij američkih patologa (eng. *College of American Pathologists*) donio je 1999. godine konsenzus po kojem je prognostičke i prediktivne faktore karcinoma prostate podijelio u tri kategorije (67).

Kategorija I – potvrđeni faktori koji se mogu koristiti u kliničkoj praksi, a to su TNM stadijum, *Gleason* gradus, hirurške margine i predoperativni PSA.

- TNM stadijum je stadijum bolesti određen na osnovu TNM klasifikacije i predstavlja najvažniji prognostički parametar i direktno je povezan sa dužinom preživljavanja pacijenta;
- Ekstaprostatična ekstenzija (EPE, kapsularna penetracija, kapsularna invazija, kapsularna perforacija) podrazumijeva karcinom u masnom tkivu, u perineuralnim prostorima, u poprečnoprugastom prednjem mišiću (pT3). Snažna je povezanost

između volumena tumora i EPE i invazije u sjemene kesice, kao i pozitivnih hirurških margina. Pacijenti sa EPE imaju lošiju prognozu (68);

- Metastaze u limfnim čvorovima – nekada je incidenca pacijenata sa nodalnim metastazama u vrijeme dijagnostikovanja KP iznosila 40%, a danas je manja od 10%. Rizik od nodalnih metastaza uslovljen je stadijumom KP, nivoom serumskog PSA, *Gleason* gradusom i agresivnim pristupom u disekciji limfnih čvorova (69);
- Udaljene metastaze – najčešće se metastaze javljaju u kostima (90%), plućima (46%), jetri (25%), pleuri (21%), nadbubregu (13%). Prema istraživanjima, metastaze u kostima prethode metastazama u plućima i jetri u većini slučajeva (70);
- *Gleason* gradus – gradus je jedan od najjačih i najkorisnijih prognostičkih parametara biološkog ponašanja KP, uključujući invazivnost i metastatski potencijal KP. Koristi se zajedno sa nekim drugim prognostičkim parametrima poput dobi pacijenta, kliničkog stadijuma i serumskog nivoa PSA pri odlučivanju kakva će se terapija primijeniti (71);
- Hirurške margine – pozitivne hirurške margine definišu se prisustvom tumorskih ćelija na markiranim/obojenim rubovima resekcije. Predstavljaju snažan prognostički parametar preživljavanja pacijenta nakon radikalne prostatektomije (72), i jedini pretkazivač progresije KP, uz *Gleason* gradus i DNA ploidiiju, kod pacijenata bez invazije tumora u sjemene kesice i metastaza u limfnim čvorovima (73);
- Serumski PSA – određivanje povišenih vrijednosti sPSA je naročito osjetljivo i tačno kod utvrđivanja veličine prostate, rezidualnog karcinoma, rekurentnog karcinoma, progresije karcinoma nakon primijenjene terapije. Serumski PSA tačno predviđa status karcinoma, odnosno, može detektovati rekurentni karcinom nekoliko mjeseci prije bilo koje druge metode (74).

Kategorija II obuhvata faktore koji su detaljno proučeni, ali još čekaju potvrdu u kliničkoj praksi; čine ih volumen tumora, histološki tip i analize DNA ploidiije.

- Tumor volumen (TV) – volumen KP na iglenoj biopsiji predstavlja procenat tkiva zahvaćen karcinomom, dok konsenzus načina određivanja TV na radikalnoj prostatektomiji još nije nađen (75). KP malog volumena najčešće su multifokalni i bilateralni, predominantno potiču iz periferne zone prostate (76). Tumor volumen

je najčešće, ali ne i uvijek, pretkazivač rekurencije KP nakon radikalne prostatektomije (77, 78);

- Lokalizacija KP – mjesto porijekla KP značajan je prognostički parametar. Karcinomi prelazne zone ili prednje strane prostate imaju manji *Gleason* gradus i manje invadiraju ekstraprostatično tkivo (anteriorna fibromuskularna stroma), ali imaju veći volumen u odnosu na acinarne karcinome periferne zone prostate (79, 80). Kad im je volumen veći od 4 mL, invadiraju anterolateralnu perifernu zonu. KP periferne zone šire se duž kapsule prostate transverzalno invadirajući ekstraprostatično tkivo, a ako im je volumen veći od 4 mL, šire se bilateralno, invadiraju prelaznu zonu, progresivno im se povećava nodularnost, ali dominantno rastu duž nervnih vlakana prema bazi prostate (81);
- DNA ploidijska analiza – analize DNA ploidijske KP obezbjeđuju značajne prognostičke podatke kao dodatak histopatološkim analizama. Pacijenti sa diploidnim tumorima (sa petogodišnjim preživljavanjem u 95% oboljelih) imaju bolju prognozu nego oni sa aneuploidnim tumorima (petogodišnjim preživljavanjem u 25% oboljelih) (82). Dobra korelacija postoji između DNA ploidijske i histološkog gradusa, kao i tumor volumena i stadijuma. Većina tumora u nižem stadijumu bolesti su diploidni, dok su tumori u višim stadijumima aneuploidni, ali postoje brojni izuzeci (83, 84);
- Kategorija III – faktori za koje su potrebna dodatna istraživanja da bi mogli ući u klinička ispitivanja, a u koje ulaze prostatični specifični membranski antigen, perineuralna invazija, limfatična/vaskularna invazija, gustina krvnih sudova (eng. *microvessel density*, MVD), androgeni receptori, neuroendokrini markeri, biološki molekularni markeri, kao što su Ki67, nuklearna morfometrija, tumor supresor geni, onkogeni, adhezivne molekule, regulatori apoptoze, dok se pojedini markeri istražuju kao potencijalne mete terapije karcinoma prostate, među kojima su i VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*) i MMP9 (eng. *Matrix metalloproteinase – 9*) (1, 85, 86);
- Perineuralna invazija – samo polovina pacijenata sa intraprostatičnom perineuralnom invazijom na bioptičkim uzorcima ima ekstraprostatičnu invaziju, tako da perineuralna invazija nema prognostičku vrijednost kao što je imaju *Gleason* gradus, serumska PSA i tumor volumen na bioptičkom uzorku (87);

- Vaskularna/limfatična invazija – mikrovaskularna invazija je snažan indikator maligniteta koji korelira sa histološkim gradusom. Često je udružena sa ekstraprostatičnom ekstenzijom i metastazama u limfnim čvorovima. Značajan je prediktor preživljavanja (četiri puta veći rizik tumorske progresije i smrtnog ishoda) (88), kao i nezavisan prognostički parametar rekurencije sPSA i smrtnog ishoda uzrokovanog KP (89);
- Gustina krvnih sudova (MVD, eng. *microvessel density*) – prosječan broj krvnih sudova u tkivu povećan je kod PIN i karcinoma prostate u odnosu na normalno tkivo prostate. U mnogim studijama nađena je pozitivna korelacija između MVD i *Gleason* gradusa i patološkog stadijuma bolesti (90–93). Smatra se da MVD predviđa rekurenciju karcinoma prostate (93);
- Morfometrijski markeri – obezbjeđuju korisne prognostičke informacije za KP, ali se još ne koriste rutinski i smatraju se istraživačkim modalitetima: nuklearna veličina, nuklearni oblik, tekstura hromatina, veličina i broj nukleolusa, broj apoptotičnih tjelašaca (67);
- Molekularni markeri karcinoma prostate – karcinogeneza KP uključuje multiple genetske promjene, kao što je gubitak specifičnih genomskih sekvenci koje mogu biti udružene sa inaktivacijom tumor-supresor gena (p53, p27, p21, PTEN) i dobitak nekih specifičnih hromozomalnih regiona koji mogu biti povezani sa aktivacijom onkogeni (bcl-2, myc-onkogeni) (1). Najčešće hromozomalne aberacije u PIN i karcinomima su fuzija TMPRSS2-ETS gena i dobitak hromozoma 7 (7q31 – naročito značajan u razvoju karcinoma prostate), gubitak 8p (više od jednog tumor-supresor gena je smješteno na ovom hromozomu; inaktivacija ovih gena može biti važna u inicijaciji KP) i dobitak 8q (izražen kod metastatski proširene bolesti i androgen-nezavisnim KP) i gubitak 10q, 16q i 18q (10, 94). C-myc učestvuje u regulaciji rasta i karcinogenezi KP. Antigen karcinoma prostate 3 (eng. *prostate cancer antigen 3*, PCA3) najspecifičniji je gen KP (10, 95);
- Kombinacijom prognostičkih faktora obezbjeđuje se najtačnije određivanje stadijuma i ishoda KP.

1.7. PROCES METASTAZIRANJA TUMORA

Maligna oboljenja drugi su najčešći uzrok smrti u razvijenim zemljama (zapadna hemisfera) (13). Iako su modaliteti liječenja malignih bolesti daleko uznapredovali, prognoza ovih oboljenja u uznapredovalim stadijumima je i dalje loša (96).

Većina pacijenata oboljelih od malignih tumora ne umire zbog lokalnih komplikacija koje su posljedica rasta primarnog tumora, već smrt nastupa kao posljedica razvoja metastaza, koje su uzrok 90% smrtnih ishoda (97). Metastaziranje je osobina malignih tumora i ogleda se u kolonizaciji udaljenih organa sa tumorskim ćelijama iz primarnog tumora. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da je angiogeneza kritični momenat za razvoj metastaza i da tumori sa gušćom vaskularom mrežom imaju veći metastatski potencijal u odnosu na tumore čija je vaskularna mreža slabije razvijena (98). Razvoj metastaza predstavlja glavnu prepreku uspješnog tretmana malignih tumora (99). Metastaziranje predstavlja složen kompleks povezanih kaskadnih procesa koje tumorske ćelije moraju savladati (96). Svaki pojedinačni korak je od presudnog značaja, i greška ili nedostatak u bilo kojoj fazi dovešće do prekida procesa (96).

1. Prekid intercelularnih spojeva (adhezija) i separacija pojedinačnih tumorskih ćelija od primarnog tumora – Prvi korak u razvoju metastaza je odvajanje pojedinačnih tumorskih ćelija od primarnog tumora za koje im je potrebna disolucija intercelularnih adhezija. Intercelularne adhezije su neophodne za integritet epitelnih tkiva, ćelijski polaritet i ćelijsku diferencijaciju. Intercelularne adhezije su prevashodno sačinjene od E-cadherin/catenin kompleksa (96). Ćelijske adhezivne molekule (CAMs) su proteini lokalizovani na površini ćelija, koji se mogu svrstati u tri velike grupe: imunoglobulini, integrini i selektini. Poremećaji E-cadherin/catenin kompleksa udruženi su sa povećanom invazivnošću i progresijom tumora (100). Gubitak ekspresije E-cadherina udružen je sa lošijim stepenom histološke diferencijacije tumora i povećanjem rizika nastanka metastaza (100). Gubitak ekspresije ICAM-1 i ICAM-2 (pripadaju grupi imunoglobulina) korelira sa lošijom prognozom kod pacijenata sa različitim malignim tumorima (101);

2. Izbjegavanje anoikis-a – Termin *anoikis* označava osobinu određenih ćelija, kao što su epitelne i endotelne ćelije, da podliježu procesu apoptoze kad budu dislocirane iz ekstracelularnog matriksa zbog gubitka integrinom uslovljenog ćelijsko-matriks kontakta.

Signalni put pomenutog procesa je kontrolisan aktivnošću protein kinaza signalnog puta. Uprkos kontakta ćelija-matriks posredovanog integrinima kinaze odgovorne za adheziju fokalno bivaju aktivirane autofosforilacijom što rezultira pokretanjem negativnog signalnog kaskadnog puta kinaza koji za posledicu ima supresiju anoikisa. Suprotno, disocijacija ćelija iz ekstracelularnog matriksa je pokretač aktivnosti kaspaza koje cijepaju i aktiviraju kinaze pozitivnog signalnog kaskadnog puta kinaza što rezultira anoikisom (102). U tumorskim ćelijama alteracije ćelijsko-ćelijskih adhezivnih molekula, integrina, signalne molekule zavisnih od integrina kao i regulatora apoptoze rezultira izostankom anoikisa, što dovodi do opstanka tumorskih ćelija u ekstracelularnom matriksu, povećanja rizika njihovog rasapa i širenja bolesti (96);

3. Proteoliza ekstracelularnog matriksa – Ekstracelularni matriks predstavlja gusto isprepletenu mrežu sagrađenu iz kolagena i elastina, koja je umetnuta u viskoznu osnovnu supstancu sačinjenu iz proteoglikana i glikoproteina. U fiziološkim uslovima matriks se ponaša kao selektivni makromolekularni filter koji ima ulogu u mitogenezi i diferencijaciji. Nakon odvajanja pojedinačne ćelije od primarnog tumora usljed gubitka intercelularnih spojeva neophodno je obezbijediti razgradnju ekstracelularnog matriksa kako bi se omogućila migracija i invazivni tip rasta tumorskim ćelijama. Proteolitička aktivnost je regulisana uspostavljanjem ravnoteže aktivatora i inhibitora proteolitičkih enzima. Urokinaza – tip aktivator plazminogena sastoji se iz serinproteaza plazmina čiji aktivator je u-PA (u-PA urokinaza plazminogen aktivator), a inhibitori su α -anti-plazmin, inhibitor aktivatora plazminogena-1 (eng. *Plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) i inhibitor aktivatora plazminogena-2 (eng. *Plasminogen activator inhibitor-2*, PAI-2). Aktivatori plazmina inaktivni plazminogen pretvaraju u aktivni plazmin. Plazmin uzrokuje razgradnju različitih proteina matriksa kao što su npr. fibrin, fibronektin i vitronektin. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da povećanje količine urokinaza plazminogen aktivatora (u-PA) i njegovih receptora korelira sa progresijom bolesti i skraćenjem dužine preživljavanja kod pacijenata oboljelih od karcinoma dojke, ovarija, želuca, pluća, debelog crijeva, bubrega, kao i u slučaju tumora porijekla mekih tkiva (103, 104).

Matriks metaloproteinaze (MMP) su važna grupa enzima odgovornih za razgradnju pojedinih proteina ekstracelularnog matriksa kao što su kolagen, proteoglikan, elastin, laminin i fibronektin, a grupu čini 17 identifikovanih proteolitičkih enzima (96). Embrionalni razvoj,

remodeliranje tkiva, zarastanje rana, zapaljenje, neizvodljivi su procesi bez učešća porodice matriks metaloproteinaza. Sintetišu se u obliku proenzima, a iz ćelija se izlučuju u inaktivnoj formi proenzima. U fiziološkim uslovima aktivnost matriks metaloproteinaza je kontrolisana posebnim endogenim inhibitorima kao što su α -2 makroglobulin i tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza (eng. *tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP). Maligna oboljenja su praćena povećanom ekspresijom matriks metaloproteinaza i smanjenom koncentracijom tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP), što takođe za rezultat ima povećanje proteolitičke aktivnosti. Prisustvo matriks metaloproteinaza je otkriveno na površini ćelija invazivnih tumora (105). Povećana ekspresija matriks metaloproteinaza je dokazana u karcinomima pluća i želuca i smatra se da je povezana sa invazivnim i metastatskim potencijalom tumorskog rasta (106). Razgradnja bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa predstavlja ključni korak u procesu intra i ekstravazacije tumorskih ćelija (96).

4. Kretanje tumorskih ćelija kroz ekstracelularni matriks – Poslije proteolize ekstracelularnog matriksa i bazalne membrane, aktivno kretanje tumorskih ćelija je sljedeći ključni korak u procesu metastaziranja, koji omogućuje tumorskim ćelijama prodor u cirkulaciju. Autokrini i parakrini faktori stimulišu kretanje bilo indirektno preko hemokinetičkih ili direktnih hemotaktičkih mehanizama kretanja, pri čemu se tumorske ćelije kreću u pravcu pozitivnog gradijenta koncentracije. Produkt tumorskih ćelija, autokrini faktor motiliteta AMF (eng. *autocrine motility factor*), pokazuje povećanu ekspresiju u tumorskim ćelijama, a kretanje ćelija stimuliše vezivanjem na receptore lokalizovane na površini ćelija (107). Parakrine faktore motiliteta mogu lučiti normalne ćelije što može izazvati stimulaciju invazivnog rasta tumora i sklonost ka metastaziranju. Parakrine faktore pokretljivosti najčešće luče fibroblasti tumorske strome, a najznačajniji su hepatocitni faktor rasta, HGF (eng. *hepatocyte growth factor*), koji stimuliše parakrinu migraciju epitelnih ćelija i ćelija pojedinih karcinoma. U grupu parakrinih stimulatora pokretljivosti tumorskih ćelija ubrajaju se i fibroblastni faktor rasta FGF (eng. *fibroblast growth factor*), insulinu sličan faktor rasta I i II IGF (eng. *insulin like growth factor I and II*), interleukin-6 (IL-6) i trombocitni faktor rasta PDGF (eng. *platelet-derived growth factor*) (108).

Jednako važan mehanizam koji omogućuje kretanje tumorskih ćelija je interakcija ćelija sa komponentama ekstracelularnog matriksa, kao što su kolagen tipa I i IV, laminin,

fibronektin i vitronektin. Djelimično, interakcija ćelija sa sastojcima ekstracelularnog matriksa odvija se posredstvom integrina. Integrini predstavljaju porodicu receptora lokalizovanih na površini većine ćelija. Migracija tumorskih ćelija dijelom je uslovljena interakcijom matriksa i tumorskih ćelija, a posredovana je i proteoglikanima kao što je vitronektin. Povećana ekspresija integrina i proteoglikana u pojedinim vrstama tumora dovedena je u vezu sa lošijom prognozom (109).

Odvajanje tumorske ćelije od solidnog primarnog tumora labavljenjem intercelularnih spojeva, proteoliza proteina intercelularnog matriksa i bazalne membrane i kretanje omogućavaju tumorskoj ćeliji ulazak u limfatične i krvne sudove. Intravazacija tumorskih ćelija u cirkulaciju potpomognuta je sekrecijom angiogenih faktora koji indukuju strukturalno popuštanje bazalne membrane krvnih sudova (96);

5. Preživljavanje u cirkulaciji – Od trenutka ulaska tumorske ćelije u cirkulaciju, ona biva izložena opasnosti da bude otkrivena od strane imunokompetentnih ćelija koje su odgovorne za eliminaciju cirkulišućih tumorskih ćelija. Dokazano je da sve tumorske ćelije koje dospiju u cirkulaciju ne dovode do nastanka udaljenih metastaza. Razvoj udaljenih metastaza uslovljen je postojanjem mehanizama da tumorske ćelije izbjegnu imuni odgovor domaćina i na taj način onemoguće uništenje od strane imunokompetentnih ćelija (96). Jedan od načina da izbjegnu imuni odgovor i postignu preživljavanje u cirkulaciji jeste povećanje količine karbohidrata na ćelijskim membranama, koji maskiraju antigene na površini tumorskih ćelija sprečavajući na taj način njihovo prepoznavanje od strane citotoksičnih T limfocita. Kompleksi histokompatibilnosti, MHC (eng. *major histocompatibility complex*) klase I, jesu antigeni odgovorni za prepoznavanje tumorskih ćelija posredstvom citotoksičnih T limfocita. Smanjena ili odsutna ekspresija kompleksa histokompatibilnosti (MHC) udružena je sa diseminacijom tumorskih ćelija u limfne čvorove (96). Sekrecija glikoproteina akutne faze (eng. *acute-phase glycoproteins*) u jetri, kao rezultat inflamatornog odgovora domaćina na prisustvo tumorskih ćelija, može se ponašati kao blokirajući faktor koji štiti tumorske ćelije od imunog odgovora domaćina, omogućavajući na taj način preživljavanje tumorskih ćelija u cirkulaciji. Povećana koncentracija pojedinih vrsta glikoproteina akutne faze otkrivena je kod pacijenata oboljelih od karcinoma kod kojih je bolest pokazala agresivniji tok (96, 111).

6. Adhezija na endotelne ćelije – Ako tumorske ćelije krvnom strujom dospiju u kapilare ciljnog organa, ostvaruje se labava veza između tumorske ćelije i površine endotelnih

ćelija što dovodi do usporavanja kretanja tumorskih ćelija u krvnoj struji i njihovog kotrljanja po površini endotela, što je poznato pod pojmom "rolling". Prvi kontakt tumorske ćelije sa endotelom je posredovan selektinima, a sam proces je veoma sličan procesu ekstravazacije leukocita. Selektini su transmembranski proteini lokalizovani na endotelnim ćelijama – E selektin, leukocitima – L selektini i P selektin, koji se nalaze na trombocitima (112). Važna uloga selektina za adheziju tumorskih ćelija na endotelne ćelije potkrijepljena je nalazom da je blokadom E selektina u jetri visokospecifičnim antitijelom postignuto značajno smanjenje broja jetrenih metastaza u eksperimentalnih životinja (113).

7. Ekstravazacija iz limfnih i krvnih sudova – Integritet endotelnih ćelija određen je organizacijom interendotelijalnih spojeva i veza. Pomenute veze su ostvarene interreakcijom transmembranskih proteina kao što su kaderin (eng. *cadherin*) i katenin (eng. *cathenin*). Spoj kompleksa kaderin/katenin (*cadherin/cathenin*) posredovan je proteinskom molekulom kao što je vinkulin (eng. *vinculin*). U toku procesa hematogenog metastaziranja cirkulišuće tumorske ćelije, da bi napustile cirkulaciju, moraju uništiti pomenute međućelijske adhezije. Ovaj mehanizam omogućava tumorskim ćelijama da napuste cirkulaciju poslije razgradnje bazalne membrane i proteina matriksa, koja se odvija pod dejstvom već opisanih proteinaza (114).

8. Proliferacija i indukcija angiogeneze – jednom kad se tumorske ćelije nastane u udaljenom organu, one proliferišu i stvaraju tumorsku promjenu. Primarni tumor, kao i metastaze, mogu rasti do oko 1-2 mm³ i zadržati adekvatnu ishranu samo putem pasivne difuzije, dok rast preko ove granice zahtijeva neovaskularizaciju (96).

1.8. ZNAČAJ ANGIOGENEZE U TUMORSKOM RASTU I PROCESU METASTAZIRANJA

Razvoj tumora ovisi o promjenama u heterotopičnim interakcijama između incipijentnih tumorskih ćelija i njihovih normalnih susjednih ćelija. Jednom formirani tumori, uključujući i njihove metastaze, zadržavaju kompleksnu mješavinu nekoliko ćelijskih tipova koji saraduju u zajedničkom stvaranju maligne neoplazme. Većina, ako ne i svi maligni tumori, tokom svog razvoja stiču isti set funkcionalnih sposobnosti, iako to postižu različitim mehanizmima: sami sebi obezbjeđuju dovoljno faktora rasta, sposobnost izbjegavanja

apoptoze, neosjetljivost na signale usmjerene protiv faktora rasta, sposobnost invazije tkiva i metastaziranja, neograničen replikativni potencijal, sposobnost neprekidne angiogeneze (97).

Angiogeneza (neovaskularizacija) predstavlja proces stvaranja novih funkcionalnih kapilarnih krvnih sudova iz već postojeće vaskularne mreže. Angiogeneza ima ključnu ulogu u procesu reprodukcije, razvoja i cijeljenja, a od ključnog je značaja ne samo za normalan rast, već i za nastanak i razvoj mnogih patoloških stanja, među koja se ubrajaju i neoplastične bolesti (97, 115).

Postoje dva tipa angiogeneze, normalna ili fiziološka i patološka, sa razlikom koja se bazira na veoma različitim tipovima krvnih sudova koju one indukuju. Fiziološka angiogeneza počinje tokom fetalnog razvoja i nastavlja se nakon rođenja, formiranjem normalnih krvnih sudova adultnih tkiva. Normalni krvni sudovi su distribuirani ravnomjerno i na jednakim razmacima i organizovani su u hijerarhiji od elastičnih i muskularnih arterija ka arteriolama, kapilarima, postkapilarnim venulama i malim i velikim venama (116).

Angiogenezu treba razlikovati od nekoliko sličnih procesa, odnosno vaskulogeneze, arteriogeneze i limfangiogeneze. Vaskulogeneza se odnosi isključivo na *de novo* formirane krvne sudove od primitivnih ćelija koji se javljaju u ranom embrionalnom razvoju. Međutim, ova razlika je nedavno postala manje jasna otkrićem da pod određenim okolnostima endotelne prekursorne ćelije, prisutne u koštanoj srži i cirkulirajućoj krvi, doprinose adultnoj angiogenezi (117). Pojam angiogeneza odnosi se na formiranje malih krvnih sudova i zato ju je potrebno razlikovati od pojma arteriogeneze, koja podrazumijeva formiranje novih arterija (117). Bez obzira na to, neki faktori (npr. VEGF-A) koji indukuju angiogenezu takođe generišu i arterijske krvne sudove (117). Zatim, angiogenezu treba razlikovati od limfangiogeneze, procesa formiranja novih limfatičkih vodova, mada VEGF-A, kao i drugi članovi porodice VPF/VEGF i nekih drugih faktora poput bFGF, mogu indukovati formiranje i krvnih i limfnih sudova, bilo direktno ili indirektno (117).

Prisustvo brojnih krvnih sudova u tkivu većine solidnih tumora uočeno je prije više decenija i sve donedavno se nije pridavao značaj i zanemarivana je njihova uloga u procesu rasta i razvoja tumora. Temelje istraživanja tumorske angiogeneze je 70-ih godina prošlog vijeka postavio Folkman (118, 119) (slika 3).

Istraživanja ukazuju na to da je proces angiogeneze i neovaskularizacija tumorskog tkiva ključni korak za rast tumora i proces invazije i metastaziranja (120). Vaskularizacijom primarnog tumora započinje ekspanzivni rast i tumor dobija metastatski potencijal, a razvoj krvnih sudova je neophodan i za rast udaljenog metastatskog tumorskog ognjišta (118). Složeni proces angiogeneze sastoji se od više faza i ovisan je o balansu između pozitivnih i negativnih faktora regulacije, kao i od kompleksne mreže autokrinih i parakrinih interakcija između tumorskih ćelija, stromalnih ćelija i endotelnih ćelija, na koje zauzvrat utiče sastav okolnog ekstracelularnog matriksa (120, 121). Angiogeneza je ključni faktor u progresiji invazivnih tumora. Putevi koji kontrolišu prekretnicu ka angiogenom fenotipu u tumorima su kompleksni i slabo izučeni, ali uključuju hipoksiju, genetske mutacije i stromalne i inflamatorne reakcije (123).

Osnovi Folkmanove teorije o tumorskoj angiogenezi sažeti su u nekoliko tačaka (slika 3) (119):

1. Većina primarnih solidnih tumora prolazi avaskularnu fazu, koja može trajati godinama i u kojoj je tumor mali – doseže maksimalan dijametar 1-2 mm. Po Folkmanu, u avaskularnoj fazi, tumorske ćelije hranljive materije i kiseonik, neophodne za rast i preživljavanje, obezbjeđuju procesom pasivne difuzije.

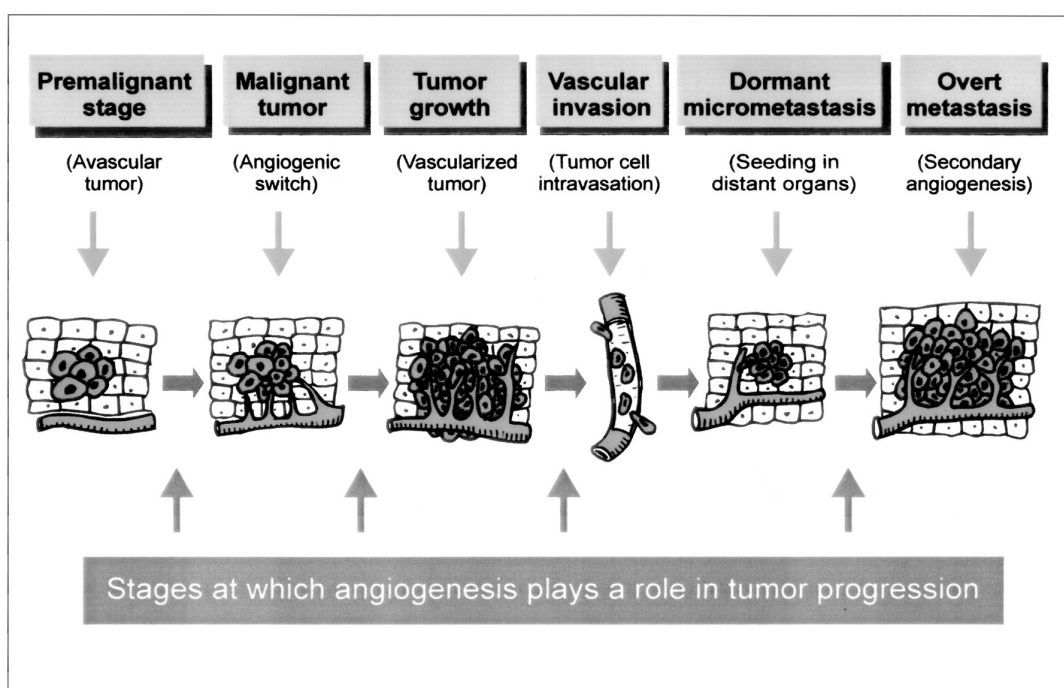
2. Prečnik tumora 1–2 mm predstavlja kritičnu veličinu za tumor kada opskrba tumorskih ćelija putem difuzije postaje nedovoljna za kontinuirani rast tumora. Pomenuta tumorska masa može pokrenuti proces angiogeneze, pri čemu iz okolnih krvnih sudova domaćina nastaju novostvoreni kapilarni krvni sudovi, koji urastaju u tumorsku masu, što neminovno dovodi do ekspanzije tumorske mase i mogućnosti hematogenog širenja tumora i prelaženja tumora iz avaskularne u vaskularnu fazu.

3. Proces angiogeneze pokreće ektopično lučenje faktora rasta od strane tumorskih ćelija, inicijalno nazvanih "faktori tumorske angiogeneze" (TAF, eng. *tumor angiogenesis factor*).

4. Folkman je postavio postulat da je blokadom angiogeneze moguće uticati na tumorski rast bilo sprečavanjem produkcije faktora tumorske angiogeneze (TAF) i blokiranjem njihove funkcije, ili direktnim uticajem na endotelne ćelije novostvorenih nezrelih krvnih sudova. Druga mogućnost se temelji na pretpostavci da su tumorski krvni

sudovi i njihove endotelne ćelije dovoljno različite od zrelih krvnih sudova, što bi omogućilo postizanje adekvatnog terapijskog indeksa.

5. Po Folkmanu, inhibicija angiogeneze trebalo bi da rezultuje regresijom tumorske mase na prečnik 1-2 mm i vraćanjem tumora u avaskularnu fazu. Po njegovom mišljenju, terapija malignih tumora, koja se temelji na inhibiciji angiogeneze, trebalo bi da omogući kontrolu tumorskog rasta i održavanje tumorske mase u avaskularnoj fazi, čime bi se spriječila mogućnost nastanka metastaza (124).



Slika 3. Model tumorske angiogeneze po Folkmanu (Hoeben A., Landuyt B., Highley M.S., Wildiers H., Van Oosterom A.T., De Bruijn E.A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev*2004; 56:549- 580.)

Iako je većina solidnih tumora visoko vaskularizovana, njihovi krvni sudovi nisu jednaki krvnim sudovima normalnog tkiva (124). Tumorski krvni sudovi su heterogeni u pogledu organizacije, funkcije i strukture (125). Normalna vaskulatura aranžovana je u vidu hijerarhije jednakih dobro diferentovanih arterija, arteriola, kapilara, venula i vena, a za razliku od nje, tumorska vaskulatura je nejednako distribuirana i haotična. Tumorski sudovi često pokazuju serpentiginozan rast, iregularno se granaju i formiraju arterio-venske šantove (125). Protok krvi kroz ove sudove nije konstantan, jednosmjernan. Kroz otvorene krvne sudove perfuzija nije kontinualna; tokom svega nekoliko minuta protok krvi može krenuti u

skroz drugom pravcu, pa čak i u suprotnom smjeru u istom krvnom sudu (124). Tumorski krvni sudovi su mnogo gušći na prelazu tumora prema normalnom tkivu, nego u centralnim dijelovima. Takođe, gustina krvnih sudova ima tendenciju da se smanjuje kako tumor raste, stvarajući zone ishemije i na kraju i nekroze kako tumor "preraste svoju vlastitu opskrbu krvlju" (124). Konačno, krvni sudovi su strukturalno abnormalni. Na osnovu njihovih anatomskih i funkcionalnih karakteristika, Dvorak i saradnici su tumorske krvne sudove klasifikovali u najmanje šest potpuno različitih tipova, koji se potpuno razlikuju jedni od drugih i, izuzev tumorskih kapilara, razlikuju se od krvnih sudova prisutnih u normalnom tkivu (tabela 4, slika 4) (124).

Tumorska angiogeneza relativno je primitivan proces koji nastaje zbog neuravnotežene sekrecije malih podgrupa citokina, naročito VEGF-A (126–129).

Tabela 4. Klasifikacija tumorskih krvnih sudova. Drenirajuće vene (DV, *draining veins*), opskrbljujuće arterije (FA, *feeder arteries*), glomeruloidne mikrovaskularne proliferacije (GMP, *glomeruloid microvascular proliferations*), krvni sudovi "majke" (MV, *mother vessels*), vaskularne malformacije (VM, *vascular malformations*). MV, kapilare, GMP i VM nastaju angiogenezom. FA i DV nastaju procesom arteriogeneze i venogeneze. Posebno, pukotine ispunjene eritrocitima obložene tumorskim ćelijama prije negoli vaskularnim endotelom, opisane su u nekim tumorima, naročito u okularnim melanomima, i odnose se na "vaskularne mimikrije" ("*vascular mimicry*") (Folberg R, Hendrix M.J., Maniotis A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361–381) (129)

Krvni sudovi "majke" (<i>mother vessels</i> , MV)	Veoma uvećane, tortuozne, tankih zidova, hiperpermeabilne sinusoide siromašne pericitima
Kapilare	Slične normalnim kapilarima
Glomeruloidne mikrovaskularne proliferacije (<i>glomeruloid microvascular proliferations</i> , GMP)	Klupka sitnih sudova uronjenih u složenu mješavinu iregularno razmještenih pericita i ekstenzivne višeslojne bazalne membrane
Vaskularne malformacije (<i>vascular malformations</i> , VM)	Veliki sudovi sa iregularnim omotačem sačinjenim od glatkomišićnih ćelija
Opskrbljujuće arterije (<i>feeder arteries</i> , FA) i drenirajuće vene (<i>draining veins</i> , DV)	Izuzetno uvećani, tortuozni krvni sudovi omotani glatkomišićnim ćelijama koji snabdijevaju i dreniraju kompleks angiogenih krvnih sudova

KRVNI SUDOVI "MAJKE" (eng. *mother vessels*)

Krvni sudovi "majke" (MV) su visoko permeabilne sinusoide koje počinju da se razvijaju od prethodno postojećih venula i, u manjem obimu, od kapilara tokom nekoliko sati od ubrizgavanja tumorskih ćelija ili Ad-VEGF-A164 u tkivo miša. Formiranje MV protiče kroz tri nivoa degradacije bazalne membran (BM), odvajanja pericita i izrazitog uvećanja. Degradacija BM je esencijalni rani korak, budući da su BM neelastične strukture koja ne dozvoljava ekspanziju sitnih krvnih sudova. Degradacija venularne BM posredovana je povećanom ekspresijom pericitnih katepsina, udruženih sa smanjenom ekspresijom inhibitora cistein-proteaze i pericita i endotelnih ćelija. Narušavanje lokalne katepsin - inhibitor cistein proteaze ravnoteže vodi degradaciji BM i odvajanju pericita, time otklanjajući barijere koje normalno ograničavaju veličinu sitnih krvnih sudova. Rapidno vaskularno uvećanje zahtijeva i povećanje plazmatske membrane, koju dijelom obezbjeđuju vezikulovakuolarne organele grupisane u citoplazmi normalnih venularnih endotelnih ćelija. One imaju važnu ulogu u transportu makromolekula duž venula kod vaskularne hiperpermeabilnosti indukovane VEGF-A, histaminima, itd. (116, 131, 132). Kako se MV razvijaju, venularne endotelne ćelije postaju tanke, a vezikulovakuolarne organele se brojčano smanjuju i gube kompleksnost.

KRVNI SUDOVI "KĆERKE" (eng. *DAUGHTER VESSELS*): KAPILARE, GLOMERULOIDNE MIKROVASKULARNE PROLIFERACIJE (GMP) I VASKULARNE MALFORMACIJE

Krvni sudovi "majke" se formiraju i opstaju sve dok su visoke koncentracije VEGF-A prisutne.

Njihovi tanki zidovi, usporen protok krvi i nedostatak podrške pericita i BM, čini ih prijemčivim za trombozu ili kolaps. Stoga su oni prelazne strukture, prisutne samo u ograničenom periodu, i evolviraju u neki drugi tip stabilnih krvnih sudova "kćerki" (tabela 4, slika 4) (124).

KAPILARE

Jedan od mehanizama kojim MV prerastaju u kapilare podrazumijeva intraluminalno premošćavanje, proces koji je otkriven u tumorskim krvnim sudovima (133), a koja je kasnije otkrivena i u angiogenezi indukovanoj Ad-VEGF-A164 i zarastanju rana i nakon hronične

vaskularne dilatacije (124, 130). Endotelne ćelije razvlače citoplazmatske nastavke u i kroz lumene MV, formirajući tansluminalne mostove koji dijele krvni tok na multiple kanaliće malog kalibra. Nakon toga se sitni kanalići međusobno razdvajaju i formiraju pojedinačne sudove veličine kapilara, koji imaju strukturu kao i normalne kapilare i nisu hiperpermeabilne (124).

GMP

Glomeruloidne mikrovaskularne proliferacije nađene su i u velikom broju humanih tumora koji ekspimiraju VEGF-A, naročito glioblasoma multiforme, ali i u karcinomima dojke i želuca, i u tom slučaju predstavljaju loš prognostički parametar (124, 130). GMP su hiperpermeabilne, sa slabim protokom krvi. Nastaju od velikih loše diferentovanih CD-31 i VEGFR-2 pozitivnih ćelija koje dijele lumene MV u mnogo manje kanaliće. GMP postepeno stiču pericite i deponuju ekstenzivne slojeve abnormalne BM. GMP za svoj razvoj i opstajanje traže egzogeni VEGF-A164 (130).

VASKULARNE MALFORMACIJE

Neki MV prelaze u vaskularne malformacije (VM) zadržavajući veličinu i stičući glatkomišićni sloj. VM se lako razlikuju u odnosu na normalne arterije i vene svojim neodgovarajućim velikim izgledom (imajući u vidu njihovu lokaciju) i svojim tanjim i često asimetričnim mišićnim omotačem. Svojim izgledom najviše podsjećaju na nemaligne VM koje se javljaju npr. na koži, mozgu. VM nisu propusne za plazmatske proteine. Za razliku od MV i GMP, vaskularne malformacije perzistiraju unedogled u okruženju sa niskim nivoom VEGF-a (124).

OPSKRBLJUJUĆE ARTERIJE I DRENIRAJUĆE VENE (eng. FEEDER ARTERIES AND DRAINING VEINS)

Indukujući angiogenezu, tumori i Ad-VEGF-A164 stimulišu abnormalnu arteriogenezu i venogenezu, formirajući velike, često tortuozne krvne sudove koji opskrbljuju i dreniraju tumorsku mikrovaskulaturu. Ovi su sudovi veći od VM i stiču strukturalne karakteristike koje su negdje između arterija i vena. Poput VM, ovi sudovi perzistiraju unedogled u okruženju sa niskim VEGF koncentracijama (124).

Kada tumorske metastaze perzistiraju u avaskularnom stanju, tzv. stanju uspavanosti, tumorska ćelijska proliferacija je balansirana apoptozom tumorskih ćelija (96). Indukcija angiogeneze je posredovana molekulima promotorima i supresorima koje oslobađaju i tumorske ćelije i normalne ćelije i koje se u slučaju stanja uspavanosti nalaze u ravnoteži. U slučaju tumorskog rasta, ravnoteža se narušava i počinje angiogeneza, a redukuje se apoptoza tumorskih ćelija, tzv. angiogeni prekidač, prekretnica ("angiogenic switch"). Različiti tipovi tumorskih ćelija koriste različite molekularne strategije da bi aktivirale angiogenezu ("angiogenic switch") (97). Prelazak tumorskih ćelija u angiogeni fenotip može voditi pretjeranoj ekspresiji promotora angiogeneze, mobilizaciji angiogenih proteina iz ekstracelularnog matriksa, regrutovanju normalnih okolnih ćelija poput makrofaga, koji proizvode sopstvene angiogene proteine ili kombinaciji ovih procesa. Povećanje broja krvnih sudova omogućava tumorskim ćelijama da uđu u cirkulaciju i daju udaljene metastaze (96). Nakon što se pokrene angiogeneza, dolazi do pojave obostrane parakrine stimulacije, odnosno angiogeni faktori koje indukuju proliferisane tumorske ćelije stimulišu proliferaciju endotelnih ćelija koje sekretuju faktore rasta (npr. *b-Fibroblast GF*, *insulin GF*, *platelet-derived GF*) stimulišući sa svoje strane proliferaciju tumorskih ćelija (134, 135, 136).

Aktivirane endotelne ćelije, locirane na vrhovima kapilara koje rastu, luče kolagenaze, urokinaze i aktivatore plazminogena, što dozvoljava urastanje kapilara i širenje tumorskih ćelija u i kroz okolni fibrin-gel matriks, vezivnotkivnu stromu i u limfatične i vaskularne prostore. Sve ovo zajedno dovodi do brzog rasta tumora, a rast i proliferacija endotelnih ćelija doprinose i razvoju metastaza (136).

1.8.1. Regulacija angiogeneze i faktori angiogeneze

Proces angiogeneze je kontrolisan od strane angiogenih faktora koji su odgovorni za regulaciju koordinacije remodeliranja ekstracelularnog matriksa, proliferaciju endotelnih ćelija, diferencijaciju kapilara i formiranje anastomoza neophodnih za uspostavljanje opskrbe krvlju (tabela 5).

Faktore angiogeneze mogu lučiti tumorske ćelije, upalne ćelije i ćelije tumorske strome (122). Brojnim eksperimentalnim studijama potvrđeno je da je fiziološka kontrola angiogeneze rezultat postojanja ravnoteže između lokalne aktivnosti proangiogenih peptida i inhibitora angiogeneze. I promotore i inhibitore angiogeneze moguće je izolovati iz normalnih tkiva, mada u fiziološkim uslovima u tkivima odraslih predominira aktivnost inhibirajućih

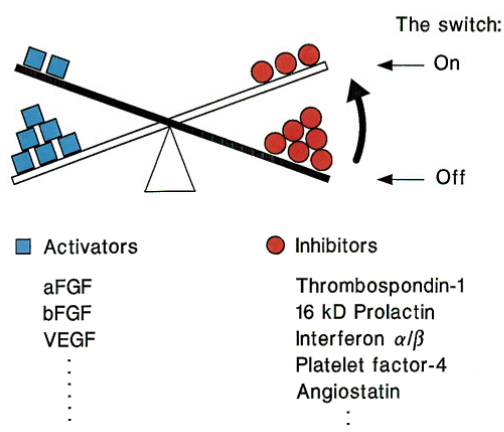
regulatornih faktora (127). Tumorska angiogeneza biva pokrenuta poremećajem balansa između aktivatora i inhibitora angiogeneze još u stadiju displazije ili *in situ* karcinoma, mnogo prije progresije tumora u invazivni stadij, što za rezultat ima redukciju apoptoze i favorizovanje proliferacije i ispoljavanje tzv. "angiogenog fenotipa" (eng. *angiogenic switch*) (138). Takođe, početak tumorske angiogeneze može se desiti u bilo kojem stadijumu progresije tumora, što ovisi o tipu tumora i njegovoj mikrosredini (121). Tumorske ćelije mogu pretjerano ekspimirati angiogene faktore ili mijenjati regulaciju endogenih angiogenih faktora da bi uspostavile neravnotežu između proangiogenih i antiangiogenih faktora (140).

Tabela 5. Angiogeni faktori u karcinomu prostate (96)

	Proangiogeni faktori	Antiangiogeni faktor
Endogeni faktori	Matrix metaloproteinases (MMP) VEGF Basic fibroblast growth factor 2 (bFGF-2) Fibroblast growth factor 4 (FGF-4) Transforming growth factor b1 (TGF-b1) Interleukin 8 (IL-8) Interleukin 1b (IL-1b) Nitric oxide (NO) Interleukin 6 (IL-6) Cyclooxygenase 2 (COX-2) Tumor necrosis factor (TNF) Insulin growth factor 1 (IGF-I)	Tissue inhibitor of metaloproteinases- 1(TIMP-1) Interleukin-10 (IL-10) Angiostatin Endostatin Prostate-specific antigen (PSA) Interferon (IFN)
Farmaceutski agensi		Neutralizing antibodies MMP inhibitors Fumagillin analogue Linomide Carboxyamido-triazole

Istraživanja sugerišu da promjene u relativnoj ravnoteži induktora i inhibitora angiogeneze mogu aktivirati angiogeni prekidač. U nekim tkivima, nedostatak induktora angiogeneze može držati angiogeni prekidač isključenim, dok su u drugim tkivima induktori prisutni, ali se drže pod kontrolom višim nivoima inhibitora angiogeneze. Znači, bilo redukcijom koncentracije inhibitora (npr. TSP-1, thrombospondin - 1) gubitkom tumor supresor gena, ili povećanjem nivoa aktivatora (npr. VEGF) hipoksijom, može se promijeniti ravnoteža i aktivirati prekidač, što će dovesti do stvaranja novih krvnih sudova (97, 119) (slika 5).

THE BALANCE HYPOTHESIS FOR THE ANGIOGENIC SWITCH



Slika 5. Hipoteza ravnoteže angiogenog prekidača ("angiogenic switch") (97). Normalna vaskulatura u stanju mirovanja može biti aktivirana da stvara nove kapilare (proces angiogeneze), morfogenim procesom kontrolisanim mehanizmom angiogenog prekidača (angiogenic switch mechanism). Većina dokaza sugeriše da promjene na nivou relativne ravnoteže između induktora i inhibitora angiogeneze može aktivirati prekidač. U nekim tkivima, odsustvo induktora angiogeneze može držati prekidač isključenim, dok su u drugim tkivima induktori angiogeneze prisutni, ali zakočeni višim nivoima inhibitora angiogeneze. Stoga, redukovanje koncentracije inhibitora, npr. TSP-1 gubitkom tumor-supresor gena, odnosno povećanje nivoa aktivatora, npr. indukcijom VEGF putem hipoksije, može promijeniti ravnotežu i aktivirati prekidač dovodeći do rasta novih krvnih sudova (preuzeto iz: Hanahan D., Weinberg R.A. *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000; 100: 57–70).

1.8.2. Angiogeni faktori

Molekularna osnova proangiogenih signala je vrlo složena, a sam proces je regulisan mnogobrojnim faktorima koji bivaju aktivirani u različitim fazama angiogeneze. Komplikovani mehanizam kontrole omogućava prelazak iz dugotrajne faze mirovanja u "switch" fazu, koja se sastoji u lokalnom angiogenom odgovoru koji će omogućiti podmirivanje povećanih potreba tkiva za krvlju. Proces angiogeneze može biti aktiviran brojnim fiziološkim mehanizmima kao što je poremećaj homeostaze kisika ili poremećaj hormonskog statusa. Fiziološka angiogeneza kao npr. angiogeneza u procesu reprodukcije ili korektivna angiogeneza koja se razvija prilikom zarastanja rana ili formiranja kolateralnog krvotoka spada u procese koji imaju mogućnost samokontrole. U slučaju tumorskog rasta, dugotrajni latentni period prethodi neovaskularizaciji. Stohastička priroda pokretanja angiogeneze upućuje na to da medijatori koji ne učestvuju u fiziološkoj angiogenezi mogu imati ulogu u neoangiogenezi tumora. U posljednjih nekoliko decenija otkrivene su brojne

molekule koje djeluju kao stimulatori angiogeneze direktno ili indirektno, sinergistički sa drugim supstancama podstičući proces angiogeneze (140).

Novijim istraživanjima je potvrđeno i postojanje brojnih antiangiogenih faktora, čija aktivnost utiče na regulaciju angiogeneze i na ispoljavanje angiogenog fenotipa. Tumorska neoangiogeneza uslovljena je predominacijom proangiogene aktivnosti bilo da je podržava povećana aktivnost proangiogenih faktora ili izostanak inhibitorne aktivnosti antiangiogenih faktora (141).

Generalno, tumorska angiogeneza se posmatra kao posljedica aktivacije angiogenog prekidača – zasebnog genetskog događaja koji u sukcesivnim genetskim alteracijama tokom tumorske progresije daje tumoru sposobnost da regrutuje krvne sudove okolnog tkiva i koji se javlja tokom ranih faza tumorskog razvoja, koje prethode pojavi velike maligne tumorske mase (140).

Angiogeni faktori mogu biti produkt tumorskih ćelija, inflamatorih ćelija, endotelnih ćelija i ćelija strome (npr. makrofagi sintetisu VEGF, TNF- α , eng. *tumor necrosis factor* – α , bFGF, interleukin 8 i TSP-1, eng. *Thrombospondin-1*) (142). U literaturi je opisano više od 20 endogenih faktora koji stimulišu proces angiogeneze, a koji su po svojoj prirodi molekule proteina, čija sinteza je određena aktivnošću određenih gena (122). Mutacije tumor supresor gena p53 i VHL rezultuju gubitkom ekspresije antiangiogenog faktora *thrombospondina 1* (TSP-1) i povećavaju ekspresiju VEGF (142). Mutacije na genima odgovornim za sintezu proangiogenih faktora mogu biti jedna od karika u lancu progresije i procesa metastaziranja solidnih tumora. Prva molekula identifikovana kao angiogeni faktor bio je osnovni fibroblastni faktor rasta – bFGF (eng. *basic fibroblast growth factor*) (143). U grupi regulatora angiogeneze se nalaze i kiseli fibroblastni faktor rasta – aFGF (eng. *acidic fibroblast growth factor*), transformišući faktor rasta α i β - TGF- α i β (eng. *transforming growth factor* – α and β), hepatocitni faktor rasta – HGF (eng. *hepatocyte growth factor*), faktor tumorske nekroze – α – TNF- α (eng. *tumor necrosis factor- α*), angiogenin, interleukin 8 (IL-8), itd. (tabela 5) (96). Tumorski endotel pokazuje heterogenost u vezivanju specifičnih peptidnih sekvenci (144). Prostatični specifični membranski antigen (PSMA) nađen je u tumorskoj vaskulaturi, uključujući i tumore neprostatičnog porijekla, ali nije nađen u vaskulaturi benignog tkiva (144). Endotelne ćelije različitih tkiva su takođe fenotipski

različita, razlikuju se u odgovoru na različite regulatore angiogeneze i regulisani su tkivno specifičnom ekspresijom citokina i faktora rasta u mikrosredini (144).

Uprkos velikom broju otkrivenih molekula koje su odgovorne za stimulaciju angiogeneze, smatra se da ključna uloga vaskulogeneze, kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima, pripada porodici proteina nazvanih vaskularni endotelni faktori rasta – VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor*) (121).

1.9. VASKULARNI ENDOTELNI FAKTOR RASTA (VEGF)

Vaskularni endotelni faktor rasta prvi je put izolovan 1989. godine, a sinonimi korišćeni u literaturi za ovaj protein su faktor vaskularnog permeabiliteta – VPF (eng. *vascular permeability factor*) i vaskulotropin (145). Njegovu prvu funkciju (vaskularnu permeabilnost) otkrio je Dvorak, a prvi ga je molekularno definisao Ferrara (123, 145). VPF/VEGF porodicu proteina čine najvažniji proteini uključeni u razvoj vaskulature koji imaju esencijalnu ulogu u vaskulogenezi, kao i u fiziološkoj i patološkoj angiogenezi i limfangiogenezi (117).

1.9.1. Biološka aktivnost VEGF-a

VEGF je vrlo specifična najmoćnija mitogena supstanca koja djeluje na endotelne ćelije arterija, vena i limfnih sudova, povećava vaskularnu permeabilnost i indukuje proteolitičke enzime neophodne za vaskularno remodeliranje (122). Isto tako funkcioniše kao potentan antiapoptotičan faktor endotelnih ćelija u novoformiranim krvnim sudovima (123). Tumorske ćelije mogu produkcijom VEGF ” hraniti” (indukovati) nove krvne sudove, koji zauzvrat hrane tumorske ćelije, stvarajući tako podmukli i trajno obnavljajući parakrini prsten (123). VEGF podstiče angiogenezu u trodimenzionalnom *in vitro* modelu, u kome endotelne ćelije mikrovaskulature invadiraju kolageni gel, dovodeći do stvaranja struktura sličnih kapilarnom koritu (146). VEGF takođe indukuje proliferaciju endotelnih ćelija iz prstena pacova umetnutog u kolageni gel. Suprotno VEGF, inzulinu sličan faktor rasta I – IGF-I (eng. *insulin - like growth factor I*) ili faktor rasta iz trombocita – PDGF (eng. *platelet derived growth factor*) takođe dovode do umnožavanja endotelnih ćelija, ali koje je praćeno izraženom proliferacijom fibroblasta (147). VEGF takođe stvara izražen angiogeni odgovor i u brojnim *in vivo* modelima kao što su npr. model na horioalantoičnoj pilećoj membrani, zečijoj kornei, irisu primata i sl. (148, 149).

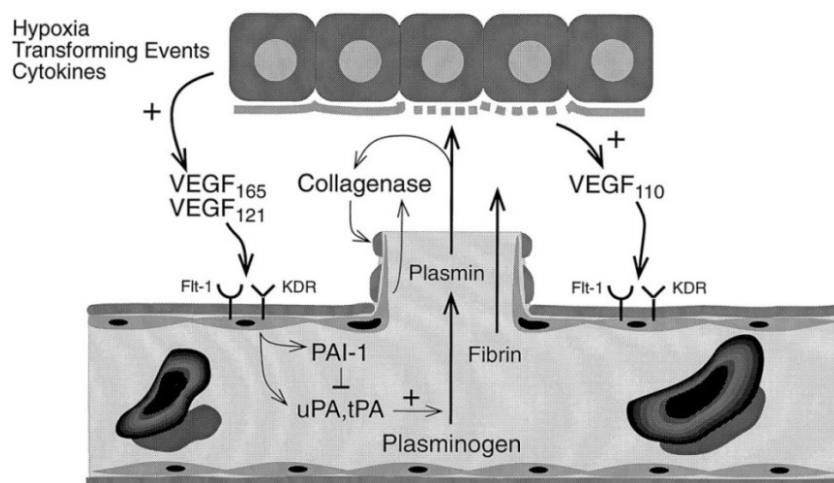
VEGF indukuje ekspresiju serin proteaza tip urokinaza, aktivatore plazminogena-ktivni tip kao i inhibitore aktivatora plazminogena u uzgojenim bovinim endotelnim ćelijama (150). VEGF podstiče i ekspresiju i intersticijske metaloproteinaze kolagenaze u endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene (151). Aktivnost aktivatora plazminogena i kolagenaza koju podstiče VEGF obezbjeđuje sredinu koja omogućava migraciju i proliferaciju endotelnih ćelija. Nekim studijama je potvrđeno da VEGF dovodi do povećane ekspresije receptora za aktivatore plazminogena tip urokinaza (152). Smatra se da je interakcija aktivatora plazminogena sa receptorima aktivatora plazminogena bitan element u lancu procesa koji dovode do ćelijske invazije i remodeliranja tkiva, a pomenuta otkrića ukazuju na proangiogenu prirodu VEGF (153).

VEGF je poznat i kao faktor vaskularne permeabilnosti, a prema studiji Dvoraka i koautora, povećana propustljivost mikrovaskulature predstavlja ključni korak u procesu tumorske angiogeneze i angiogeneze u toku zarastanja rana, pri čemu je glavna funkcija VEGF-a indukcija curenja proteina plazme, što za rezultat ima stvaranje ekstravaskularnog fibrinskog gela koji predstavlja osnovni supstrat za rast endotelnih i tumorskih ćelija (154, 155). Novija istraživanja ukazuju na to da je jedna od uloga VEGF stvaranje fenestracija u endotelu malih kapilara i venula čak i na onim mjestima u kojima endotelne ćelije obično nemaju fenestre, što za posljedicu ima povećanje permeabilnosti krvnih sudova (156) (slika 6).

Neke od studija su potvrdile da VEGF može imati inhibitorni efekat na maturaciju antigen prezentujućih ćelija domaćina kao što su npr. dendritičke ćelije. Potvrđeno je da VEGF ima inhibitorni učinak na sazrijevanje nezrelih dendritičnih ćelija, pri čemu nema značajan uticaj na funkciju zrelih ćelija. Pomenuti nalaz navodi na zaključak da VEGF olakšava rast tumora, omogućavajući tumorskim ćelijama da izbjegnu imuni odgovor domaćina (158).

Jedan od dodatnih efekata VEGF-a na endotel jeste stimulacija transporta heksoze, što obezbjeđuje veću količinu energije tokom proliferacije endotelnih ćelija (157).

VEGF *in vitro* izaziva vazodilataciju, prolaznu tahikardiju, hipotenziju i smanjenje srčane ejskione frakcije (eng. *output*) (159).



Slika 6. Uticaj VEGF izoformi na endotelne ćelije (Ferrara N., Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* 1997; 18: 4-25)

VEGF ima četiri glavne biološke aktivnosti koje doprinose indukciji angiogeneze (145, 146, 156):

- rast i proliferacija vaskularnih endotelnih ćelija;
- migracija vaskularnih endotelnih ćelija;
- preživljavanje nezrelih endotelnih ćelija putem prevencije apoptoze;
- povećana vaskularna permeabilnost kapilara.

VEGF učestvuje i u limfangiogenezi. U prisustvu VEGF limfatične endotelne ćelije proliferišu i formiraju gigantske limfne sudove u kojima je limfni tok inertan (160).

VEGF također djeluje i na druge ćelije, naročito ćelije koje potiču iz kostne srži, promocijom hemotakse monocita, inhibicijom maturacije dendritičnih ćelija, povećanom produkcijom B-limfocita i generiranjem nezrelih mijeloidnih ćelija (161).

VEGF je uključen i u preživljavanje hematopoietskih stem ćelija tokom hematopoietske repopulacije, najvjerojatnije posredstvom VEGFR-1 (162). Mitogeni efekti VEGF su *in vitro* primijećeni kod retinalnih pigmentovanih ćelija, pankreatičnih duktalnih žljezdanih ćelija i Schwannovih ćelija, ali je još nejasno da li se ovi efekti javljaju i *in vivo* (163).

1.9.2. Struktura VEGF gena i osobine VEGF izoforma

Humani VEGF gen gradi osam egzona koje razdvaja sedam introna. Lokalizovan je na 6p21.3 hromozomu čiji puni transkript sadrži 189 aminokiselinskih izoformi (164). Danas je sem VEGF proteina (VEGF-A) poznato još pet VEGF srodnih proteina: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i placentarni faktor rasta (163). Ipak, najznačajniji protein iz ove grupe je VEGF-A, koji je i najviše izučavan. Malo se zna o VEGF-B osim o njegovoj ulozi u razvoju koronarnih arterija. VEGF-C i D su esencijalni za razvoj limfatičnog sistema i mogu takođe indukovati angiogenezu i povećanu vaskularnu permeabilnost (117). Oba se sintetišu kao preproteini kojima je potrebno postranslacijsko procesuiranje. PlGF je otkriven u placenti i nema visoku ekspresiju u normalnim embrionalnim ili adultnim tkivima. Ekspresija PlGF se javlja kod mnogih tumora i u drugim formama patološke angiogeneze gdje potpomaže i podstiče aktivnost VEGF-A. VEGF-A ekspresija je regulisana u različitim tkivima i stanjima brojnim faktorima kao što su hipoksija (putem HIF-1), citokini i faktori rasta (TGF- β), razni hormoni (estrogen i progesteron) i u tumorima, onkogenima i tumor supresor genima (117).

VEGF-A se javlja u do sada poznate četiri izoforme VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 i VEGF 206 (165). VEGF 165 je izoform koji se najčešće eksprimira i koji je najviše proučavan; originalno je otkriven kao moćan vaskularni faktor permeabilnosti. Mikrovaskularna hiperpermeabilnost i njene posljedice (edem, zgrušavanje ekstravaziranog plazmatskog fibrinogena radi formiranja proangiogenog fibrinskog gela) obilježja su svih formi patološke angiogeneze (117).

Overekspresija pomenutog izoforma VEGF molekule dokazana je i u brojnim solidnim tumorima. Za razliku od izoforma VEGF165, VEGF 206 forma se javlja veoma rijetko i do sada je njeno prisustvo evidentirano samo u humanoj jetri (165).

Nekoliko VEGF-A izoformi indukuje povećanu vaskularnu permeabilnost, stimuliše proliferaciju i migraciju endotelnih ćelija i obezbjeđuje preživljavanje endotelnih ćelija. VEGF-A mijenja gensku ekspresiju endotelnih ćelija povećavajući nivo brojnih transkripcionih faktora (DSCR-1, TR3/Nur77), proteina koji učestvuju u zgrušavanju (tkivni faktor) i fibrinolizi (uPA i njegov receptor, tPA, PAI-1), matriks metaloproteinaza, NO sintazu, antiapoptičnih faktora (bcl-2, A1) adhezivnih molekula endotelnih ćelija (E-selektin, ICAM-1, VCAM) (117). Tumori koji ekspimiraju jedan ili drugi VEGF-A izoform indukuju značajno različite vaskularne forme (117).

1.9.3. Regulacija ekspresije VEGF gena

1. Hipoksija

Dokazano je da više mehanizama učestvuje u procesu regulacije ekspresije VEGF gena, a od posebnog značaja za aktivaciju VEGF gena i *in vivo* i *in vitro* je niska koncentracija O₂ kako u normalnim tako i u transformisanim ćelijama (166–169). U tumorima sa izraženom nekrozom uočava se visok stepen ekspresije VEGF mRNA u tumorskim ćelijama koje su izložene hipoksiji, a lokalizovane su neposredno uz nekrotična žarišta, što upućuje na to da je lokalna hipoksija značajan podsticaj za aktivaciju VEGF gena u tumorskom tkivu. Dokazano je da akumulacija adenozina, koja se javlja u hipoksiji, rezultira aktivacijom VEGF gena. Povećan nivo adenozina dovodi do aktivacije adenzin A₂ receptora što za posljedicu ima povećanje cAMP (ciklični adenzin monofosfat) koji posredstvom protein kinaze A izaziva porast nivoa VEGF mRNA (167, 170).

2. Citokini

Različiti citokini i faktori rasta regulišu ekspresiju VEGF mRNA ili oslobađanje VEGF proteina. Ekspozicija inaktivnih humanih keratinocita epidermalnom faktoru rasta – EGF (eng. *epidermal growth factor*), transformišućem faktoru rasta β – TGF- β (eng. *transforming growth factor* β), ili faktoru rasta keratinocita indukuje porast VEGF mRNA (171). Epidermalni faktor rasta – EGF takođe stimuliše produkciju VEGF u kultivisanim ćelijama glioblastoma (172). Interleukin 1 β – IL-1 β dovodi do povećane produkcije VEGF u glatkim mišićima aorte, a dokazano je da interleukin 1 α (IL- 1 α) i prostaglandin E₂ stimulišu ekspresiju VEGF u kultivisanim fibroblastima sinovije što za rezultat ima stimulaciju angiogeneze u nekim od inflamatornih procesa (173). Jedan od potvrđenih promotora angiogeneze u više ćelijskih vrsta iz grupe citokina je i interleukin 6 (IL-6) (174).

3. Ćelijska diferencijacija i transformacija

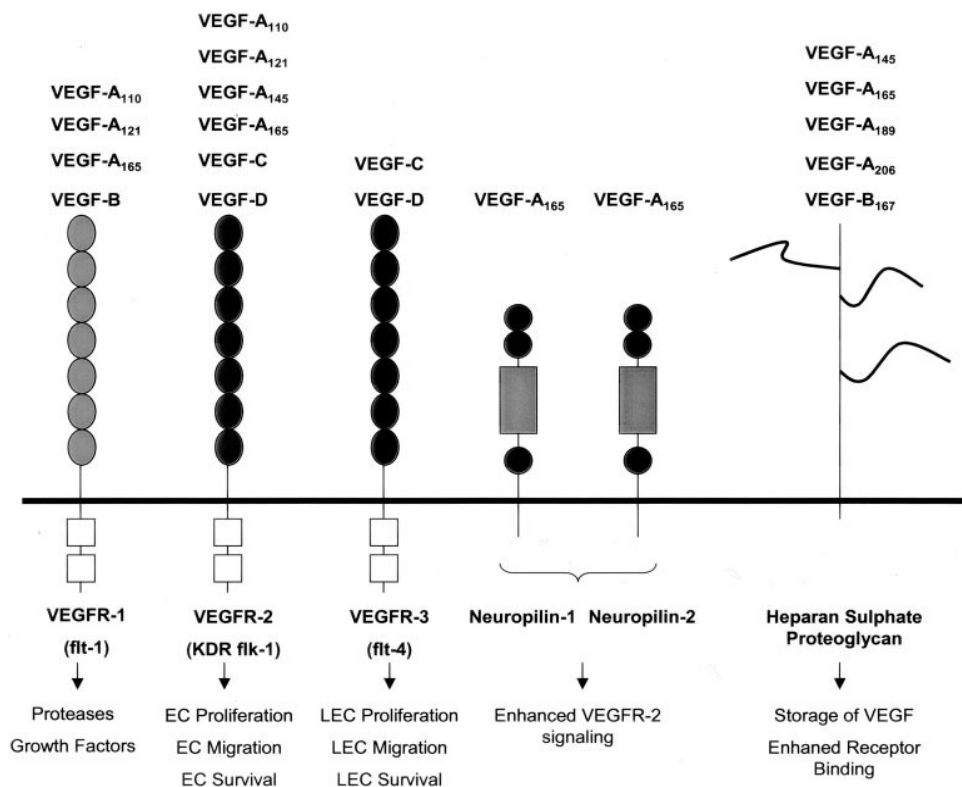
Diferencijacija različitih tipova ćelija utiče na regulaciju ekspresije VEGF gena. Povećana ekspresija VEGF mRNA dokazana je kod konverzije preadipocita u adipocite kao i u toku miogene diferencijacije (175).

Potvrđeno je da su mutacije na *p53* tumor supresorskom genu, amplifikacija na *ras* onkogenu, overekspresija *v-raf* i *v-Src* gena kao i deplecija "divljeg tipa" von Hippel Lindau gena medijatori abnormalne vaskularne proliferacije (176, 177).

1.9.4. VEGF receptori

Dejstvo VEGF posredovano je preko dva visoko specifična transmembranska tirozin kinaza receptora, VEGFR-1 (Flt-1) i VEGFR-2 (KDR/Flk 1) (178). Kao i drugi transmembranski receptori koji djeluju posredstvom tirozin kinaze, a koje aktiviraju faktori rasta, tako i VEGF receptori podliježu ligandom indukovanom procesu dimerizacije. Ligandom indukovana dimerizacija receptora pokreće signalnu transdukciju preko aktivacije autofosforilacije ili transfosforilacije susjednih receptorskih podjedinica što za krajni rezultat ima sintezu proteina medijatora procesa transdukcije (179). Istraživanje transdukcijskih puteva ovih receptora ukazuje na to da je aktivacija VEGFR-1 odgovorna za kontrolu ćelijske migracije, dok aktivnost VEGFR-2 kontroliše ćelijsku proliferaciju (180).

Novija istraživanja upućuju na postojanje i trećeg VEGF receptora, pod nazivom VEGFR-3 (Flt- 4) receptor, a identifikovan je samo u endotelnim ćelijama limfnih sudova odraslih i najvjerojatnije je uključen u regulaciju procesa limfangiogeneze. Pomenuti receptor ne pokazuje afinitet za VEGF, ali ga aktiviraju VEGF-C i VEGF-D (181). VEGFR-1 i VEGFR-2 se nalazi u većini endotelnih ćelija u embrionu, a prisutan je i u mezodermu, malim i većim krvnim sudovima i u endokardu. Ekspresija VEGFR-2 se drastično smanjuje pri kraju gestacije, dok ekspresija VEGFR-2 perzistira i u adultnom dobu, što navodi na zaključak da je VEGFR-2 medijator vaskulogene i angiogene aktivnosti dok aktivacija VEGFR-1 utiče na preživljavanje endotelnih ćelija (180). Ovu teoriju su potvrdili eksperimenti u kojima je, u nedostatku VEGFR-1, izostao proces formiranja normalnih krvnih sudova, dok je nedostatak VEGFR-2 rezultirao potpunim izostankom razvoja endotelnih ćelija i ćelija hematopoeze (182) (slika 7).



Slika 7. Porodica VEGF receptora. Tri signalizirajuća receptora tirozinkinaze VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR flk-1) i VEGFR-3 (flt-4) sastoje se od sedam struktura koje liče na imunoglobuline u ekstracelularnoj domeni, jednog transmembranskog regiona i konsenzusa domene tirozin-kinaze prekinute kinaza insertujućom domenom. Pomoćni receptori neuropilin 1 i neuropilin 2 ne posjeduju mogućnost sopstvene aktivacije kinaze, ali zato pojačavaju signalizaciju VEGF-2. Heparan-sulfatni proteoglikani ne samo da pojačavaju vezivanje za VEGFR, već služe kao rezerve VEGF (Preuzeto iz: Hoeben A., Landuyt B., Highley S.M., Wildiers H., van Oosterom A.T., de Bruijn E.A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol rev* 56 (4):549–580, 2004) (183).

1.9.5. Uloga VEGF i njegovih receptora u fiziološkoj angiogenezi

Proliferacija krvnih sudova je ključni momenat u širokom spektru fizioloških procesa, kao što je embrionalni razvoj, normalan rast i diferencijacija, zarastanje rana i proces reprodukcije (184) (tabela 6).

Tokom embrionalnog razvoja VEGF ekspresija je prvi put otkrivena unutar nekoliko prvih dana nakon implantacije u trofoblastima, što ukazuje na ulogu ovog faktora u procesu indukcije vaskularnog rasta u decidui, placenti i vaskularnim membranama (185). U humanom fetusu starosti 16–22 nedjelje ekspresija VEGF mRNA je potvrđena u gotovo svim tkivima, mada je najintenzivnija ekspresija zabilježena u plućima, bubrezima i slezeni (186).

Korišćenjem *in situ* hibridizacije dokazano je prisustvo Flk-1 mRNA u žumančanoj vreći, intraembrionalnom mezodermu, a kasnije i u angioblastima, endokardu i endotelu malih i velikih krvnih sudova (187). Neke od studija ukazuju na to da bi Flk-1 mogao biti jedan od najranijih prekursora endotelnih ćelija.

Tabela 6. Uloga VEGF u fiziološkoj angiogenezi (163)

Proces	Uloga VEGF
Embriogeneza i rani postnatalni razvoj	Esencijalan za formiranje krvnih sudova Delecija jednog VEGF gena je fatalna Esencijalan za rani postnatalni razvoj, naročito za funkciju bubrega
Rast skeleta	Stimuliše invaziju krvnih sudova potrebnu za rast trabekularne kosti Efekti inhibicije VEGF su reverzibilni kad se VEGF obnovi
Maturacija žutog tijela i materične angiogeneze	Stimuliše maturaciju žutog tijela koji zauzvrat oslobađa progesteron I progesteron i VEGF su neophodni za uterinu angiogenezu
Zarastanje rana	Uključen u stvaranje novih krvnih sudova na mjestu povrede

Flt-1 mRNA je selektivno prisutan u endotelnim ćelijama kako u fetalnim tkivima tako i u tkivima adultnih miševa. Ekspresija Flt-1 postoji i u endotelnim ćelijama u fazi mirovanja, a i u endotelu koji se nalazi fazi proliferacije (188).

Zanimljivo je postojanje ekspresije VEGF oko malih krvnih sudova u kojima se endotelne ćelije normalno nalaze u stanju mirovanja, kao što su npr. glomeruli, hipofiza, srce, pluća i mozak. Prethodno pomenuto otkriće govori u prilog da aktivnost VEGF nije odgovorna samo za vaskularnu proliferaciju već da je i preduslov za opstanak diferenciranih i formiranih krvnih sudova (189).

1.9.6. Uloga VEGF u patološkoj angiogenezi

Interakcija između VEGF i VEGFR-2 je neophodna i odgovorna za proliferaciju, migraciju i preživljavanje endotelnih ćelija, permeabilnost krvnih sudova, limfangiogenezu i stimulaciju/inhibiciju imunih efektornih ćelija.

Uloga VEGF i fiziološke angiogeneze kod odraslih je ograničena. Imajući u vidu složenost angiogeneze i centralnu ulogu VEGF, abnormalnosti u funkciji VEGF mogu uzrokovati ili igrati ulogu u različitim patološkim stanjima, kao što su retinopatija, i endometrioza, psorijaza, edem mozga, zapaljenja i reumatoidni artritis, a najviše su izučavane u tumorskoj angiogenezi (163) (tabela 7).

Tabela 7. Uloga VEGF u patološkoj angiogenezi (163).

Poremećaj	Uloga VEGF
Tumor (karcinom)	Stimuliše ekscesivnu angiogenezu; Omogućuje eksponencijalni rast tumora; Vaskularizacija obezbjeđuje put tumorskim ćelijama da dosegnu udaljena mjesta i formiraju metastaze.
Retinopatija	Stimuliše intraokularnu neovaskularizaciju dovodeći do sljepila.
Edem mozga	Ishemija najvjerovatnije stimuliše produkciju VEGF; Povećava vaskularnu permeabilnost.
Psorijaza	Stimuliše povećanu vaskularnu permeabilnost i angiogenezu.
Endometrioza	Visoki nivoi VEGF u peritonealnoj tečnosti sugerišu da je VEGF uključen u abnormalnu angiogenezu udruženu sa endometriozom
Reumatoidni artritis	Stimuliše angiogenezu i povećanu vaskularnu permeabilnost

VEGFR-1 i VEGFR-2 su široko rasprostranjeni na normalnom vaskularnom endotelu i povećava im se nivo u patološkoj angiogenezi indukovanoj VEGF-A (117). Nađeno je da VEGF-A 165 ima važnu ulogu u mobiliziranju endotelnih ćelija i hematopoietičnih prekursora iz koštane srži koje takođe eksprimiraju VEGFR-1 i -2. Solubilna forma VEGFR-1 (sFlt) koja nastaje alternativnim cijepanjem prisutna je u serumu i i zadržava sposobnost vezivanja VEGF-A i placentalnog faktora rasta (eng. *placental growth factor, PlGF*). sFlt je nađena i u preeklampsiji koja je udružena sa vaskularnim abnormalnostima bubrega i drugih organa (117). VEGFR-1 je takođe eksprimiran na materičnim glatkomišićnim ćelijama i na monocitima, ćelijama koje doprinose mnogim formama patološke angiogeneze ekspresijom VEGF-A i drugih citokina i faktora rasta. VEGF-A receptori, naročito VEGFR-1 i Neuropilin-1 (Nrp-1), eksprimirani su na nekim tumorskim ćelijama, sugerišući na postojanje autokrine veze koja može stimulisati rast tumorskih ćelija i migraciju. Smatra se da VEGFR-2 posreduje u većini angiogenih funkcija VEGF, uključujući i povećan ulazak kalcijuma i migraciju i proliferaciju endotelnih ćelija (117).

Okluzija centralne retinalne vene uzrokovana šećernom bolešću ili izlaganje nedonoščadi visokoj koncentraciji kiseonika može dovesti do razvoja intraokularne neovaskularizacije, što za krajni rezultat ima nastanak sljepila (190). U modelu retinalne nezrelosti povišen VEGF-A je uzrokovao lateralnu, a ne longitudinalnu orijentaciju ravni cijepanja endotelnih ćelija, dovodeći do formiranja uvećanih krvnih sudova (124).

1.9.6.1. Uloga VEGF u tumorskoj angiogenezi

Tumori putem lokalne neuravnotežene pretjerane ekspresije VEGF-A iniciraju nastanak novih krvnih sudova. Tumorska angiogeneza ima mnogo zajedničkog s angiogenezom pri zarastanju rana, pa se tumor na određenom nivou može smatrati "ranom koja nikad ne zacjeljuje" (154). Jedna od sličnosti su i visoki nivoi lokalne ekspresije VEGF-A, generacija karakterističnih krvnih sudova "majki" (MV) i generacija kapilara koje nastaju intraluminalnim pregrađivanjem MV (124). Razlika je u tome što, kako rane zarastaju, nivo VEGF-A opada (hipoksija se smanjuje usljed stvaranja novih krvnih sudova i oksigenacije tkiva), ali tumori nastavljaju da pretjerano i nekontrolisano ekspimiraju VEGF-A jer je ekspresija inicirana ne samo hipoksijom, već i onkogenima, gubitkom tumor-supresornih gena, hormonima, itd. (126).

Najmanje su tri faktora uzrok generiranju abnormalnih krvnih sudova karakterističnih za tumore i u procesu zarastanja rana, a to su totalna količina lokalno prisutnog VEGF-A, različite VEGF-A izoforme koje su ekspimirane i distribucija VEGF-A krvnim sudovima. U tumorima, kod zarastanja rana, kao i u Ad-VEGF-A164 modelu, normalni krvni sudovi se "kupaju" u visokim koncentracijama VEGF-A, a koncentracije prisutne lokalno su od kritične važnosti u određivanju karaktera novih krvnih sudova koji će se formirati. Intramuskularna injekcija kloniranih mioblasta koji sekretuju niske količine VEGF-A generiše nepermeabilne, relativno normalne kapilare, dok klonovi koji sekretuju veće količine VEGF-A indukuju tipične MV (191).

Ekspresija različitih EGF-A izoformi je važna u determinaciji neovaskularne strukture. Većina VEGF-A izoforma (humani izoformi 189, 165, 121) generisane su alternativnim cijepanjem jednog gena (192). Ove izoforme generalno pokazuju komparativne faktore rasta i aktivnosti koje povećavaju permeabilnost. Sve se vežu za većinu VEGF-A receptora (VEGFR-2/Flk i VEGFR-1/Flt), i sve osim VEGF-A120/1 se vežu za treći receptor, neuropilin. Međutim, nekoliko VEGF-A izoformi se značajno razlikuju u svojoj sposobnosti

vezivanja heparina, ćelijskih površina i matriksnih heparana. VEGF-A120/1 nedostaju heparan vezujuća mjesta i on difundira slobodno kroz tkiva (192). VEGF-A188/9 se jako veže za ćelijske i udružene sa matriksom heparane. VEGF-A164/5 ima umjerenu sposobnost vezivanja heparina, a samim tim i sposobnost difuzije. Ove razlike u sposobnosti vezivanja ćelija i matriksa različitih VEGF-A izoformi imaju važne posljedice na formiranje krvnih sudova. Abnormalni krvni sudovi indukovani sa VEGF-A120 su abnormalni zbog nemogućnosti ove izoforme da se veže za matriks i na taj način formira jako visoke VEGF-A gradijente koji su neophodni za razvoj normalnih krvnih sudova (124).

Nedavna studija je pokazala da se kapilari u razvoju sastoje od dva tipa endotelnih ćelija: nedjeljivih endotelnih ćelija ("tip" ćelije) koje se nalaze na vrhu vodeće fronte eksteniranih filopodija i izdanaka kao odgovora na VEGF-A gradijente i endotelnih "baznih" ćelija koje ih slijede iza, dijele se i pokazuju redukovane filopodije i razgranjavanje zbog signala putem Notch/delta 4 axis (193). Stoga, niski gradijenti koje je generisala VEGF-A120 redukuju polaritet "tip" ćelija i povećavaju njihov nivo proliferacije, formirajući velike krvne sudove sa redukovanim grananjem. Za razliku od ove izoforme, ekspresija samo VEGF-A 188 uzrokuje stvaranje guste dezorganizovane mreže krvnih sudova koje oblažu endotelne ćelije sa brojnim multidirekcionalnim filopodijama (124). VEGF-A120 se može smatrati hemoatraktantom koji dugo djeluje, uključenim u inicijaciju vaskularizacije, dok se duži izoformi VEGF-A smatraju kritičnim za uspostavljanje zamršene fine vaskularne arhitekture prisutne u normalnim tkivima. Iako djeluju preko istog receptora (VEGFR2) na površini ćelije, nesputane i matriks vezane VEGF obezbjeđuju različite signalizirajuće izlaze (194).

VEGF-A164/5, izoform koji tumori najviše ekspimiraju, ima osobine i 120/1 i 188/9 izoforma. Tumorske ćelije koje pretjerano ekspimiraju VEGF-A164 formiraju velike tumorske mase sa gustom i perifernom i centralnom vaskularnom mrežom, odnosno vaskulaturom koja je tipična za humane tumore kao i za vaskulaturu generisanu dejstvom Ad-VEGF-A164 unesenom u normalno tkivo miša (124).

Tortuoznost krvnih sudova je česta odlika MV, VM, opskrbljujućih arterija i drenirajućih vena. Tortuoznost je generalno pripisivana restrikciji izduživanja koja je nametnuta zaustavljanjem sudova na fiksiranim tačkama uz i niz krvni tok. Kao rezultat, rastući tumorski sudovi ne mogu se linearno širiti, već se uvijaju (124, 116).

In situ hibridizacijom je dokazano prisustvo VEGF mRNA u većini humanih tumora kao što su karcinomi pluća (195), štitne žlijezde (196), dojke (197, 198), probavnog trakta (199, 200), bubrega i mokraćne bešike (201), jajnika i grlića materice, tumorima zametnih ćelija, itd. (202, 203). Uočeno je postojanje korelacije između ekspresije mRNA i intenziteta vaskularizovanosti tumora i ustanovljeno je da ekspresija VEGF korelira sa intenzitetom vaskularizacije i stepenom malignosti (195, 196, 200, 203). Tumorska VEGF ekspresija je najveća u dijelovima uz nekrozu, ekspresija VEGF je indukovana hipoksijom (204). Iako su maligne ćelije glavni izvor VEGF u tumorima, u hipoksičnim dijelovima tumora naročito, ovoj ekspresiji doprinose i stromalne ćelije, kao i endotel krvnih sudova (204). Povišen nivo VEGF je otkriven u serumu kao i u samom tumoru pacijenata, a značajna povezanost je nađena i između nivoa VEGF u serumu i stadijuma bolesti i metastazama (205). U mnogim studijama nađena je povezanost ekspresije VEGF sa gustinom krvnih sudova (MVD, eng. *mean vascular density*) (206).

Iako se angiogeneza pojavljuje u svim tumorima tokom njihovog rasta, intenzitet angiogeneze može varirati među različitim vrstama tumora pa čak i kod različitih osoba koje boluju od iste vrste tumora. Eberhard je ispitivanjem proliferacije endotelnih ćelija na arhivalnim isječcima tumora pacijenata ustanovio da je angiogeneza prisutna u svim tumorima, ali sa karakterističnim i značajnim razlikama između različitih tipova tumora – najveći intenzitet angiogeneze je nađen kod glioblastoma, slijede (po redu jačine opadanja intenziteta) karcinom bubrega, karcinom kolona, karcinom dojke, karcinom pluća, karcinom prostate. Dodatno, intenzitet angiogeneze unutar svake pojedinačne vrste tumora se razlikovao – pojedini tipovi tumora su dobro vaskularizovani, a drugi slabo (207).

Visok stepen vaskularizacije je u mnogim istraživanjima korelirao sa lošom prognozom koja je uslijedila nakon primjene konvencionalne antikancerogene terapije, čineći pacijente sa veoma vaskularizovanim tumorima logičnim kandidatima za primjenu anti-VEGF terapije. Međutim, nizak stepen vaskularizacije ne znači nužno da će tumor biti više rezistentan nego neki bolje vaskularizovani tumori na primjenu anti-VEGF terapije (208). Naprotiv, relativno avaskularni tumori mogu biti više ovisni o postojećim krvnim sudovima nego neki bolje vaskularizovani tumori. Studije su pokazale da spororastući slabo vaskularizovani humani tumori na animalnim modelima odgovaraju jednako dobro na inhibitire angiogeneze kao i brzorastući visokovaskularizovani tumori (209).

1.9.6.1.1. Angiogeni mehanizmi u karcinomu prostate

Tokom angiogeneze endotelne ćelije se prebacuju iz stanja mirovanja u stanje brzog rasta indukovane difuzibilnim faktorima koje luče tumorske ćelije (210). VEGF je bio prvi izolovani selektivni faktor rasta (211).

Biopsije velikog broja humanih tumora su pokazale pojačanu ekspresiju VEGF mRNA u malignim ćelijama i VEGFR mRNA u okolnim endotelnim ćelijama. Prekidanje VEGF funkcije monoklonalnim anti-VEGF antitijelima potpuno suprimira angiogenezu indukovanu ćelijama karcinoma prostate i zaustavlja rast tumora u prevaskulnoj fazi rasta (144).

Imunohistohemijske studije (IHC) pokazale su ekspresiju VEGF u malignim ćelijama KP i njenu korelaciju sa gustom krvnih sudova (MVD). Slaba ekspresija VEGF i slabija vaskularizacija nađene su u normalnim ćelijama prostate, kao i kod benigne hiperplazije prostate (212).

IHC reakcija VEGF i flk-1 uočena je u svim benignim žlijezdama prostate, kod kojih je ekspresija ovih markera bila prisutno isključivo u bazalnom sloju ćelija, dok je u HG PIN-u ekspresija nađena u svim neoplastičnim sekretornim ćelijama, kao i u bazalnom sloju ćelija. Dalje, svi KP su pokazali ekspresiju oba markera, kao i tendenciju pojačavanja intenziteta njihove ekspresije sa povećanjem ćelijske dediferencijacije (213).

Pojačana VEGF ekspresija takođe je uočena i kod neuroendokrine diferencijacije u KP, predstavljajući loš prognostički parametar preživljavanja pacijenta (214).

Ovi podaci sugerišu da je rast KP praćen VEGF ekspresijom posljedica angiogene stimulacije. VEGF ekspresija je posredovana vanjskim faktorima poput hipoksije, faktora rasta i citokina. Regulacija VEGF se može vršiti na transkripcionom, posttranskripcionom i translacionom nivou (144). Citokini, faktori rasta i gonadotropini koji direktno ne stimulišu angiogenezu mogu modulirati angiogenezu mijenjajući VEGF ekspresiju u specifičnim tipovima ćelija i izazvati indirektne angiogene ili antiangiogene efekte. Faktori koji mogu potencirati produkciju VEGF uključuju fibroblastni faktor rasta 2 (FGF-2), fibroblastni faktor rasta 4 (FGF-4), tumor nekrotizirajući faktor (TNF) i mnogi drugi (144).

U recipročnoj regulaciji između VEGF i malog molekula NO (azotni oksid), NO pojačava produkciju VEGF koja opet sa svoje strane povećava nivo NO u pozitivnom feed-

back lancu između ova dva faktora. NO doprinosi uticaju VEGF na propustljivost krvnih sudova i posljedičnu vazodilataciju. Nađeni su povišeni nivoi NO sintetaze-2 i u PIN i u KP u poređenju sa normalnim tkivom prostate (215).

VEGF može takođe direktno stimulisati tumorske ćelije KP putem VEGFR-2 ovisnih autokrinih i parakrinih mehanizama, a autokrini stimulacija može koincidirati sa progresijom u maligni fenotip (216).

Dodatno, androgena deprivacija LNCaP prostatičnih karcinomskih ćelija *in vitro* vodi smanjenoj ekspresiji VEGF i na mRNA i na proteinskom nivou. Eksperimentalno na mišjem modelu sa LNCaP KP kastracija je uzrokovala rapidno smanjenje ekspresije mRNA i značajno redukovala tumorsku neovaskularizaciju. Androgena deprivacija je inhibirala i hipoksičnu indukciju VEGF mRNA (217).

Solubilni faktori i drugi prethodno navedeni stimuli su poznati induktori VEGF transkripcije, ali su tačni signalizirajući posrednici u ovom procesu slabije definisani. Imunohistohemijske i *in situ* analize uzoraka tkiva prostate identifikovale su jasan rani angiogeni prekidač ("*angiogenic switch*") potvrđen ekspresijom PECAM-1 (trombocitni endotelijalni ćelijski adhezioni molekul), HIF-1 α i VEGFR1 i regrutovanjem nove vaskulature u HG PIN. HIF-1 ekspresija lokalizovana u jedru prethodi ili korelira sa VEGF ekspresijom. Ekspresija VEGF-165 izoforma nije viđena u tkivu normalne prostate, HG PIN ili umjereno i dobro diferentovanom KP, ali je nađena u loše diferentovanim KP. Jasan kasni angiogeni prekidač ("*angiogenic switch*") bio je konzistentan sa smanjenom ekspresijom VEGFR1, povećanom ekspresijom VEGF2 i prelaskom bolje diferentovanog KP u loše diferentovan KP (218).

Metastazirajuće humane maligne ćelije KP pokazale su pojačanu VEGF produkciju i vaskularizaciju tumora u odnosu na maligne ćelije KP nižeg malignog potencijala (219). Rezultati pojedinih studija sugerišu da je biološki uticaj povišene ekspresije VEGF organ-specifičan, vodeći prema spekulaciji da VEGF ima ulogu u metastatskom širenju KP u određene organe, tzv. organ-tropizmu (220).

1.9.7. Tumorska angiogeneza indukovana VEGF-om kao meta antitumorske terapije

Posljednjih godina brojnim istraživanjima dokazano je da normalni krvni sudovi, kao i centralni nervni sistem, zahtijevaju VEGF-A za svoj opstanak i da su kompromitovani kad nivo cirkulišućeg VEGF-A padnu ispod kritičnog nivoa (221).

Inhibicija angiogeneze tokom maligne progresije usmjerene prema VEGF/VEGFR i FGF-2/FGFR2 sa odgovarajućim terapeutičima činila se dugo vremena najlogičnijim putem kontrolisanja metastatski proširene bolesti na nivou rasta primarnog tumora (222). Međutim, od inicijalnih nalaza da tumor može postati refrakteran na anti-VEGF terapiju, došlo se do saznanja da antiangiogena terapija može rezultirati povećanom malignom progresijom. Najnovije studije pokazale su da je dejstvom na VEGF put angiogeneze kod neuroendokrinog karcinoma pankreasa i glioblastoma kod miša došlo do povećane lokalne invazije i pojave udaljenih metastaza (223). Slično tome, u istraživanjima na modelima metastaza kojima je odstranjen orotopični primarni tumor, tretman sa snažnim antiangiogenim VEGFR/PDGFR inhibitorima doveo je do ubrzanog rasta metastaza karcinoma dojke i melanoma (224). VEGF je nedavno opisan kao negativan regulator funkcije pericita i sazrijevanja krvnih sudova (225) i njegova delecija u mijeloidnim ćelijama je dovela do povećanja funkcije pericita u oblaganju krvnih sudova i samim tim normalizacije tumorske vaskulature (226). U ovim studijama, ablacija VEGF je bila udružena s ubrzanom tumorigenezom i tumorskom progresijom, koja može obezbijediti barem djelimično, mehaničko objašnjenje nepoželjnih posljedica anti-VEGF terapije. Ovakva otkrića indikuju da antiangiogena terapija bilo direktnim dejstvom inhibitora na ciljane ćelije bilo dejstvom na molekule koje pokreću angiogeni prekidač (prebačaj) može imati različite ishode u toku maligne progresije (222).

Svojim brojnim istraživanjima Dvorak ukazuje da, najvjerojatnije, agensi koji djeluju na VEGF/VEGFR oštećuju samo podgrupu tumorskih krvnih sudova. Budući da tumori stvaraju najmanje šest različitih tipova krvnih sudova koji se međusobno, a i u odnosu na normalne krvne sudove, strukturalno, funkcionalno i organizaciono razlikuju, ovakva njihova podjela ima potencijalan klinički i terapijski značaj (117, 124, 126–129, 131–133, 154–155).

MV i GMP su prijemčivi za ovu vrstu terapije, ali krvni sudovi „kćerke“ poput kapilara i VM nisu, kao ni opskrbljujuće arterije i drenirajuće vene koje nastaju ne putem angiogeneze, već putem arteriogeneze i venogeneze. Za razliku od MV i GMP, ove posljednje podgrupe tumorskih krvnih sudova su stekle kompletan i često višeslojan pericitni i

glatkomišićni omotač i izgubile detektabilnu VEGFR-2 ekspresiju. Rezultat toga je njihov gubitak ovisnosti o egzogenom VEGF i njihova neograničena sposobnost preživljavanja u sredini sa niskom koncentracijom VEGF-A. Agensi koji djeluju na VEGF/VEGFR efektno su tretirali tumore kod miša u ranoj fazi rasta, ali su se pokazali manje uspješnim u tretiranju tumora u uznapređenoj fazi, a koji sadrže zrelije krvne sudove obložene glatkomišićnim ćelijama (116, 227). Slična situacija se može primijeniti i na ljudske tumore. Humani tumori nastaju tipično mjesecima i godina prije negoli se otkriju, što ima za posljedicu da MV i GMP čine veoma malu frakciju u totalnoj tumorskoj vaskulaturi. Opskrbljujuće arterije i drenirajuće vene čine se naročito značajnim metama, budući da one snabdijevaju i dreniraju sve manje krvne sudove unutar tumorske promjene (116).

Genomska i proteomska revolucija bi mogla omogućiti pronalazak meta na ovim krvnim sudovima na koje bi se moglo terapijski djelovati, naročito zato (kao što je i uspjeh anti-VEGF/VEGFR lijekova pokazao) što razlike između tumorskih i normalnih krvnih sudova ne treba da budu apsolutne da bi terapija bila efektivna (124).

1.10. ULOGA MATRIKS METALOPROTEINAZA U PROCESU TUMORSKE INVAZIJE I METASTAZIRANJA

1.10.1. Podjela matriks metaloproteinaza

Razgradnja ekstracelularnog matriksa je od ključnog značaja za brojne fiziološke procese kao što su npr. rast, razvoj i zarastanje. Složeni proteolitički procesi takođe igraju veoma značajnu ulogu u brojnim patološkim stanjima kao što su reumatoidni artritis, osteoartritis, autoimune bulozne dermatoze, itd. (228, 229). Razvoj tumorske invazije, proces metastaziranja i tumorske angiogeneze zahtijevaju kontrolisanu razgradnju ekstracelularnog matriksa što zahtijeva povećanu ekspresiju matriks metaloproteinaza (230).

Matriks metaloproteinaze (MMP, matriksini) čine porodicu 24 o cinku ovisnih endopeptida koji su sposobni razgraditi bilo koju komponentu ekstracelularnog matriksa (228, 230). Svi oni se proizvode kao latentni, u obliku proenzima, koji se moraju proteolitički obraditi da bi se aktivirali. U skladu sa specifičnošću djelovanja i na osnovu strukturnih osobina, matriks metaloproteinaze su podijeljene u sljedeće podgrupe: kolagenaze, stromelizine, želatinaze, membranski tip MMP (MT-MMP) i ostale MMP (231) (tabela 8).

Tabela 8. Vrste matriks metaloproteinaza

Matrilizini	Kolagenaze	Stromelizini	Želatinaze	Membranski tip MMP	Ostale MMP
Matrilizin (MMP-7)	Kolagenaza-1 MMP-1	Stromelizin-1 MMP-3	Želatinaza-A MMP-2	MT1-MMP MMP-14	MT4-MMP (MMP-17)
Matrilizin-2 (MMP-26)	Kolagenaza-2 MMP-8	Stromelizin-2 MMP-10	Želatinaza-B MMP-9	MT2-MMP MMP-15	MT6-MMP (MMP-25)
	Kolagenaza-3 MMP-13	Metaloelastaze MMP-12		MT3-MMP MMP-16	
		Stromelizin-3 MMP-11		MT5-MMP MMP-24	

Struktura i podjela humanih matriks metaloproteinaza prikazana je na slici 8.

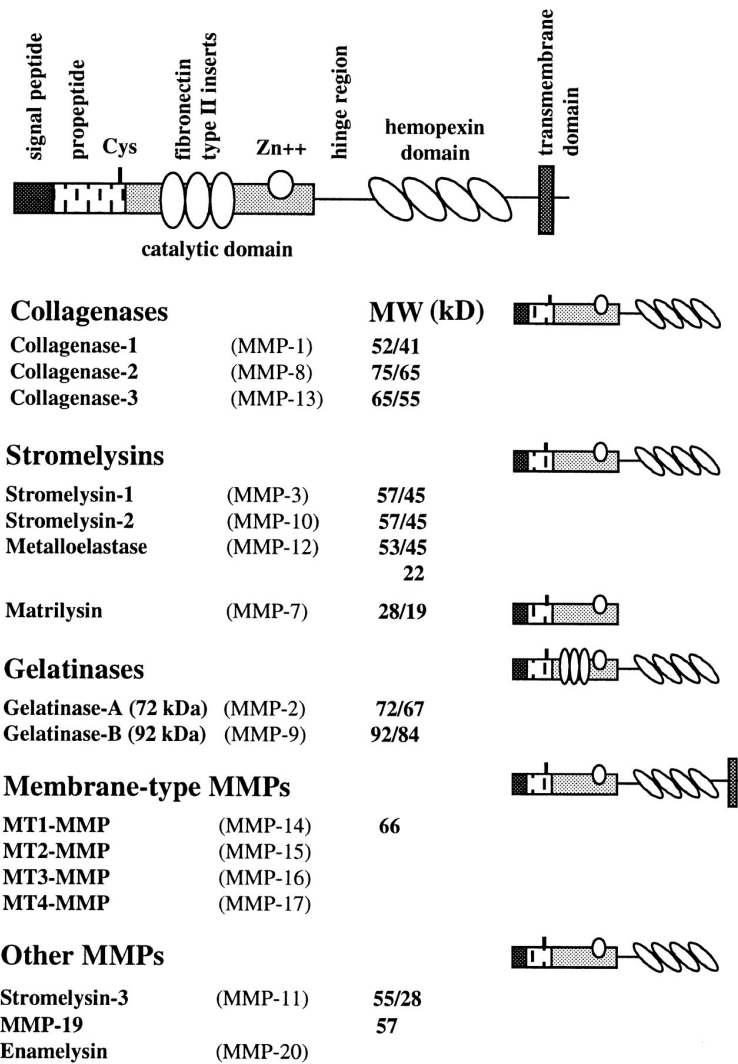
1. Matrilizini

Najjednostavnija strukturalna potklasa koja se sastoji od signalnog peptida, propeptidne domene i katalitičke domene sa mjestom za vezivanje cinka (231).

2. Kolagenaze

MMP-1, MMP-8 i MMP-13 su neutralne proteinaze koje su sposobne započeti degradaciju nativnog fibrilarnog kolagena tipa I, II, III i V i igraju ključnu ulogu u razgradnji kolagena u ekstracelularnom matriksu unutar različitih fizioloških i patoloških procesa.

Aktivnost matriks metaloproteinaza iz grupe kolagenaza rezultira cijepanjem kolagenih vlakana na određenim mjestima što dovodi do stvaranja 3/4 amino-terminalnih i 1/4 karboksi-terminalnih fragmenata koji podliježu intenzivnom procesu denaturacije na tjelesnoj temperaturi, a zatim bivaju dalje razgrađeni dejstvom drugih MMP kao što su npr. želatinaze. MMP-1 sintetišu različiti tipovi ćelija među kojima su fibroblast, keratinociti, hondrociti, monociti, makrofagi, hepatociti i ćelije različitih tipova tumora (228, 229). Sinteza MMP-8 je dokazana u hondrocitima, fibroblastima sinovije i endotelnim ćelijama. MMP-13 je prvobitno dobijena iz ćelija karcinoma dojke, a visok nivo pomenute kolagenaze se nalazi u stanjima koja zahtijevaju intenzivno remodeliranje kolagena ekstracelularnog matriksa (232, 233).



Slika 8. Struktura i podjela humanih matriks metaloproteinaza (Westermarck J., Kahari V.M. Regulation of matrixmetalloproteinase in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781–792) (238)

3. Stromelizini

Stromelizini imaju slične strukturalne domene kao kolagenaze, ali kao i matrilizini, imaju široku supstratnu specifičnost i degradiraju mnoge ECM proteine, uključujući proteoglikane, fibronektin i laminin (231). MMP-3 i MMP-10 su identifikovane u fibroblastima i transformisanim skvamoznim ćelijama dok se MMP-7 i MMP-12 nalaze u makrofagima (234, 235). Stromelizini su odgovorni za razgradnju bazalne membrane, kolagena tipa IV nidogena i fibronektina. MMP-7 i MMP-12 su odgovorne za razgradnju elastina (228, 229).

4. Želatinaze

MMP-2 i MMP-9 se sintetišu u keratinocitima, monocitima, alveolarnim makrofagima, polimorfonuklearnim neutrofilnim granulocitima i u ćelijama brojnih malignih tumora. MMP-2 i MMP-9 su odgovorne za razgradnju kolagena (želatina), tipove IV, V, VII i X nativnih kolagena, fibronektina, laminina i nidogena, a dokazano je da MMP-1 može razgraditi i nativni kolagen tipa I i pokrenuti proteolitičku aktivnost MMP-9 i MMP-13. Novija istraživanja su dokazala da MMP-9 vrši razgradnju kolagena tipa IV (236).

5. Membranski tip matriks metaloproteinaza

Prvi membranski tip matriks metaloproteinaza MMP-14 izolovan je iz ćelija invazivnog karcinoma pluća (237). MMP-14 i MMP-15 razgrađuju kolagen tipa I, II i III, želatin, fibronektin, laminin, vitronektin i agrekan (235).

6. Ostale matriks metaloproteinaze

MMP-11 je izolovana iz primarnog karcinoma dojke, direktno ne učestvuje u razgradnji bilo koje komponente ekstracelularnog matriksa ali vrši razgradnju serin proteinaze inhibitora α 1 proteinaze i α 1 antitripsina (228, 229). MMP-19 indirektno utiče na aktivaciju MMP-1, MMP-3, MMP-10 i MMP-11. Dosadašnjim istraživanjima nije potvrđeno da MMP-19 direktno utiče na razgradnju nativnih komponenti ekstracelularnog matriksa (235). MMP-20 je dokazana u odontoblastima i dosadašnja istraživanja upućuju na to da je odgovorna za remodeliranje zubne cakline (228).

1.10.2. Regulacija aktivnosti matriks metaloproteinaza

Aktivnost matriks metaloproteinaza regulisana je na tri nivoa:

1. genska regulacija;
2. aktivacija latentnih zimogena;
3. inhibicija tkivnim inhibitorima MMP (238).

1.10.2.1. Regulacija ekspresije gena odgovornih za aktivnost MMP-a

Ekspresija većine MMP-a u tkivima je obično niska, a potreba za remodeliranjem eksreacelularnog matriksa predstavlja najznačajniji stimulus za povećanu aktivnost MMP-a

(230, 238). Ekspresija MMP-a gena primarno je regulisana na transkripcijskom nivou koju indukuju faktori transkripcije od kojih su najpoznatiji predstavnici AP-1 porodica (eng. *activator protein 1*) faktora transkripcije i ETS porodica proteina (porodica transkripcionih faktora ETS – domene) (239). Proteini iz porodice ETS se direktno ne vezuju za DNA već pokazuju osobinu vezivanja za druge faktore transkripcije sa kojima formiraju kompleks i postavljaju se u ulogu koaktivatora (239). Aktivacija i vezivanje AP-1 i ETS za DNA je regulisana procesom fosforilacije koja je posredovana protein kinazama za mitogenu aktivnost – MAPKs (eng. *mitogen activated protein kinases*). Citokini, faktori rasta, hormoni, interakcija ćelija–ćelija i ćelija–matriks aktiviraju membranske receptore sa kojih se signal zatim prenosi na protein kinaze za mitogenu aktivnost koje, kao što je prethodno rečeno, dovode do aktivacije faktora transkripcije iz porodice AP-1 i ETS proteina (240). Dejstvo protein kinaza za mitogenu aktivnost – MAPK obuhvata pokretanje složene kaskade proteina koje precizno bivaju aktivirane u određenim uslovima, što daje mogućnost precizne regulacije genske ekspresije u procesu tumorske invazije (241).

1.10.2.2. Aktivacija latentnih matriks metaloproteinaza

Drugi nivo regulacije dejstva MMP je aktivacija proenzima (zimogena). Većina matriks metaloproteinaza se izlučuje u formi inaktivnog prekursora (zimogena) koji se aktivira u ekstracelularnom prostoru. Izuzetak su MMP-11 i MMP-14, koje aktivira furinu slična proteaza smještena u Goldđijevom aparatu. Molekula MMP ostaje u inaktivnoj formi zahvaljujući interakciji između cisteina u proregionu Zn^{++} jona na aktivnoj strani. Rascjep ove veze rezultira aktivacijom proenzima. Latentne zimogene u aktivnu formu mogu aktivirati tripsin 2, katepsin G, B, I plazmin/plazminogen sistem, elastaze polimorfonukleara, a MMP-e posjeduju i sposobnost međusobne aktivacije (231, 238).

1.10.2.3. Inhibitori matriks metaloproteinaza

Treći nivo kontrole aktivnosti matriks metaloproteinaza vrši se u ekstracelularnom prostoru posredstvom tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP, eng. *tissue inhibitors of metalloproteinases*). Različiti fiziološki agensi mogu blokirati dejstvo MMP, a koji se nalaze u različitim tjelesnim tekućinama i tkivima. U literaturi su opisana četiri člana TIMP označena kao TIMP 1–4 od kojih se TIMP 1, 2 i 4 nalaze u solubilnoj formi, dok je TIMP-3 vezan za komponente ekstracelularnog matriksa. Pored inhibitorne uloge na MMP-e inhibitori MMP-a stimulišu rast različitih vrsta ćelija, neki od njih imaju i antiangiogeno

dejstvo. Balans između MMP-a i njihovih inhibitora je ključna tačka u kontroli proteolitičkih procesa i minimalna promjena balansa može dovesti do izražene proteolize (231, 238).

1.10.2.4. Uloga matriks metaloproteinaza u procesu angiogeneze

Od inicijalnog prepoznavanja proangiogene uloge MMP u angiogenezi, tokom prethodnih godina akumulirala su se brojna saznanja koja govore o dubokoj kompleksnosti uloge MMP u formiranju novih krvnih sudova (231).

1.10.2.5. Proangiogena uloga MMP

Uloga MMP u angiogenezi je mnogo kompleksnija nego što je to jednostavna degradacija ekstracelularnog matriksa (ECM) radi olakšavanja migracije endotelnih ćelija. Različite MMP su potrebne za oslobađanje sekvestrovanih proangiogenih faktora vezanih za ECM, za obrađivanje faktora rasta i receptora, uključujući integrine i adhezione receptore, te za generisanje endogenih antiangiogenih komponenti (231).

Iako je degradacija komponenti ECM koja otvara put za migraciju endotelnih ćelija esencijalna uloga MMP u angiogenezi, MMP doprinose na različite načine i u pro- i u anti-angiogenim procesima. U normalnoj fiziološkoj angiogenezi postoji veoma kontrolisana ravnoteža između angiogenih faktora, endogenih inhibitora angiogeneze i MMP inhibitora (231).

MMP imaju multiple efekte na same endotelne ćelije, one su neophodne za migraciju endotelnih ćelija i formiranje sudova (tuba) MMP, ali ne i aktivator plazminogena/plazmin sistem, uključeni su u migraciju endotelnih ćelija i invaziju fibrinskih barijere (MT1-MMP pokazuju najjaču fibrinolitičku aktivnost) (231). MMP-7 pojačava proliferaciju endotelnih ćelija, povećava endotelnu ekspresiju MMP-1 i MMP-2 i indukuje angiogenezu *in vivo*. Egzogena MMP-9 povećava rast endotelnih ćelija *in vitro*. MMP cijepaju ektodomenu vaskularnog E-cadherin-a i time raskidaju međućelijske adhezije. MT1-MMP procesiraju alfa-v-integrine u dva disulfid vezana fragmenta koji zadržavaju vezanje RGD-liganda, a ovo procesiranje povećava signalizaciju integrina putem fokalne adhezione kinaze doprinoseći povećanoj adheziji i ćelijskoj migraciji na vitronektinu. MMP proteolitički cijepa kolagen tipa IV eksponiranjem kriptičnih $\alpha\beta3$ vezujućih mjesta koji potiču angiogenezu. Otkrivanje ovih skrivenih mjesta nađeno je unutar endotelne bazalne membrane u angiogenim i tumorskim krvnim sudovima. MMP-2 vezivanje putem njegove PEX domene za $\alpha\beta3$ na endotelnim

ćelijama je neophodno za angiogenezu. Solubilna PEX domena inhibira MMP-2 vezivanje za $\alpha\text{v}\beta 3$ i blokira angiogenezu (231).

MMP uključene u proces angiogeneze mogu poticati iz infiltrirajućih inflamatornih ćelija, tumorskih ćelija, kao i iz samih endotelnih ćelija. Angiogeni faktori mogu indukovati ekspresiju MMP u endotelnim ćelijama, npr. bFGF indukuje ekspresiju MMP-9, VEGF ekspresiju MMP-1, TNF α pojačava ekspresiju MT1-MMP koji onda aktivira MMP-2, trombin indukuje aktivaciju MMP-2 (231).

MMP mogu poticati i iz stromalnih ćelija. TNF α indukuje MMP-9 transkripciju (putem NF-kappaB i AP-1 mjesta) i njegovu sekreciju iz vaskularnih glatkomišićnih ćelija, dok on indukuje MMP-1 i MMP-3 ekspresiju u fibroblastima putem stabilizacije mRNA (231).

Dok angiogeni faktori mogu indukovati ekspresiju MMP u endotelnim i stromalnim ćelijama, MMP mogu povećavati bioaktivnost/dostupnost angiogenih faktora. Degradacija ECM oslobađa ECM / sekvestrovane iz bazalne membrane angiogene faktore, VEGF, bFGF i TGF β (231).

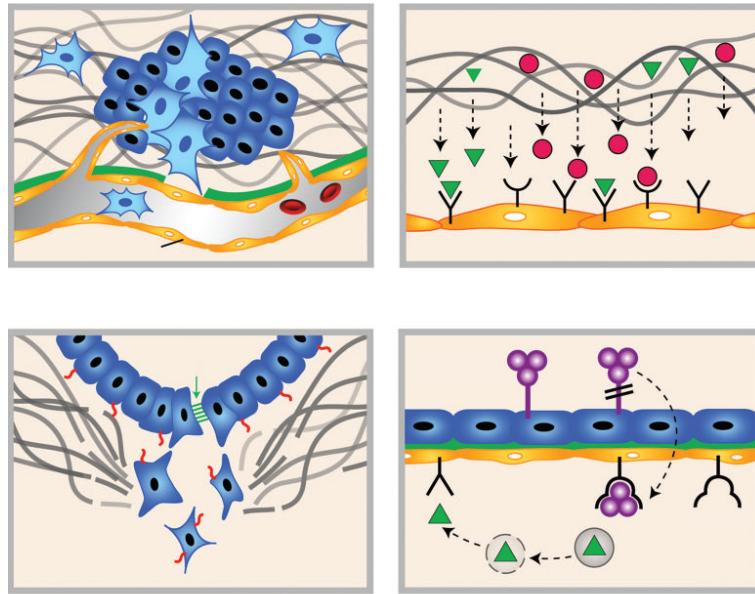
MMP-2, MMP-3 i MMP-7 razlažu proteoglikan dekorin iz ECM oslobađanjem TGF 1, dok MMP-2 i MMP-9 cijepaju skriveni peptid da bi aktivirali TGF β 1 (231).

1.10.2.5.1. Proangiogena uloga MMP u tumorskoj angiogenezi

Iako se patološka vaskularizacija često smatra neregulisanim procesom formiranja novih krvnih sudova, ona je čvrsto regulisana kombinacijom međusobno povezanih faktora sličnih onima koji upravljaju fiziološkom angiogenezom. MMP su među glavnim faktorima upletenim i u malignu angiogenezu i vaskulogenezu (222) (slika 9).

Povećanje ekspresije MMP uobičajeno se smatra kontributivnim faktorom za indukciju tumorske angiogeneze. Međutim, enzimatska aktivnost aktiviranih MMP je ta koja u stvari doprinosi ishodu njihovih angiogenih funkcija. Zimogena aktivacija i enzimatska aktivnost se smatraju faktorima koji ograničavaju funkcionisanje MMP9, uključujući MMP indukovanu i MMP posredovanu angiogenezu. Ali, većina *in vivo* modela angiogeneze su suviše komplikovani da bi dali odgovore na pitanje *kako* se MMP aktiviraju i, u najboljem slučaju, kako MMP zimogeni *mog*u biti aktivirani (222).

Proteoliza ekstracelularnog matriksa (ECM) Oslobađanje angiogenih faktora



Regulacija ćelijske adhezije i migracije Procesuiranje faktora rasta i citokina

Slika 9. Multiple funkcije matriksnih metaloproteinaza (MMPs) u progresiji karcinoma. MMP degradiraju komponente ekstracelularnog matriksa (ECM), pobuđujući angiogenezu, invaziju tumorskih ćelija i proces metastaziranja. MMP moduliraju interakcije između tumorskih ćelija cijepanjem E-cadherina i između tumorskih ćelija i ECM obrađivanjem integrina koji takođe pojačavaju invazivnost tumorskih ćelija. MMP takođe obrađuju i aktiviraju signalizirajuće molekule, uključujući faktore rasta i citokine, čineći ove faktore pristupačnijim ciljanim ćelijama (target cells) bilo njihovim oslobađanjem iz ECM (npr. VEGF i bFGF, inhibitorno kompleksi poput TGF-), bilo njihovim otkidanjem sa površine ćelija (pr. Heparin-vezujuć epidermalni faktor rasta) (242) (Preuzeto iz: Roy R., Yang J., Moses M.A. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5287-5297.)

Tumorske ćelije predstavljaju moćan izvor MMP u tumoru koji raste. Iako se u početku smatralo da su MMP koje potiču iz tumorskih ćelija te koje upravljaju i određuju proces metastaziranja i angiogeneze, novi podaci govore da je uloga MMP koje luče tumorske ćelije mnogo više ograničena nego što se mislilo i da se uglavnom svodi na migraciju tumorskih ćelija i invaziju (222). Povećanje lokalne koncentracije MMP u tumorima u kojima počinje neoangiogeneza aktiviranjem prekidača angiogeneze (eng. *angiogenic switch*) usko je povezana sa inflamacijom pokrenutom proinflamatornim citokinima i faktorima koje proizvode tumor i/ili stromalne ćelije. Monociti i makrofagi i granulociti (eozinofilni,

bazofilni/mastociti i neutrofilni granulociti) smatraju se glavnim izvorima MMP. Makrofagi mogu proizvoditi brojne MMP sa snažnom sposobnošću razlaganja matriksa, uključujući MMP-1, 2, 3, 7, 9, 10, 12, 13, 14, od kojih je dokazano da je MMP-9 direktno uključena u indukciju tumorske angiogeneze (222). Nedavna istraživanja pokazuju da, ovisno o stadijumu diferencijacije ili tkivne lokalizacije, monociti/MF mogu eksprimirati karakteristično različit spektar MMP i njihovih inhibitora (243). Za razliku od granulocita koji odmah na zahtjev mogu otpustiti svoje MMP, MF traže specifičnu stimulaciju za pojačanje produkcije svojih MMP. Interakcija sa aktiviranim endotelnim ćelijama i adhezija za komponente ECM smatraju se glavnim stimulusima koji koordinirano pojačavaju produkciju MMP u regrutovanim monocitima/MF. Histološki, neutrofilni granulociti se nalaze predominantno u središnjim dijelovima tumora, dok se MF koncentrišu duž periferije tumora demarkirajući tumor/stroma granicu (222).

Postoji kompleksna komunikacija između strome i tumora i tumorske ćelije mogu indukovati stromalne fibroblaste da eksprimiraju MMP, uključujući i MMP-9 (222). Izuzev MMP-2, endotelne ćelije su relativno deficijentne u MMP-9 ekspresiji u stanju mirovanja, ali tokom grananja i formiranja tubula sa lumenima, aktivirane endotelne ćelije pojačano eksprimiraju MMP-1, MMP-9 i 14 (222).

Inicijalno otkrivanje MMP u solidnim tumorima pacijenata i mišjim modelima bilo je fokusirano na tumorske ćelije. Povećani nivoi ekspresije mnogih MMP, obično duž granice tumor/stroma, demonstrirani su primjenom različitih metoda poput imunohistohemije i *in situ* hibridizacije. Spoznavanjem značaja tumorske angiogeneze, detaljnije analize su lokalizovale MMP neposredno uz krvne sudove, i postalo je jasno da stromalne ćelije, inflamatorne ćelije i perivaskularne ćelije eksprimiraju MMP češće i više od tumorskih ćelija (222).

U tumorskoj angiogenezi, pokazalo se da su MMP-2 i MMP-9 neophodne za otpočinjanje procesa angiogeneze, tj. da služe kao angiogeni prekidač (eng. *angiogenic switch*) kad se tumori nalaze u još u prekanceroznoj formi, odnosno kad prvi put postanu vaskularizovani. Koristeći model tumorogeneze pankreatičnih ostrvaca na mišu, ustanovljeno je da je MMP-9 ekspresija neophodna za angiogeni prekidač, dok je MMP-2 doprinijela tumorskom rastu (244). VEGF je eksprimiran konstitutivno u pankreatičnim ostrvcima i dodatak egzogenih MMP-9 izoliranim ostrvcima uzrokovalo je dvostruko povišenje VEGF oslobođenog u medijum, pa je zaključeno da ekspresija MMP-9 u angiogenim ostrvcima

rezultuje oslobađanjem VEGF iz ECM koji je zatim odgovoran za indukciju angiogenog fenotipa. U krvnim sudovima unutar tumorskih ćelija humanog neuroblastoma implantiranog u mišji model kojem nedostaje MMP-9, uočen je smanjen broj pericita, što sugerira da je MMP-9 prijeko potreban za regrutovanje pericita u formiranju novih sudova (245).

MMP su generalno obilno prisutne u skoro svim humanim malignim tumorima. Visoke ekspresije pojedinih MMP, koje oslobađa tumor ili stromalni fibroblasti, ili infiltrujuće zapaljenske ćelije, u korelaciji su sa invazijom tumora, njegovim metastatskim potencijalom i lošom prognozom (222). Tumorske ćelije mogu indukovati stromalne ćelije da ekspimiraju MMP putem parakrine sekrecije citokina i faktora rasta (246). Tumorska ekspresija MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13 i MT1-MMP naročito je u visokoj korelaciji sa invazivnim kapacitetom, metastazama i/ili rizikom od rekurencije tumora (222).

Povećana ekspresija MMP-1 je dokazana u tumorima pluća, kolorektalnim tumorima, skvamoznim karcinomima glave i vrata, a potvrđeno je da korelira sa lošom prognozom (247). MMP-3 identifikovana je u fibroblastima strome u više različitih tipova tumora, ali se nalazi i u tumorskim ćelijama na granici prema zdravom tkivu (248).

MMP-2 i MMP-9 su visoko ekspimirane u brojnim malignim tumorima. Visoka ekspresija MMP-2 i MMP-9 je dokazana u gigantocelularnim karcinomima kostiju, karcinomima pluća, non-Hodgkin limfomima kao i u kolorektalnom karcinomu (222). Imunohistohemijskom analizom je potvrđena visoka ekspresija MMP-2 u tumorskim ćelijama karcinoma dojke, kolona i želuca, za razliku od koje je *in situ* hibridizacija pokazala visok nivo MMP-2 mRNA u stromalnoj komponenti tumora (249).

MMP-9 pokazuje visoku ekspresiju uglavnom u tumorskim ćelijama, mada je identifikovana i u tkivnim makrofagima i neutrofilnim granulocitima (250, 251).

Tumorske ćelije takođe stimulišu angiogenezu direktno ekspresijom i sekrecijom angiogenih faktora rasta, npr. gliomi, pojačano ekspimiraju bFGF, vretenaste ćelije Kaposi sarkoma bFGF (indukuju ga TNF alfa, IL-1, interferon-gama) (231). Ovarijalni karcinomi koji ekspimiraju MMP-2 i MMP-9, uz dodatne egzogene aktivne MMP-9 i MMP-2, indukuje oslobađanje VEGF, sugerirajući da se MMP koji ekspimiraju tumorske ćelije ponašaju na autokrini način da bi indukovali sekreciju angiogenih faktora (231).

MMP su uključene i u druge aspekte tumorske angiogeneze, a to je tzv. vaskularna mimikrija, gdje se tumorske ćelije ponašaju kao endotelne ćelije, eksprimirajući gene endotelnih ćelija i formirajući kanaliće koji sprovode tečnost unutar tumora. MMP-2, MT1-MMP i laminin-5-gama-2, koji su pojačano eksprimirani u agresivnim melanomima, odgovorni su za ovu sposobnost tumorskih ćelija da podliježu vaskularnoj mimikriji (252).

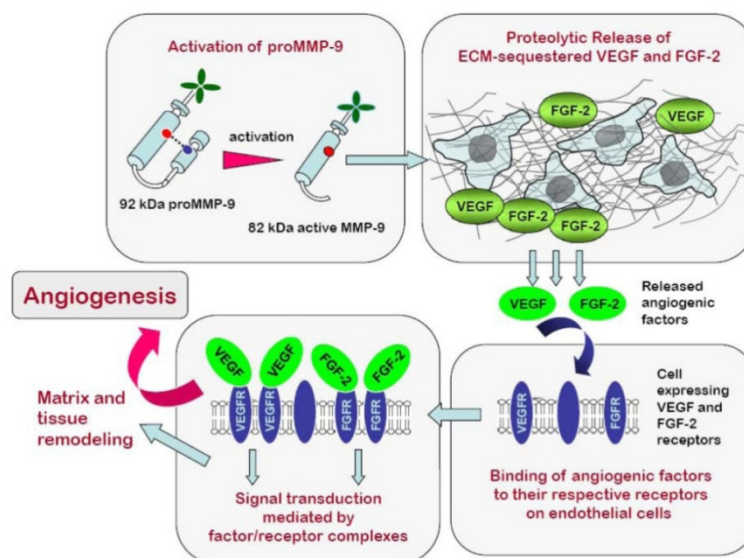
1.10.2.5.1.1. Uloga MMP-9 u tumorskoj angiogenezi

MMP-9 je jedan od najmoćnijih proangiogenih MMP. Smatra se da direktan doprinos MMP-9 angiogenezi i vaskulogenezi obuhvata katalitičku enzimsku aktivnost koje dovodi ili do cijepanja ECM komponenti poput nativnih i dentaurisanih kolagena, prerada raznih citokina i hemokina, ili oslobađanje angiogenih faktora rasta kao što je VEGF i FGF-2 (222) (slika 10).

Iako su MMP-9 snažno povezane sa angiogenezom, njihove direktne katalitičke reakcije *in vivo* i regulacija njihovih aktivnosti tokom angiogeneze ostaju najvećim dijelom nedefinisane, čak pravi *in vivo* supstrati MMP-9 proangiogene aktivnosti još nisu demonstrirani (222).

Opšteprihvaćeno je da u momentu početka angiogeneze aktiviranjem prekidača angiogeneze, MMP-9 najvećim dijelom proizvode inflamatorni monociti (253). Međutim, PMNG mogu služiti kao neposredan i glavni izvor MMP-9 u preangiogenom tkivu (254).

Hanahan je nedavno demonstrirao usku povezanost prisustva neutrofila koji eksprimiraju MMP-9 sa pojavom angiogenog prekidača u tumoru koji se razvija (255). Takođe je dokazano da su humani neutrofilni proMMP-9 potencijalno angiogeni u niskim pa čak i subnanomolarnim nivoima (256), budući da se ovi proMMP-9 u humanim neutrofilima otpuštaju u jedinstvenoj formi bez TIMP (eng. *TIMP-free form*), što se razlikuje od TIMP-1-proMMP-9 kompleksa koji se proizvode u svim ostalim ćelijskim tipovima, uključujući MF, B-limfocite i tumorske ćelije (257). Moćne angiogene karakteristike neutrofilnog MMP-9 mogu se pripisati njegovoj formi bez TIMP i takođe njegovoj neposrednoj iskoristljivosti u relativno visokim koncentracijama prisutnim u granulama oslobođenim iz stimuliranih neutrofila (222).



Slika 10. MMP-9 je moćan proangiogeni faktor koji djeluje putem oslobađanja VEGF sekvestrovanog od strane ekstraćelijskog matriksa, ECM. MMP-9 se proizvodi kao zimogen i zahtijeva aktivaciju za svoju angiogenu aktivaciju. Nakon aktivacije, MMP-9 enzim je sposoban da otpuste pro-angiogene faktore poput VEGF i FGF-2, koji su sekvestrovani u ECM. Bioraspoložive VEGF i FGF-2 se vežu za endotelne ćelije ekspimirajući odgovarajuće receptore za angiogene faktore. Složene formacije između angiogenih faktora i njihovih receptora tirozin-kainaze pokreću signalnu transdukciju, koja zauzvrat pokreće angiogeni prekidač, reorganizaciju endotelnih ćelija i matriksno i tkivno remodeliranje. (Deryugina E.I., Quigley J.P.. Pleiotropic Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Angiogenesis: Contrasting, Overlapping and Compensatory Functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1): 103–120) (222)

Brojne studije pokazuju da tumorska neovaskularizacija, osim neophodnih lokalnih celularnih izvora za izgradnju novih krvnih sudova, ovisi i o cirkulirajućim ćelijama progenitorima, najvećim dijelom porijekla iz koštane srži, uključujući HPC, EPC i pericitne progenitorne ćelije (PPC), mobilizirane u cirkulaciju citokinima i faktorima rasta poput VEGF (258). Ove cirkulirajuće progenitorne ćelije regrutuje primarni tumor putem kompleksnog sistema hemokina aktiviranih od strane MMP-9 (259).

Tumorska vaskulogeneza zahtijeva ekspresiju MMP-9 za efikasnu integraciju regrutovanih ćelija u tumorsku vaskulaturu (222).

1.10.2.5.1.2. Povezanost VEGF i MMP

VEGF je jedan od najznačajnijih proangiogenih faktora pohranjenih unutar ECM i oslobođenih putem MMP proteolize (260). MMP-9 je najsnažnija MMP funkcionalno vezana za tumorsku angiogenezu putem VEGF oslobađajućih mehanizama. Funkcionalna povezanost

između MMP-9 koje su na preangiogeno mjesto dopremile inflamatorne ćelije i oslobađanje VEGF dokazani su na nekoliko genetskih mišjih modela progresije karcinoma. Inhibicija MMP-9 dovela je do redukcije bioraspoloživosti VEGF i odgovarajuće inhibicije tumorske angiogeneze. Slično, hemijska represija produkcije MMP-9 u modelu humanog karcinoma prostate rezultirala je reduciranim nivoima bioraspoložive VEGF i inhibicijom tumorske angiogeneze (261). Svega je nekoliko studija pokazalo da MMP-9 koje luče tumorske ćelije mogu takođe povećati oslobađanje VEGF (npr. model karcinoma jajnika) (262).

1.10.2.5.1.3. Uloga matriks metaloproteinaza u karcinomu prostate

Nivoi MMP i TIMP koje sekretuju epitelne ćelije normalnog, benignog tkiva i tkiva KP upoređivane su u raznim studijama (144). Ove analize u kontrolisanom medijumu su pokazale da tkivo i normalne i maligne prostate raste u kulturi u kojoj se nalaze i aktivne i latentne forme i MMP-2 i MMP-9. Normalne juvenilne i adultne prostate sekretuju značajne količine slobodnih TIMP, ali one su bile izrazito redukovani ili nedetektibilni u kontrolisanom medijumu neoplastičnih tkiva (263).

Imunohistohemijska analiza fetalnog i normalnog tkiva prostate BPH i KP pokazala je da su TIMP-1 i TIMP-2 pokazali veću ekspresiju u stromi KP koji je imao *Gleason* skor 5, dok ova dva inhibitora nisu bila eksprimirana u KP sa većim GS (8–10). TIMP-1 i TIMP-2 ekspresija je bila visoka u lokalizovanim KP, nešto niža u KP sa probojem kapsule i niska ili negativna u isječcima sa pozitivnim hirurškim marginama i nodalnim metastazama (264). U kulturama malignih ćelija primarnog i sekundarnog KP sa primarnim stromalnim ćelijama nađen je povišen nivo pro-MMP-9 i smanjen nivo TIMP-1 i TIMP-2. Povećana ekspresija pro-MMP-9 je bila u malignim epitelnim ćelijama KP, dok su TIMP bile smanjene u stromalnim ćelijama. Indukcija pro-MMP-9 i redukcija TIMP ekspresije nije zahtijevala ćelijsko-ćelijski kontakt i posredovana je solubilnim faktorima prisutnim u kontrolisanom medijumu efektornih ćelija (265).

U studiji Nagakawa, MMP-9 i MMP-2 učestvovala su u razgradnji bazalne membrane, predominacija obje MMP se nalazila na periferiji KP na granici tumor/stroma, dok je nivo ekspresije E-cadherina najviše bio izražen u centralnim dijelovima tumora. Smanjena ekspresija E-cadherin-a uz pojačanu ekspresiju MMP-2 i MMP-9 je bila u značajnoj korelaciji sa *Gleason* skorom KP. Takođe, bez obzira na nivo serumskog PSA i GS, odnos između ekspresije MMP i E-cadherina na invazivnim rubovima KP pokazao je najjaču povezanost sa

lokalno invazivnim i/ili metastaski proširenim KP (266). Pojedina istraživanja pokazala su da je ekspresija i MMP-2 i TGF- β direktno povezana sa angiogenim i metastaskim fenotipom u agresivnoj PC-3ML ćelijskoj populaciji (267). Na inhibiciju fenotipa PC-3ML utiče IL-10, za koji je dokazano da indukuje TIMP-1 (eng. *tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) (268). Tkivne inhibitore MMP sekretuju epitelne ćelije i one su dijelom stimulisane IL-6 i IL-10 (269). Veza između TGF- β 1 i IL-10 je utvrđena u studiji u kojoj su ćelije "transficirane" sa TGF- β 1 imale veći metastatski rast, a tumori pokazali slabu reakciju na IL-10 (270).

1.10.2.6. Antiangiogena uloga MMP

Postojanje fine ravnoteže u regulaciji pleiotropnih funkcija MMP potkrijepljeno je činjenicom da svaka MMP koja pokazuje jasne proangiogene aktivnosti može isto tako antiangiogeno djelovati. Uz proteolitičko oslobađanje matriks vezanih proangiogenih faktora, MMP mogu generisati i brojne antiangiogene molekule. Različiti tipovi ćelija odgovorni za isporuku i proizvodnju određenih MMP u preangiogenoj fazi mogu pokazati potpuno drugačiji način djelovanja u slučaju tumorske angiogeneze. (222).

Za mnoge od MMP ostaje nejasno tačno koji će efekat, pozitivni ili negativni, postići i ovi efekti mogu varirati u odnosu na različite vrste tumora, kao i različite stadijume bolesti.

MMP-2, MMP-7, MMP-9 i MMP-12 imaju sposobnost da hidroliziraju plazminogen radi formiranja potentnog inhibitora angiogeneze, angiostatina. Angiostatin inhibira migraciju endotelnih ćelija, proliferaciju i formiranje cjevčica (tuba) novih krvnih sudova, i indukuje apoptozu. Sniženi nivoi MMP-9 rezultovali su sniženim nivoima angiostatina i povećanim tumorskim rastom i angiogenezom, i obrnuto, pojačana ekspresija MMP-9 povećala je nivo angiostatina i smanjila tumorski rast i angiogenezu *in vivo* (231).

MMP mogu generisati i druge inhibitore angiogeneze iz komponenti ECM, C-terminalne nekolagene-1-domene nekoliko lanaca kolagena, koji generisani putem proteolitičkog cijepanja pokazuju antiangiogenu aktivnost. Njih čine endostatin, tumstatin, arestin, kanstatin. Endostatine mogu osloboditi MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-20, kao i nekoliko katepsina, koji se zatim vežu za proteoglikane na površini ćelije, VEGFR-2, i integrine α 5 β 1 da bi inhibirali migraciju endotelnih ćelija indukovanu dejstvom VEGF i bFGF i na taj način indukovali apoptozu. Dodatno, endostatin blokira aktivaciju i aktivnost MMP-2, MMP-9, MMP-13, MT1-MMP (231).

Pokazalo se da antiangiogeni trombospondini (TSP) regulišu MMP ekspresiju i aktivnost. U niskim koncentracijama TSP-1 indukuje MMP-9 sekreciju, formiranje cjevčica, invazivnu aktivnost endotelnih ćelija, dok više koncentracije indukuju veće nivoe MMP-9, ali redukuju formiranje cjevčica i invaziju (231).

Antiangiogene aktivnosti MMP uključuju i moduliranje signalizirajućih receptora na površini ćelije otcjepljivanjem domene za vezivanje liganda FGFR-1, a uPAR i generisanjem inhibitora angiogeneze iz ECM komponenata, plazminogena i PEX domene MMP-2 (231).

1.10.3. Matriks metaloproteinaze kao meta antitumorske terapije

Budući da su MMP snažni pokretači i kontributori u procesu angiogenog prebačaja, dugo se smatralo da blokiranje MMP na mjestu tumorskog rasta može značajno inhibirati angiogenezu i takođe razbiti već stvorenu mrežu krvnih sudova. Inicijalna obećavajuća istraživanja na mišjim modelima nisu bila potvrđena u kliničkim istraživanjima sa opštim ili djelimično selektivnim inhibitorima MMP (271). Da bi se objasnio neuspjeh primjene ovih terapeutika kod pacijenata, navedeno je nekoliko razloga, uključujući i to da su svi pacijenti u istraživanjima bili u uznapredovalom i metastatski prožirenom stadijumu bolesti, kao relativan nedostatak MMP specifičnosti inhibitora (222).

Međutim, pleiotropna priroda funkcija MMP na nivou njihovog porijekla (stromalne ćelije/tumorske ćelije), njihovi celularni ili ekstracelularni ciljevi djelovanja (endotelne ćelije/tumorske ćelije/ECM), njihova biohemija (npr. kompenzatorno povećanje ekspresije), alternativni putevi aktivacije i procesuiranja multiplih supstrata, mogu ključno predodrediti posljedice inhibicije funkcija MMP koje nisu jednostrane (222). Stoga, obustavljanje influksa makrofaga koji nose MMP-9 kod CCLR-2 deficijentnog, K14-HPV/E2 miša, genetski sklonog razvoju cervikalnog karcinoma je bilo udruženo sa kompenzatornom infiltracijom sa MMP-9 pozitivnim neutrofilnim granulocitima rastućeg tumora (272). Ovi podaci sugerišu da, ako se suprimiraju proangiogeni MF koji podstiču rast tumora, onda se regrutuju neutrofilni granulociti koji onda luče visokoangiogene proMMP-9 oslobođene od TIMP i pokreću alternativni mehanizam koji podstiče tumorsku angiogenezu i progresiju tumora (256, 272, 273).

Adaptivna sposobnost tumora koja vodi rezistenciji na antiangiogenu terapiju usmjerenu na inhibiciju osovine faktor rasta / receptor nedavno je dokazano da uključuje

pojačanu regulaciju alternativnih proangiogenih signalizirajućih puteva, regrutovanje vaskularnih i hematopoietskih progenitora iz koštane srži i stabilizaciju novoformiranih tumorskih krvnih sudova pericitnim oblaganjem sudova (255).

Imajući u vidu prethodno pomenute rezultate istraživanja o angiogenim funkcijama i karakteristikama neutrofilnih MMP-9, inhibicija osovine VEGF/VEGFR podstaknute MMP-9 koje proizvode MF može indukovati kompenzatornu osovinu FGF/FGFR podstaknutu neutrofilnim MMP-9, tako da bi alternativni terapijski cilj mogle predstavljati MMP-9 koje luče inflamatorne ćelije, naročito neutrofilni granulociti, a ne MMP-9 koji luče tumorske ćelije (kao što se pretpostavljalo u inicijalnim kliničkim istraživanjima) (222).

Androgena ablacija hirurškom kastracijom (orhiektomijom), primjena antiandrogena (hemijska kastracija) ili kombinacija ovih metoda predstavlja najčešći klinički protokol u tretmanu pacijenata oboljelih od KP u uznapredovaloj fazi. Proliferacija prostatičnih tumorskih ćelija najčešće je inicijalno androgen ovisna, ali čest razvoj androgen-refrakternog KP u kasnom stadijumu dovodi do neefektivne primjene androgensupresivne terapije. Paradoksnu povećanje nivoa MMP-9 koje je pratilo androgenu deprivaciju dovelo je do nastanka agresivnog fenotipa KP kod pacijenata (274).

Budući da prostatične karcinomske ćelije pokazuju veoma spor rast, hemoterapija ima malu korist i korisna je samo kao sistemska palijativna terapija. Zato atraktivnu terapijsku opciju čini uništavanje metastatskog rasta KP sa lokalno usmjerenim, netoksičnim lijekovima koji inhibiraju uspostavljanje metastatskih kolonija tumorskih ćelija. Netoksični inhibitori MMP koji smanjuju invaziju tumorskih ćelija i neoangiogenezu potencijalni su lijekovi izbora. Iako su brojne laboratorije uključene u razvoj ovakvih terapijskih agensa KP, svega nekoliko ih je u kliničkim istraživanjima (eng. *clinical trials*) i mnogi nisu uspjeli zbog ozbiljnih neželjenih efekata (275).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu veliki porast oboljelih od adenokarcinoma prostate, a s obzirom na specifično biološko ponašanje ovog karcinoma, trenutno je u upotrebi široka paleta kliničkih i patoloških obilježja sa ciljem procjenjivanja faktora rizika i stvaranja adekvatnih terapijskih strategija za pacijente sa lokalno ograničenim i metastatski neproširenim KP, uključujući i starost pacijenta, primarni stadijum tumora, predoperativni PSA i GS. Klinički stadijum tumora i GS važni su prediktivni faktori za lokalnu kontrolu tumora, kao i za procjenu rekurencije KP, odnosno ukupnog preživljavanja. Međutim, nedostaju molekularni prognostički faktori koji bi mogli dalje stratifikovati pacijente oboljele od KP u visoko, srednje i nisko rizične kategorije za diseminaciju bolesti i preživljavanje. Integracija molekularnih profila sa konvencionalnim patološkim tehnikama određivanja stadijuma mogu obezbijediti prognostičke podatke koji bi omogućili kliničaru da tačno predvidi rizik od diseminacije bolesti za svakog pacijenta pojedinačno i shodno tome definiše odgovarajuće terapijske protokole koji bi najbolje odgovarali tom pacijentu.

U ovoj studiji uz gustinu krvnih sudova (MVD) kao parametra stepena angiogeneze, biće procijenjen i stepen ekspresije faktora koji indukuju angiogenezu (VEGF i MMP-9) u odnosu na patohistološki gradus tumora (*Gleason score*, GS) i stepen proširenosti bolesti (stadijum bolesti). Cilj ovih analiza jeste procjena značaja angiogeneze u biološkom ponašanju tumora, progresiji oboljenja i pojavi metastaza.

Identifikacija angiogenih faktora, kao što su VEGF i MMP-9, uključenih u razvoj karcinoma prostate, mogla bi voditi razvoju dijagnostičkih ili terapijskih strategija baziranih na antiangiogenezi.

2.1. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

- Postoji povezanost između predoperativnih vrijednosti MVD u tumorskom tkivu na preparatima iglene biopsije prostate i vrijednosti MVD u tumorskom tkivu hirurškog resektata nakon učinjene radikalne prostatektomije, odnosno predoperativne i postoperativne vrijednosti MVD se značajno ne razlikuju.

- Postoji povezanost stepena ekspresije VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu, odnosno povećanje ekspresije VEGF prati povećanje ekspresije MMP-9 u tumorskom tkivu.
- Postoji razlika u vrijednostima MVD i ekspresije VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu u zavisnosti od patohistoloških karakteristika tumora (patohistološki gradus i *Gleason score*), odnosno, vrijednosti MVD i ekspresija VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu su veće što je veći patohistološki gradus i *Gleason score* karcinoma prostate.
- Postoji razlika u vrijednostima MVD i ekspresije VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu u zavisnosti od stadijuma proširenosti bolesti, odnosno, vrijednosti MVD i ekspresija VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu su veće kod ekstraprostatične proširenosti tumora u odnosu na lokalno ograničen tumor.
- U slučaju da se ne dokaže povezanost ili razlika, prihvataju se alternativne hipoteze koje glase da nema povezanosti ili nema razlike za praćene parametre.

2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Utvrditi povezanost predoperativnih vrijednosti gustine sitnih krvnih sudova (MVD) u tumorskom tkivu na preparatima iglene biopsije prostate i vrijednostima MVD u tumorskom tkivu hirurškog resektata nakon učinjene radikalne prostatektomije.
- Utvrditi povezanost stepena ekspresije VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu.
- Utvrditi postojanje razlike u vrijednostima MVD i ekspresije VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu u zavisnosti od patohistoloških karakteristika tumora (*Gleason score*).
- Utvrditi postojanje razlike u vrijednostima MVD i ekspresije VEGF i MM-9 u tumorskom tkivu u zavisnosti od stadijuma proširenosti bolesti.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

Istraživanjem je obuhvaćen 101 neselektovan pacijent sa karcinomom prostate kod kojih se bolest manifestovala povišenim serumskim PSA. Svim pacijentima je tokom 2005. i 2006. godine na Klinici za urologiju Kliničkog centra Vojvodine urađena transrektalna ultrazvučno vođena iglena biopsija prostate sa iglom promjera 18 (eng. *18-gauge automated biopsy gun*), sextant metodom (35–37). Nakon postavljene dijagnoze karcinoma prostate na iglenim biopsijama slijedila je radikalna retropubična prostatektomija sa bilateralnom pelvičnom limfadenektomijom kod 61 pacijenta koji su procijenjeni operabilnim.

Kriterijumi za uključivanje/isključivanje iz studije bili su:

- Svi tumori su primarno dijagnostikovani bez prethodno primijenjene hormonalne terapije i nijedan od pacijenata nije imao klinički podatak o metastatski proširenoj bolesti prije operacije;
- U studiju su uključeni samo pacijenti sa dijagnostikovanim klasičnim acinarnim karcinomom prostate, dok drugi histološki podtipovi adenokarcinoma nisu obuhvaćeni istraživanjem;
- Od 101 pacijenta, pregledano je 606 bioptičkih uzoraka dobijenih iglenom biopsijom, od kojih je karcinom prisutan prosječno u dva uzorka (u rasponu 1–6 po pacijentu), te su na kraju analizirana 303 isječka iglene biopsije koja su sadržavala najmanje dva mikroskopska polja neoplastičnih žljezdanih formacija na uveličanju x400 radi određivanja MVD, ali su se tokom obrade i dubljeg sječenja bioptičkog materijala izgubili i ti fokusi (104 isječka) tako da je konačno analizirano 199 isječaka iglenih biopsija;
- Od 61 pacijenta pregledano je 366 isječaka tkiva prostate nakon učinjene prostatektomije u kojima je karcinom bio prisutan u prosjeku na dva isječka (1–5), ali su za imunohistohemijsku analizu uzeti isječci sa najmanje dva mikroskopska polja neoplastičnih žljezdanih formacija na uveličanju x400 radi određivanja MVD, kao i imunohistohemijske analize (CD31, VEGF i MMP-9), odnosno ukupno 61 isječak.

Istraživanje je provedeno kao retrospektivna studija, a obuhvatilo je arhivirani biopsijski materijal (parafinske kalupe) Instituta za patologiju i histologiju Kliničkog centra u Novom Sadu.

U istraživanju se nisu koristili nikakvi klinički podaci o pacijentima, izuzev onih koji su se već nalazili na uputnici za patohistološki pregled tkiva prostate.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Klasične patohistološke metode

Od parafinskih kalupa uzoraka tumorskog tkiva adenokarcinoma prostate pacijenata ispitivane grupe, deparafinirani tkivni isječci debljine 4-5 μm bojeni su metodom hematoksilin-eozin (HE).

Patohistološkom analizom HE preparata definisani su:

- histološki tip adenokarcinoma prostate;
- stepen histološke diferentovanosti;
- širina invazije;
- postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.

Na osnovu HE preparata odabran je jedan reprezentativan uzorak graničnog dijela tumorskog tkiva i tkiva prostate svih obrađenih slučajeva za imunohistohemijska ispitivanja.

3.2.1.1. Određivanje histološkog tipa adenokarcinoma prostate

Histološki tip adenokarcinoma prostate određen je na osnovu klasifikacije tumora prostate, predložene od strane Svjetske zdravstvene organizacije (18). Istraživanje je vršeno samo na karcinomima prostate dijagnostikovanim kao acinarni (klasični, konvencionalni) adenokarcinomi.

3.2.1.1.1. Određivanje histološke diferentovanosti adenokarcinoma prostate

Histološki gradus je određen prema kriterijumima *Gleason gradus* sistema i prema klasifikaciji SZO (18, 53, 55).

3.2.1.2. Određivanje stadijuma bolesti

Stadijum tumorske bolesti karcinoma prostate utvrđen je postoperativno na uzorcima tkiva dobijenim radikalnom prostatektomijom i obostranom pelvičnom limfadenektomijom, a

na osnovu procjene tumora, limfnih čvorova (nodus) i metastaza – TNM sistema Američkog udruženog odbora za karcinome (AJCC – *American Joint Committee on Cancer, 7th edition*) (18). Ekstraprostatična ekstenzija (EPE) je dijagnostikovana ako su se tumorske ćelije nalazile u periprostatičnom mekom tkivu ili ako je viđeno da tumorske ćelije probijaju fibromuskularnu kapsulu i nalaze se izvan nje na drugoj strani. Sjemene kesice su procjenjivane na junkcionom dijelu gdje ulaze u prostatu.

Limfni čvorovi, parailijakalni obostrano i opturatorni obostrano, definisani su kao regionalni limfni čvorovi. Svi limfni čvorovi su evaluirani da bi se utvrdilo prisustvo metastatskih depozita.

Stadijumi karcinoma prostate u studiji su određeni korištenjem patološkog (p) pTNM kriterijuma zasnovanog na stadijumima AJCC (18), a pacijenti su podijeljeni u dvije grupe u odnosu na lokalno ograničenu tumorsku promjenu (stadijum pT2), to jest lokalno infiltrativnu (stadijum pT3) i/ili metastatski proširenu bolest (pN1): stadijum **T2** (pT 1-2 N0 M0) i stadijum **T3** (pT 3-4 N0 M0 i pT 3-4 N1 M0).

3.2.1.3. Određivanje vrijednosti predoperativnog serumskog PSA

Pacijentima je predoperativno određen nivo prostatičnog specifičnog antigena (PSA) izražen u ng/ml. Pacijenti su s obzirom na stepen rizika podijeljeni u tri grupe na osnovu vrijednosti sPSA: grupa pacijenata sa rizikom niskog stepena (vrijednosti sPSA < 10ng/ml), pacijenti sa rizikom srednjeg stepena (vrijednost sPSA 10-20 ng/ml) i grupa pacijenta sa rizikom visokog stepena (sPSA > 20 ng/ml) (78, 276).

3.2.2. Imunohistohemijske metode

Nakon pregleda uzoraka tkiva RP 61 pacijenta, parafinski kalup sa najvišim GS i najvećim tumorskim volumenom izabran je za imunohistohemijsku analizu. Histološki rezovi debljine 3–4 µm selektovanih reprezentativnih parafinskih blokova pripremljeni su i deparafinisani rutinskom metodom. Isječki su tretirani citratnim puferom zagrijavanjem u mikrotalasnoj pećnici, 20 minuta radi demaskiranja antigena. Nakon blokade endogene peroksidaze vodonik-peroksidom (H₂O₂) u metanolu, isječki su ispirani u *Tris buffered saline* (TBS) rastvoru, Ph 7,6, nakon čega su primijenjena sljedeća antitijela u odgovarajućem koncentracijama (tabela 9).

Tabela 9. Vrste korišćenih antitijela, stepen razblaženja i vrijeme inkubacije

Antitijelo	Proizvođač	Razblaženje	Vrijeme inkubacije
CD31 (Clone JC/7oA)	DAKO	1:40	30 min.
VEGF (Clone VG1)	DAKO	1:100	30 min.
MMP-9 (Lyophilised monoclonal NCL- MMP9, Clone 2C3)	Novocastra Laboratories Ltd	1:50	30 min.

Imunohistohemijska identifikacija ispitivanih proteina vršena je primjenom *EnVision* tehnike. Kao hromogeni supstrat korišćen je 3,3'-diaminobenzin (DAB). Kontrastiranje je vršeno hematoksilinom. Normalno tkivo prostate u okolini tumora služilo je kao unutrašnja pozitivna kontrola. Za svako antitijelo, kao negativna kontrola, služili su uzorci tkiva kod kojih je prilikom tretmana, umjesto primarnog antitijela, korišćen pufer, ali su druge faze imunohistohemijske procedure sprovedene.

Imunohistohemijske analize urađene su ručno u Zavodu za patologiju Kliničkog centra Banja Luka. Primijenjeni su originalni DAKO i Novocastra reagensi. Analiza IHH reakcija je vršena svjetlosno-mikroskopski, kvalitativnom, semikvantitativnom i za pojedina antitijela kvantitativnom analizom.

3.2.2.1. Imunohistohemijska analiza tumorske angiogeneze – analiza ekspresije CD 31

Za procjenu stepena angiogeneze korišćena je imunohistohemijska identifikacija endotelnih ćelija krvnih sudova pomoću primarnog antitijela CD31. Analiza je vršena kvantitativno, brojanjem krvnih sudova na invazivnom rubu tumorskog tkiva u zoni sa najizraženijom vaskularizacijom. Imunohistohemijski su analizirani uzorci iglenih biopsija i hirurških resektata koji sadrže najmanje dva mikroskopska polja sa neoplastičnim žlijezdama klasičnog adenokarcinoma prostate na mikroskopskom uvećanju od 400X. Krvni sudovi vizualizovani CD31 markerom brojani su na cijeloj površini odabranih uzoraka metodom po Weidneru (277). Na isječcima tumora dobijenim nakon prostatektomije odabrana su tri

tumorska područja sa maksimalnim brojem sitnih krvnih sudova ("hot spots") na malom uvećanju (X40 i X100), a zatim su krvni sudovi brojani na velikom uvećanju (X400, mikroskop Olympus BH-2, Olympus Optical Co. Ltd., Japan), gde je jedno polje ekvivalentno $0,79 \text{ mm}^2 / \times 400$, ukupno $2,37 \text{ mm}^2$, na svim relevantnim područjima – u tri područja definisana kao "hot spots" sa najlošijim *Gleason* gradusom. Na uzorcima tumora dobijenim iglenom biopsijom prostate MVD određivana je na svim reprezentativnim područjima na velikom uvećanju ($\times 400$) (91). Zabilježena je najveća vrijednost MVD dobijena nakon brojanja na uzorcima tumora istog pacijenta i na isječcima iglene biopsije i na isječcima dobijenim nakon radikalne prostatektomije. Nije korišćena prosječna vrijednost MVD na tri određena područja. Svaka odvojena endotelna ćelija, zatim grupa endotelnih ćelija sa ili bez lumena smatrana je krvnim sudom, dok su pojedinačni imunoreaktivni makrofagi i plazma ćelije isključeni na osnovu njihovog morfološkog izgleda. Prisustvo lumena ili eritrocita nije smatrano neophodnim za identifikaciju novostvorenih krvnih sudova. Određivanje MVD je urađeno bez znanja bilo kojeg kliničkopatološkog podatka. Nakon dobijenih podataka o broju krvnih sudova za svakog pacijenta ponaosob izvršilo se upoređivanje broja sitnih krvnih sudova u tkivu tumora sa njegovim *Gleason* gradusom/zbirom radi utvrđivanja njihove povezanosti. Zatim je izračunata vrijednost prosječnog broja krvnih sudova koja je iznosila 48,34, odnosno 48 ("cut off" vrijednost – ukupan zbir broja krvnih sudova – MVD podijeljen sa brojem uzoraka) u odnosu na koju se svim slučajevima dodijelila ocjena: *nizak stepen angiogeneze* (pacijenti sa brojem krvnih sudova u tumorskom tkivu ispod prosečnog broja) ili *visok stepen angiogeneze* (pacijenti sa brojem krvnih sudova u tumorskom tkivu iznad prosječnog broja) (91, 278).

Na osnovu broja krvnih sudova pacijenti su podijeljeni u dvije grupe:

- pacijenti sa ≤ 48 krvna suda na polju velikog uvećanja vidnog polja ($\times 400$);
- pacijenti sa > 48 krvnih sudova na polju velikog uvećanja vidnog polja ($\times 400$).

Kvantitativno određivanje vrijednosti gustine krvnih sudova MVD (eng. *micro vessel density*) na ovaj način je u skladu sa preporukama koje je iznio Weidner N.; prvo je primijenjen na karcinomima dojke, a kasnije i na drugim tipovima solidnih tumora (277, 278).

3.2.2.2. Imunohistochemijska analiza ekspresije VEGF

Vrijednosti ekspresije VEGF određene su na osnovu jasne citoplazmatske smeđe prebojenosti hromogenom supstancom. Semikvantitativna analiza ekspresije VEGF je izvršena prema procentu pozitivnih tumorskih ćelija i intenzitetu obojenosti citoplazme.

Ekspresija VEGF je prikazana kroz sljedeći skor:

- skor 1 = 0–20% tumorskih ćelija koje pokazuju slabu pozitivnost;
- skor 2 = 21–50% tumorskih ćelija koje pokazuju umjerenu do jaku pozitivnost;
- skor 3 = >50% tumorskih ćelija koje pokazuju umjerenu do jaku pozitivnost.

Kao pozitivna unutrašnja kontrola koristila je obojena citoplazma okolnih neuroendokrinih ćelija, kao i citoplazma polimorfonuklearnih granulocita. Kao pozitivna spoljašnja kontrola korišćen je endometrijum u ranoj proliferativnoj i kasnoj sekretornoj fazi menstrualnog ciklusa (279).

3.2.2.3. Imunohistochemijska analiza ekspresije MMP-9

Vrijednost ekspresije MMP-9 određena je semikvantitativno određivanjem procenta obojenih tumorskih ćelija (0 – <1%, 1 – 1 do 10%, 2 – 10 do 50%, 3 – >50%) i intenziteta prebojenosti citoplazme tumorskih ćelija (0 – negativno, 1 – slab, 2 – umjeren, 3 – izražen intenzitet). Sabiranjem dobijenih vrijednosti procenta i intenziteta obojenosti tumorskih ćelija odrediće se imunohistochemijski skor i to: *skor 0 – nema reakcije u ćelijama, skor 1–2 (nizak stepen ekspresije), skor 3–4 (umjeren stepen ekspresije) i skor 5–6 (visok stepen ekspresije)* (280, 281).

Vrijednosti ekspresije MMP-9 određivane su na osnovu jasne citoplazmatske smeđe prebojenosti hromogenim supstratom. Semikvantitativna analiza ekspresije MMP-9 izvršena je prema procentu pozitivnih tumorskih ćelija i intenzitetu obojenosti citoplazme.

Ekspresija MMP-9 prikazana je kroz sljedeći zbir:

- e) procenta pozitivnih ćelija:
- 0 = 0% pozitivnih ćelija;
 - 1 = 1–20% pozitivnih ćelija;
 - 2 = 20–50% pozitivnih ćelija;
 - 3 => 50% pozitivnih ćelija;

- f) intenziteta bojenja:
- 0 = negativno bojenje;
 - 1 = slabo pozitivan;
 - 2 = umjereno pozitivan;
 - 3 = jako pozitivan.

Sabiranjem dobijenih vrijednosti procenta i intenziteta obojenosti tumorskih ćelija određen je imunohistohemijski skor, i to: *skor 0 – nema reakcije u ćelijama, skor 1–2 (nizak stepen ekspresije), skor 3–4 (umjeren stepen ekspresije) i skor 5–6 (visok stepen ekspresije)* (280, 281).

Kao vanjska pozitivna kontrola za MMP-9 korišćeni su isječki tkiva placente i pozitivna reakcija u sincicio i citotrofoblastima. Kao negativna kontrola korišćeni su isječki tkiva kod kojih je u toku imunohistohemijskog tretmana umjesto primarnog antitijela upotrijebljen pufer TBS, dok je u svim drugim koracima procedura pripreme isječaka bila ista (280).

3.2.3. Statistička obrada podataka

Primarni cilj ove studije bila je mogućnost predviđanja stadijuma karcinoma prostate, odnosno da li je tumor prostate lokalizovan, lokalno neinvazivan (pT2), ili lokalno proširen (kapsularna penetracija, invazija seminalnih kesica, pozitivne hirurške margine, pT3), to jest metastatski proširen (metastaze u regionalnim limfnim čvorovima, pN1) putem određivanja gustine krvnih sudova i stepena ekspresije angiogenih faktora VEGF i MMP-9 u tumoru.

Varijable koje su se koristile u istraživanju su:

- nezavisne varijable: stadijum proširenosti bolesti, patohistološki gradus tumora, gustina krvnih sudova (MVD), ekspresija VEGF i MMP-9, predoperativni nivo serumskog PSA;
- nezavisne demografske varijable: starost.

Kvantitativna obilježja opisivana su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, minimumom i maksimumom svih vrijednosti, vrijednosti testa Kolmogorov–Smirnov, a kvalitativna frekvencijama, odnosno, procentima. I jedna i druga obilježja prikazana su tabelarno i grafički.

Analiza razlika zasnivala se na odgovarajućim parametarskim i neparametarskim statističkim testovima, odnosno univarijantnim i multivarijantnim statističkim metodama. Od multivarijantnih postupaka primijenjena je MANOVA i diskriminativna analiza, a od univarijantnih postupaka ANOVA, t-test, Roy-test, Pearsonov koeficijent kontingencije (χ) i koeficijent multiple korelacije (R).

Statistički značajna razlika je definisana na nivou 0,05, a razlika od vrlo visokog statističkog značaja na nivou od 0,001. U slučaju kada je $0,10 > p > 0,05$, prihvatila se radna hipoteza sa povećanim rizikom zaključivanja.

4. REZULTATI

Ispitivanu populaciju pacijenata oboljelih od adenokarcinoma prostate čini 61 pacijent, kojima je nakon dijagnostikovanog KP na osnovu uzoraka iglene biopsije prostate (IB), urađena i radikalna prostatektomija (RP). Kod ovih pacijenata određena je životna dob, predoperativni serumski PSA, *Gleason* zbir (GS) i na IB i RP, gustina krvnih sudova (MVD) upotrebom CD31) i na IB i RP, stadijum bolesti (pTNM), kao i vrijednosti VEGF i MMP-9 određene na postoperativnom materijalu.

4.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA ISPITIVANE GRUPE

Istraživanje je sprovedeno na 61 pacijentu operisanom od karcinoma prostate. Životna dob bolesnika se kretala od 52 do 78 godina. Prosječna životna dob bolesnika iznosila je 66,38 (SD \pm 5, 28) godina. Najveća učestalost oboljenja u odnosu na dob bila je u sedmoj dekadi života.

4.2. ANATOMSKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PROSTATE U ISPITIVANOJ POPULACIJI

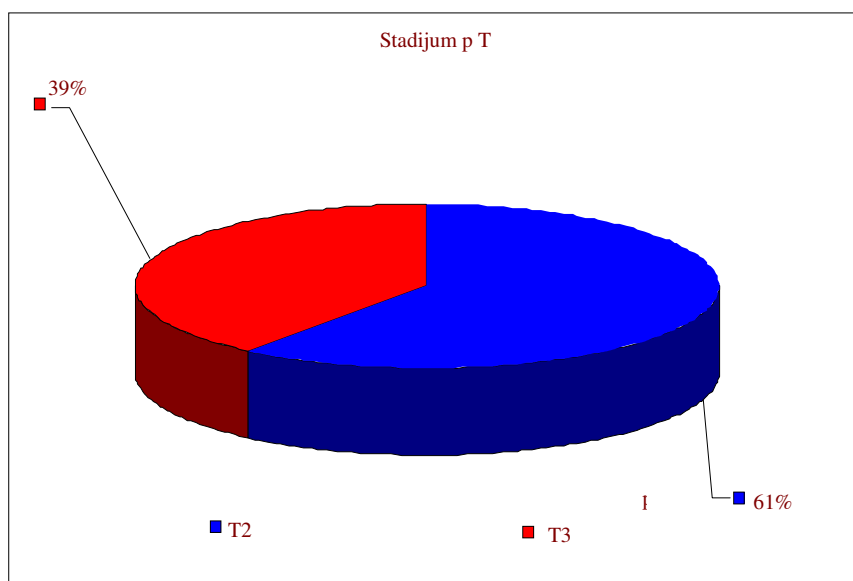
U odnosu na stadijum bolesti, pacijenti sa karcinomom prostate su u ispitivanoj populaciji podijeljeni u dvije grupe: u stadijumu pT2 dijagnostikovano je 37 pacijenata (60,66%), a u stadijumu pT3 dijagnostikovana su 24 pacijenta (39,34%) u kojem je infiltracija KP u sjemene kesice bila prisutna kod 19 pacijenata (31,14%) (tabela 10).

Podjela ispitivane grupe u odnosu na stadijume bolesti KP u momentu operacije prikazana je na grafikonu 1.

U ispitivanoj populaciji metastaze u regionalnim limfnim čvorovima bile su prisutne kod šest pacijenata (9,84%) koji su bili u pT3 stadijumu i kod kojih je karcinom prostate bio loše diferentovan (G3), sa *Gleason* zbirom koji je iznosio sedam (dva pacijenta), osam (tri pacijenta) i devet (jedan pacijent). Kod ostalih 55 pacijenata (90,16%), metastaze u limfnim čvorovima nisu bile prisutne.

Tabela 10. Kliničko-patološke karakteristike adenokarcinoma prostate u ispitivanoj populaciji.

Kliničko-patološke karakteristike	Broj pacijenata (n = 61)	%
T stadijum		
T2	37	60,66
T3	24	39,34
N stadijum		
N0	55	90,16
N1	6	9,84
<i>Gleason skor (GS)</i>		
< 7	21	34,43
≥ 7	40	65,57
PSA		
< 10	22	36,06
10-20	28	45,90
> 20	11	18,03

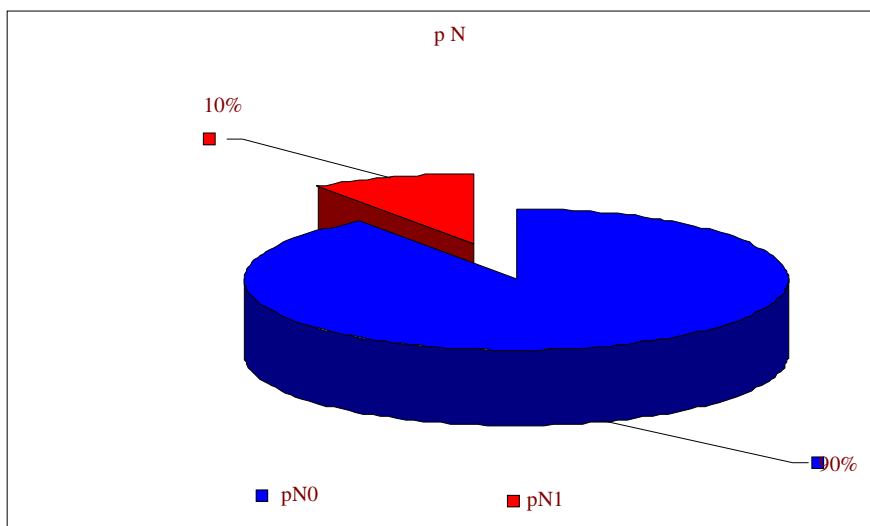


Grafikon 1. Stadijumi karcinoma prostate ispitivane populacije

Podjela ispitivane grupe u odnosu na prisustvo metastaza KP u regionalnim limfnim čvorovima u momentu operacije prikazana je na grafikonu 2.

Karcinomi prostate su histološki gradirani određivanjem *Gleason* skora (*Gleason score*, GS), gdje su podijeljeni na dve grupe. Vrijednosti *Gleason* skora određivane su i na predoperativnim uzorcima iglenih biopsija prostate, kao i na uzorcima prostate dobijenim nakon radikalne prostatektomije. U jednoj grupi vrijednost GS < 7 imao je 21 pacijent, od

kojih je jedan pacijent imao GS 4, a ostali pacijenti GS 6 (slika 11). U drugoj grupi $GS \geq 7$ bilo je 40 pacijenata od kojih je 31 pacijent imao GS 7, sedam pacijenata GS 8, a dva pacijenta GS 9 (slika 12). Nijedan pacijent nije imao GS 10. Ovo su bili rezultati dobijeni nakon evaluacije tumorskog tkiva dobijenog nakon radikalne prostatektomije (RP).

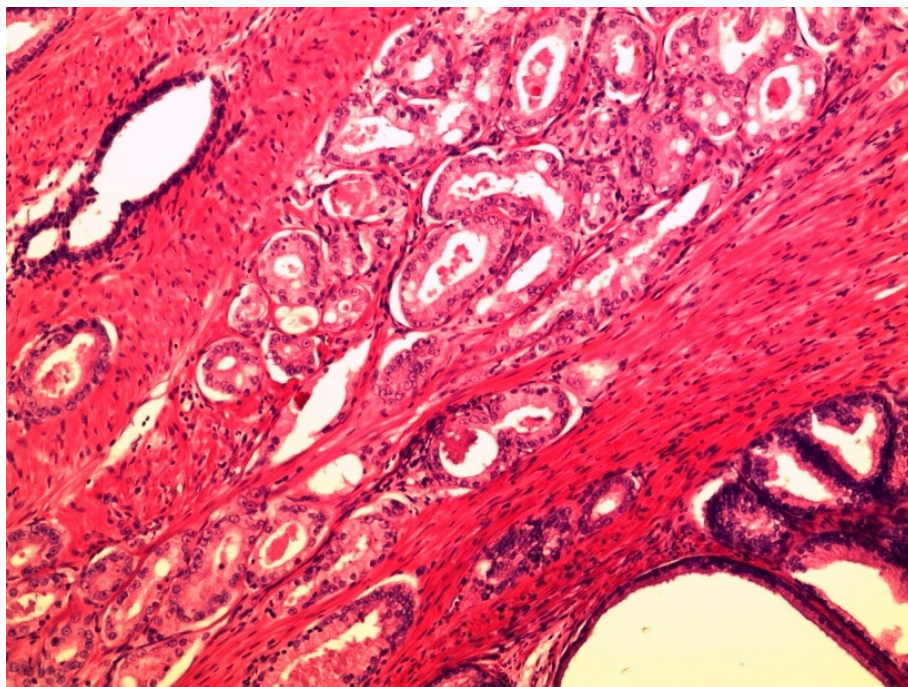


Grafikon 2. Prisustvo metastaza KP u regionalnim limfnim čvorovima ispitivane populacije.

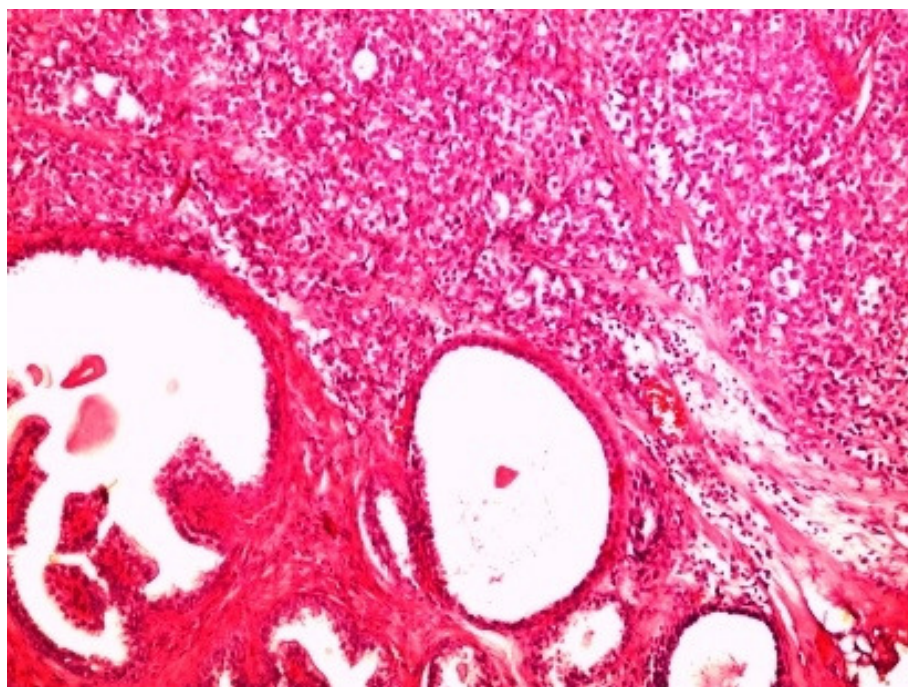
Gleason skor određen je i na predoperativnim uzorcima KP dobijenim iglenom biopsijom prostate. Vrijednosti GS prije i poslije operacije razlikovale su se kod 25 pacijenata (40,98%). Predoperativne vrijednosti GS (uzorci iglenih biopsija) bile su manje u odnosu na postoperativne vrijednosti kod 24 pacijenta (39,34%), sa najvećim brojem slučajeva (15 pacijenata) kod GS 6 (G2) predoperativno koji su postoperativno procijenjeni kao GS 7 (G3) (12 pacijenata), zatim GS 7 u GS 8 (četiri pacijenta), a GS 6 u GS 8 (dva pacijenta) i GS 5 u GS 6 (dva pacijenta), GS 5 u GS 7, GS 4 u GS 6 i GS 7 u GS 9 kod po jednog pacijenta. Kod jednog pacijenta (1,63%), predoperativne vrijednosti GS (GS 8) su bile veće nego postoperativne vrijednosti GS (GS 7).

Predoperativno je kod svih pacijenata u ispitivanoj populaciji određena vrijednost serumskog specifičnog antigena prostate (sPSA) čija je srednja vrijednost iznosila 14,73 ng/ml (SD \pm 12,75), sa minimalnom vrijednošću 2,8 ng/ml i maksimalnom vrijednošću 73,3 ng/ml. Pacijenti su u istraživanju podijeljeni u tri grupe u odnosu na nivo serumskog PSA. Prva grupa pacijenata sa vrijednostima sPSA < 10 ng/ml imala je 22 pacijenta (36,06%),

druga grupa sa sPSA 10–20 ng/ml brojala je 28 pacijenata (45,90%), a treća grupa sa sPSA > 20 činilo je 11 pacijenata (18,03%) (tabela 10).

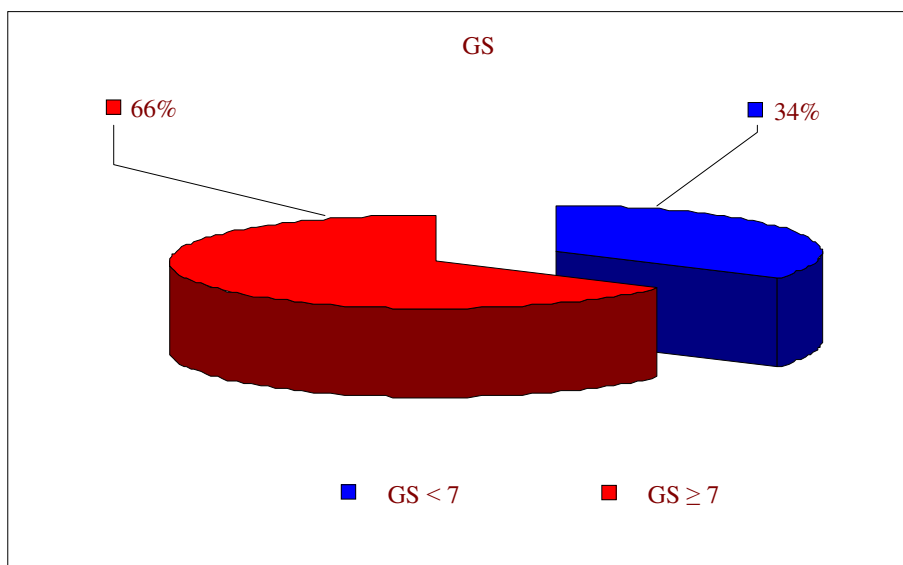


Slika 11. Umjereno diferentovani karcinom prostate, GS 6 (3+3) (HE x100)



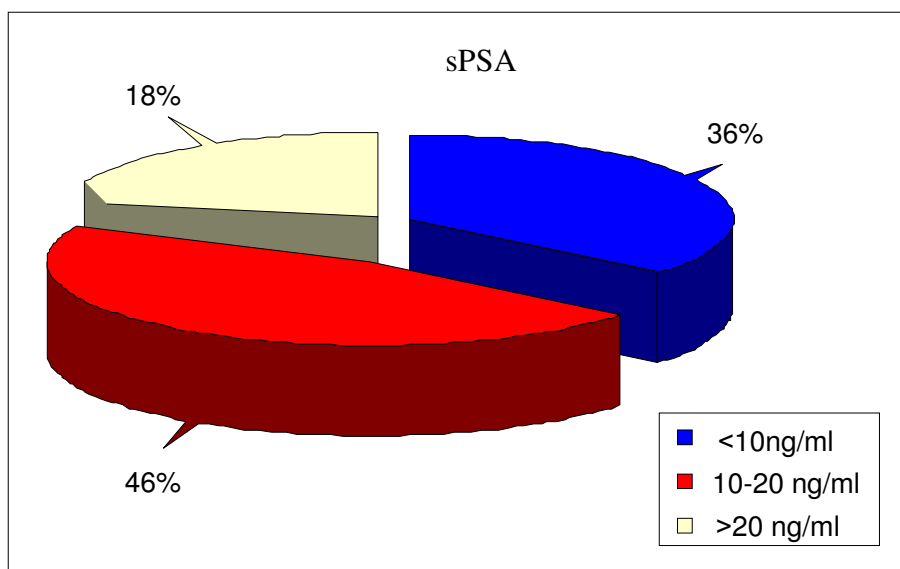
Slika 12 . Loše diferentovan karcinom prostate, GS 9 (4+5) (HE x200)

Podjela ispitivane populacije na osnovu histološke diferentovanosti KP (GS) prikazana je na grafikonu 3.



Grafikon 3. Histološka diferentovanost KP u ispitivanoj populaciji (GS).

Podjela ispitivane populacije na osnovu predoperativnih vrijednosti PSA prikazana je na grafikonu 4.



Grafikon 4. Predoperativne vrijednosti serumskog PSA u ispitivanoj populaciji

4.3. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PROSTATE U ODNOSU NA PATOHISTOLOŠKI STADIJUM BOLESTI

U ispitivanoj populaciji prosječna životna dob pacijenata u oba stadijuma (pT2 i pT3) bila je 66 godina, u pT2 66,03 (SD \pm 5,84), raspona 52–75, a u pT3 66,92 (SD \pm 4,35) sa rasponom 54–78. Na osnovu vrijednosti MANOVA analize $p = 0,525$, odnosno $p > 0,1$, nije bilo statistički značajne povezanosti između stadijuma bolesti i životne dobi bolesnika u momentu dijagnostikovanja KP. (tabela 11).

Analizom stadijuma bolesti u odnosu na prosječnu vrijednost predoperativne serumske PSA gdje je $p > 0,1$, odnosno vrijednost MANOVA $p = 0,817$, nije dokazana statistički značajna razlika. Prosječna vrijednost predoperativnog serumskog PSA iznosila je 16,13 ng/ml (SD \pm 13,98), sa minimalnom vrijednošću 2,8, a maksimalnom vrijednošću 73,3 ng/ml kod pacijenata u T2 stadijumu, a 15,27 ng/ml (SD \pm 14,49), odnosno rasponom 6,1–70,0 ng/ml kod pacijenata u T3 stadijumu.

Analizom stadijuma bolesti u odnosu na vrijednosti predoperativne serumske PSA podijeljene u tri grupe s obzirom na stepen rizika (grupa niskog rizika 0–10 ng/ml, grupa srednjeg rizika 10–20 ng/ml i grupa visokog rizika > 20 ng/ml), nije dokazana statistički značajna razlika na osnovu $p > 0,1$, tj. vrijednosti χ^2 – testa $p = 0,602$. U stadijumu pT2 12 pacijenata (32,4%) je imalo vrijednost PSA $< 10,00$ ng/ml, 17 pacijenata (45,9%) u grupi srednjeg rizika, a osam pacijenata (21,6%) u grupi visokog rizika. U stadijumu T3 deset pacijenata (41,7%) je bilo u grupi niskog rizika, 11 pacijenata (45,8%) u grupi srednjeg rizika, a tri pacijenta (12,5%) u grupi visokog rizika (tabela 11), (grafikon 5).

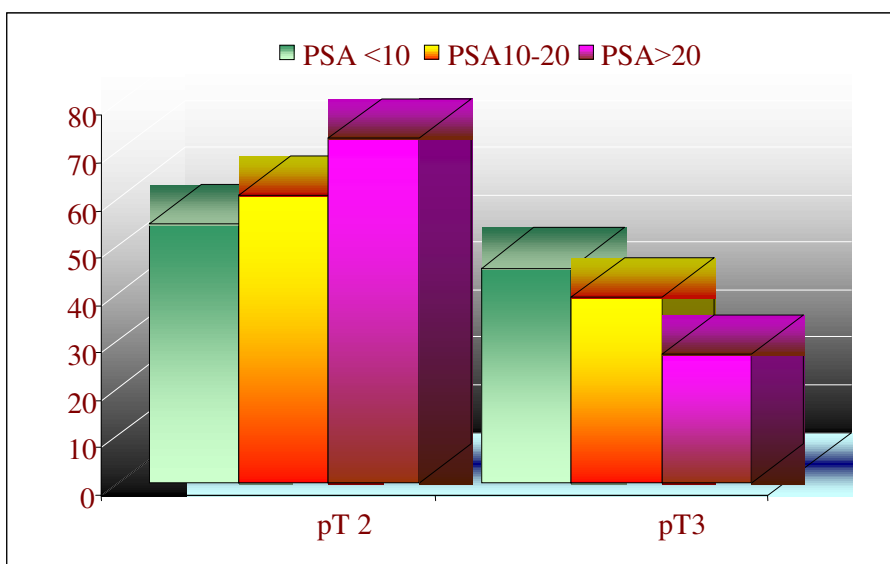
Znači, veće vrijednosti predoperativnog serumskog PSA (i kao kontinualne i kao kategorijalne varijable) pacijenata oboljelih od karcinoma prostate nisu bile statistički značajno veće kod pacijenata sa lokalno invazivnim tumorom (pT3), u odnosu na pacijente sa lokalno ograničenim KP.

U ispitivanoj populaciji od 61 pacijenta u stadijumu T2 *Gleason* skor < 7 imalo je 20 pacijenata (54,1%), dok je jedan pacijent (4,2%) imao $GS \geq 7$. U stadijumu T3 $GS < 7$ imalo je 17 pacijenata (45,9%), a 23 pacijenta (95,8%) $GS \geq 7$. Budući da je $p < 0,001$ na osnovu p vrijednosti χ^2 – testa ($p = 0,000$), postoji statistički visoko značajna povezanost između stadijuma bolesti i *Gleason* skora KP, odnosno lokalno invazivni karcinomi prostate imali su

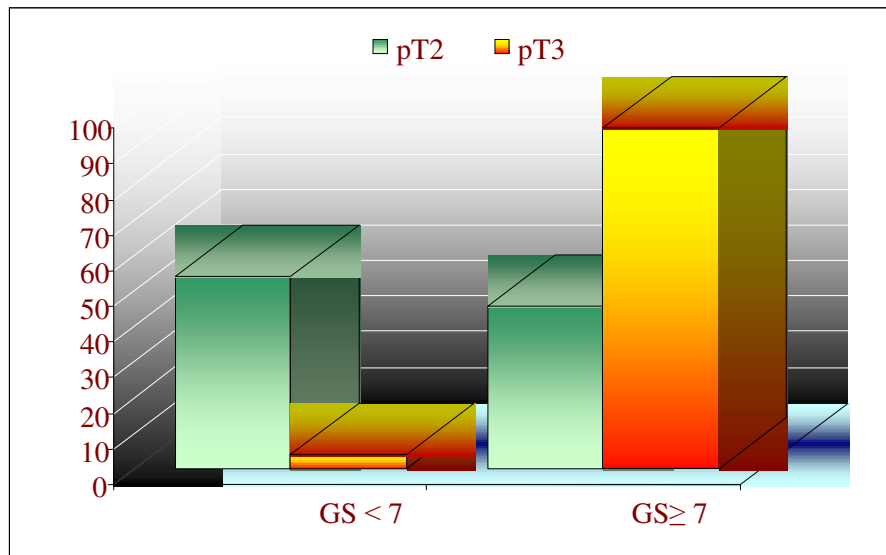
statistički značajno veće vrijednosti Gleason skora u odnosu na lokalno ograničene karcinome prostate (tabela 11), (grafikon 6).

Tabela 11: Kliničkopatološke karakteristike KP u odnosu na stadijum bolesti (pT) u ispitivanoj populaciji

Kliničkopatološke karakteristike	pT2	pT3	Statistički značaj
	N = 37	N = 24	
Starost (prosjeak ± SD)	66,03 (SD ± 5,84) (52–75)	66,92 (SD± 4,35) (54–78)	P=0,525 MANOVA; p >0,1
PSA (ng/ml)	16,13 (SD ± 13,98) (2,8–73,3)	15,27 (SD±14,49) (6,1 -70,0)	p=0,817 MANOVA; p > 0,1
< 10	12 (32,4%)	10 (41,7%)	p= 0,602 χ^2 - test; p > 0,1
10-20	17 (45,9%)	11 (45,8%)	
> 20	8 (21,6%)	3 (12,5%)	
Gleason zbir (GS)			
< 7	20 (54,1%)	17 (45,9%)	p = 0,000 χ^2 -test; p < 0,001
≥7	1 (4,2%)	23 (95,8%)	
pN			
N0	37 (60,65%)	18 (29,50%)	P= 0,001 χ^2 - test; p = 0,001
N1	0	6 (9,84%)	

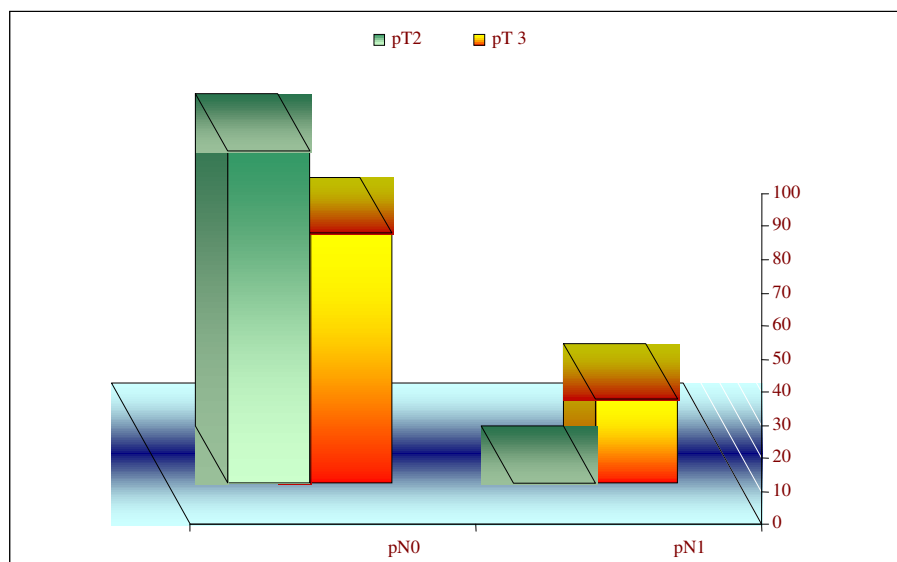


Grafikon 5. Odnos stadijuma bolesti (pT) i kategorija sPSA



Grafikon 6. Odnos stadijuma bolesti (pT) i *Gleason* skora (GS) karcinoma prostate.

Kod pacijenata u momentu operativnog zahvata metastatski depoziti KP u regionalnim limfnim čvorovima nađeni su kod šest pacijenata (9,84%); svi su pacijenti bili u T3 stadijumu. Pošto je vrijednost χ^2 - testa $p = 0,001$, postoji statistički visoko značajna povezanost stadijuma bolesti i prisustva metastaza u limfnim čvorovima, odnosno postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima je statistički značajno češće kod lokalno invazivnih karcinoma prostate u odnosu na lokalno ograničene KP (tabela 11), (grafikon 7).



Grafikon 7. Odnos stadijuma bolesti (pT) i metastaza u limfnim čvorovima (pN).

4.4. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ADENOKARCINOMA PROSTATE U ODNOSU NA GLEASON SKOR (GS) KARCINOMA PROSTATE

U ispitivanoj populaciji prosječna životna dob pacijenata sa *Gleason* skorom < 7 bila je 66 godina, dok je prosječna vrijednost životne dobi sa *Gleason* skorom ≥ 7 iznosila takođe 66 godina. Na osnovu vrijednosti MANOVA $p = 0,844$, odnosno $p > 0,1$, nije bilo statistički značajne povezanosti između vrijednosti *Gleason* skora i životne dobi bolesnika u momentu dijagnostikovanja KP (tabela 12).

Tabela 12. Kliničkopatološke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na *Gleason* skor (GS)

Kliničkopatološke karakteristike	<i>Gleason</i> skor < 7	<i>Gleason</i> skor ≥ 7	Statistički značaj
Starost (prosjeak\pmSD)	66,19 (SD \pm 6,10) (52–75)	66,47 (SD \pm 4,88) (54–78)	P=0,844 MANOVA; p > 0,1
PSA (ng/ml) \pm SD	15,48 \pm 11,11 (4,1–47,8)	15,95 \pm 15,52 (2,8–73,3)	P=0,901 MANOVA; p > 0,1
<10	7 (31,8)	15 (68,2)	p = 0,949 χ^2 - test; p > 0,1
10-20	10 (35,7)	18 (64,3)	
>20	4 (36,4)	7 (63,6)	
Stadijum			
T2	20 (54,1%)	17 (45,9%)	p = 0,000 χ^2 - test; p < 0,001
T3	1 (4,2%)	23 (95,8%)	
pN			
N0	21 (38,2%)	34 (61,8%)	p = 0,062 χ^2 - test; p < 0,1
N1	0	6 (100%)	

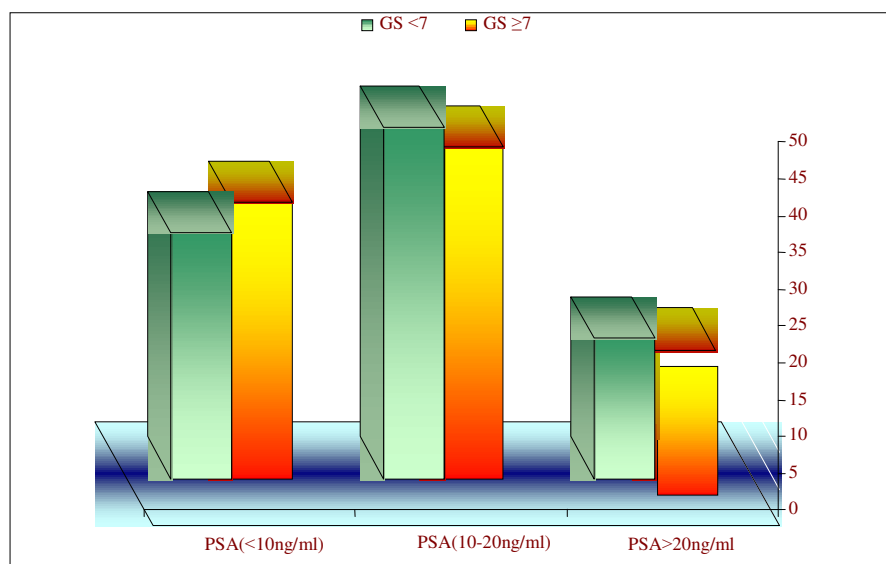
Analizom histološke diferentovanosti KP izražene *Gleason* skorom (GS) u odnosu na prosječnu vrijednost predoperativne serumske PSA nije dokazana statistički značajna razlika budući da je vrijednost MANOVA $p = 0,901$, tj. $p > 0,1$. Prosječna vrijednost predoperativnog serumskog PSA iznosila je $15,48 \pm 11,11$ ng/ml (SD \pm 8,95), sa minimalnom vrijednošću 4,1, a maksimalnom vrijednošću 47,8 ng/ml kod pacijenata sa *Gleason* skorom < 7, a $15,95 \pm 15,52$ ng/ml, odnosno rasponom 2,8–73,3 ng/ml kod pacijenata sa *Gleason* skorom ≥ 7 .

Analizom histološke diferentovanosti KP izražene *Gleason* skorom (GS) u odnosu na vrijednosti predoperativne serumske PSA podijeljene u tri grupe s obzirom na stepen rizika

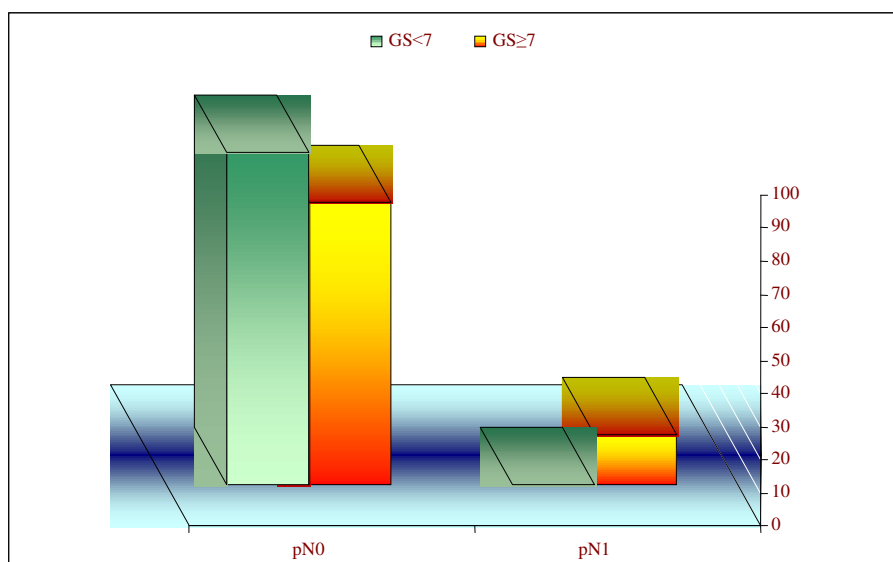
(grupa niskog rizika 0–10 ng/ml, grupa srednjeg rizika 10–20 ng/ml i grupa visokog rizika > 20 ng/ml) nije dokazana statistički značajna razlika pošto je vrijednost χ^2 – testa $p = 0,949$, tj. $p > 0,1$. U prvoj grupi, sedam pacijenata (31,8%) je imalo vrijednost PSA < 10,00 ng/ml, deset pacijenata (35,7%) u grupi srednjeg rizika, a četiri pacijenta (36,4%) u grupi visokog rizika. U drugoj grupi, 15 pacijenata (68,2%) je bilo u grupi niskog rizika, 18 pacijenata (64,3%) u grupi srednjeg rizika, a sedam pacijenata (63,6%) u grupi visokog rizika. (tabela 12), (grafikon 8).

Znači, vrijednosti serumskog PSA (i kao kontinualne i kao kategorijalne varijable) pacijenata oboljelih od karcinoma prostate, nisu bile statistički značajno povišene kod pacijenata sa loše diferentovanim KP ($GS \geq 7$), u odnosu na pacijente sa dobro ili umjereno diferentovanim tumorima.

U ispitivanoj populaciji od 61 pacijenta u stadijumu T2 *Gleason* skor < 7 imalo je 20 pacijenata (54,1%), dok je jedan pacijent (4,2%) imao $GS \geq 7$. U stadijumu T3 $GS < 7$ imalo je 17 pacijenata (45,9%), a 23 pacijenta (95,8%) $GS \geq 7$. Na osnovu vrijednosti χ^2 – testa $p = 0,000$, tj. $p < 0,001$, postoji statistički visoko značajna povezanost između stadijuma bolesti i *Gleason* skora KP, odnosno lošija diferentovanost tumora bila je statistički značajno češće prisutna kod lokalno invazivnih karcinoma prostate (pT3) u odnosu na lokalno ograničene karcinome prostate (tabela 12).



Grafikon 8: Odnos *Gleason* skora (GS) i kategorija sPSA.



Grafikon 9. Odnos *Gleason* skora (GS) i prisustva metastaza u limfnim čvorovima (pN).

Kod pacijenata u momentu operativnog zahvata metastatski depoziti KP u regionalnim limfnim čvorovima nađeni su kod šest pacijenata (100%); svi su pacijenti imali vrijednost *Gleason* skora ≥ 7 (dva pacijenta GS 7, tri pacijenta GS 8 i jedan pacijent GS 9). Pošto je vrijednost χ^2 – testa $p = 0,062$, odnosno $p < 0,1$, postoji statistički značajna povezanost između *Gleason* skora i prisustva metastaza u limfnim čvorovima, odnosno lošije diferentovani karcinomi prostate (GS ≥ 7) bili su statistički značajno češće prisutni kod metastatski proširene bolesti u odnosu na karcinome prostate bez metastaza (tabela 12), (grafikon 9).

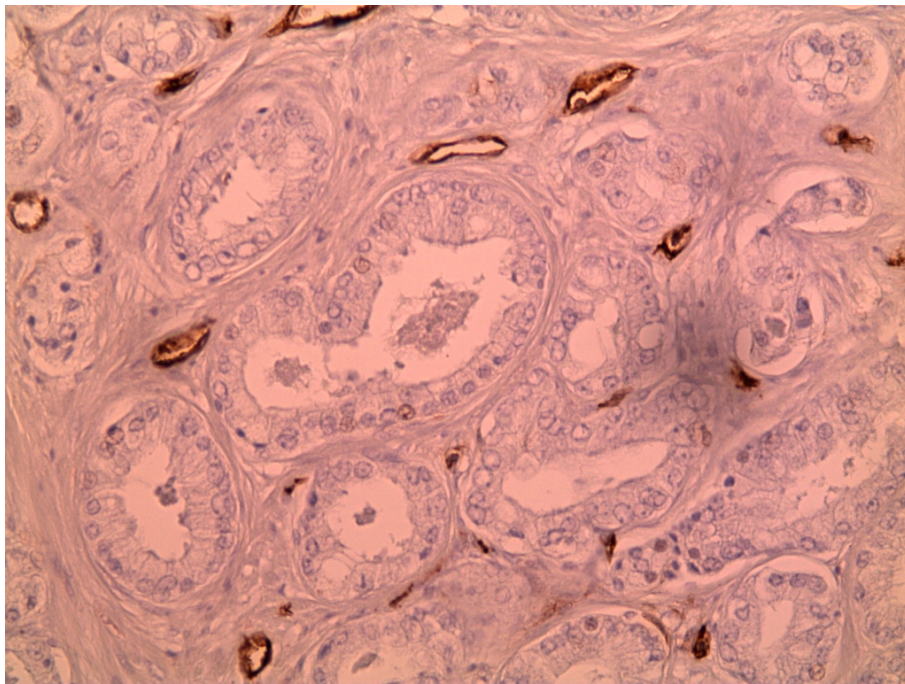
4.5. ANALIZA EKSPRESIJE ISPITIVANIH MARKERA ANGIOGENEZE U KARCINOMU PROSTATE

4.5.1. Demografske i kliničke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na stepen gustine krvnih sudova (MVD) u tumorskom tkivu

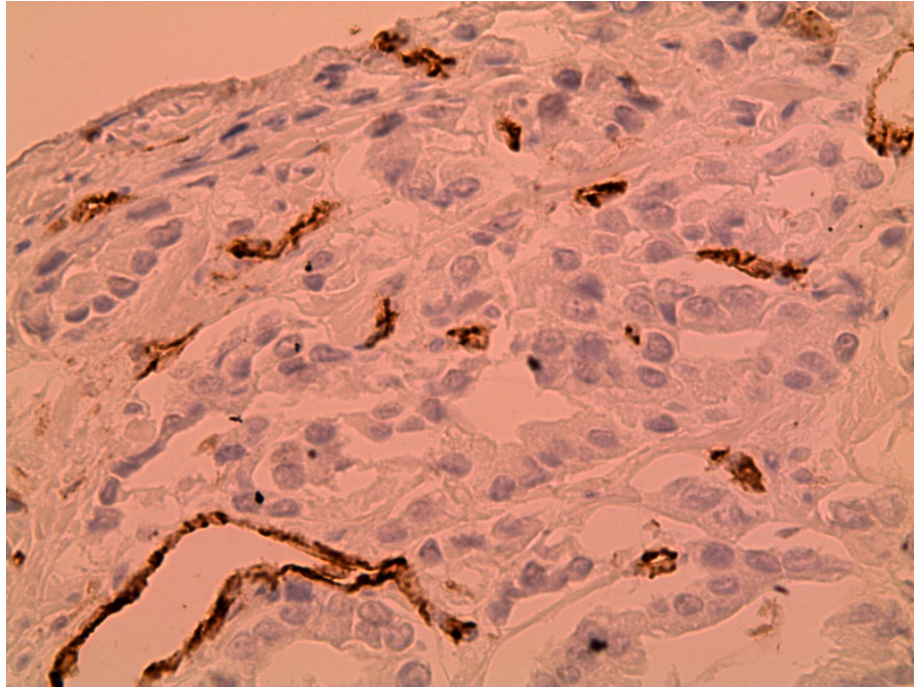
Za procjenu stepena angiogeneze korišćena je imunohistohemijska identifikacija endotelnih ćelija krvnih sudova sa primarnim antitijelom CD31. Imunohistohemijski su analizirani uzorci iglenih biopsija i hirurških resektata koji sadrže najmanje dva mikroskopska polja sa neoplastičnim žlijezdama klasičnog adenokarcinoma prostate na mikroskopskom

uvećanju od 400x. Analiza je vršena kvantitativno, brojanjem krvnih sudova na invazivnom rubu tumorskog tkiva u zoni sa najizraženijom vaskularizacijom. Svaka odvojena endotelna ćelija, zatim grupa endotelnih ćelija sa ili bez lumena, smatrana je krvnim sudom. Prisustvo lumena ili eritrocita nije smatrano neophodnim za identifikaciju novostvorenih krvnih sudova. Vrijednost prosječnog broja krvnih sudova izmjerena i na uzorcima iglene biopsije prostate i na uzorcima radikalne prostatektomije, iznosila je 48,34, odnosno 48 i uzeta je kao „cut off“ vrijednost (ukupan zbir broja krvnih sudova – MVD podijeljen sa brojem uzoraka) u odnosu na koju se svim slučajevima dodijelila ocjena: *nizak stepen angiogeneze* (pacijenti sa brojem krvnih sudova u tumorskom tkivu manjim od 48), ili *visok stepen angiogeneze* (pacijenti sa brojem krvnih sudova u tumorskom tkivu iznad 48). Na osnovu broja krvnih sudova pacijenti su podijeljeni u dvije grupe:

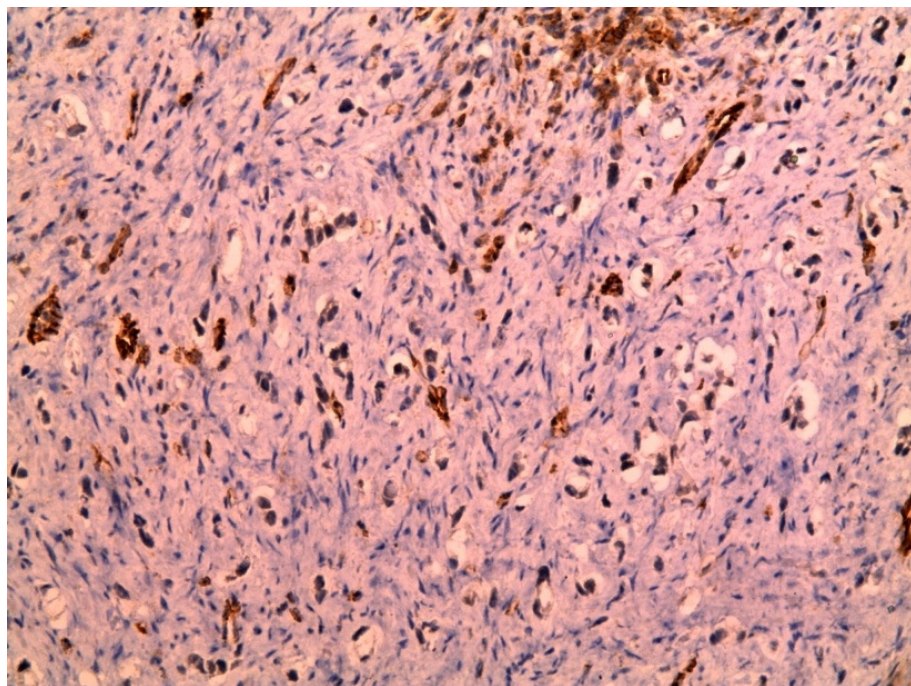
- grupa 1 – pacijenti sa ≤ 48 krvnih sudova na polju velikog uvećanja vidnog polja x 400 smatrani su tumorima sa niskim stepenom angiogeneze (slika 13 i 14);
- grupa 2 – pacijenti sa > 48 krvnih sudova na polju velikog uvećanja vidnog polja x 400 smatrani su tumorima sa visokim stepenom angiogeneze (slika 15 i 16).



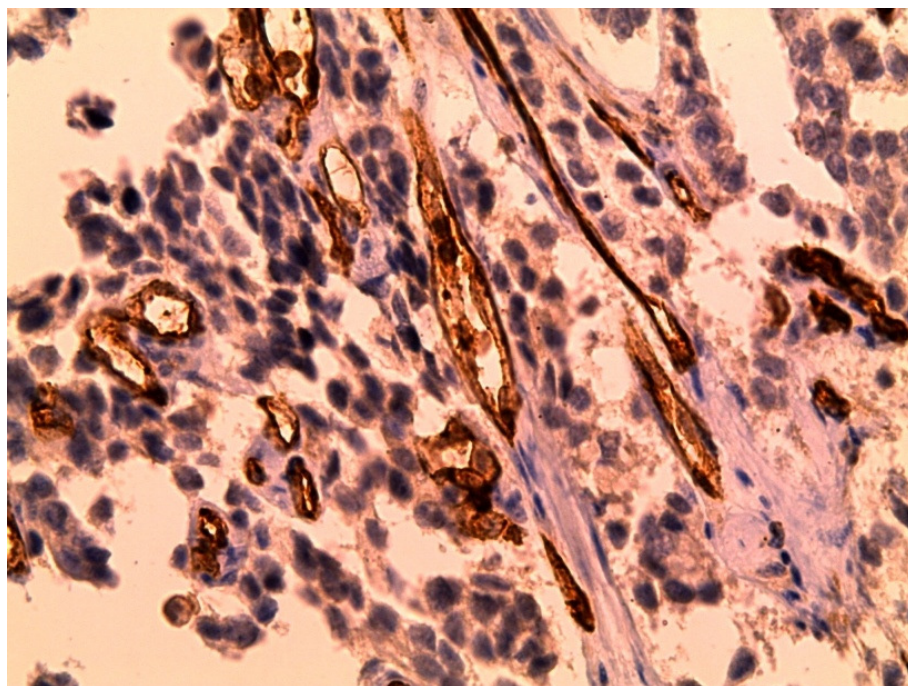
Slika 13. Nizak stepen angiogeneze u karcinomima prostate (CD31 x 200)



Slika 14. Nizak stepen angiogeneze u karcinomima prostate (CD31 x 400)



Slika 15. Visok stepen angiogeneze u karcinomima prostate (CD31 x 200)



Slika 16. Visok stepen angiogeneze u karcinomima prostate (CD31 x 400)

Gustina krvnih sudova u ispitivanoj populaciji kretala se u rasponu od 22 do 78 na uzorcima iglenih biopsija prostate (IB), dok je prosječna vrijednost MVD iznosila 49,84 (SD \pm 13,36), a na uzorcima radikalne prostatektomije (RP) u rasponu od 28 do 89 sa srednjom vrijednošću MVD 46,85 (SD \pm 14,47) (tabela 13).

Tabela 13. Srednje vrijednosti gustine krvnih sudova MVD na uzorcima iglenih biopsija prostate i odgovarajućih radikalnih prostatektomija

MVD	IB	RP	Statistički značaj
MVD \pm SD	49,84 (SD \pm 13,36) (22–78)	46,85 (SD \pm 14,47) (28–89)	P = 0,239 MANOVA; p > 0,1

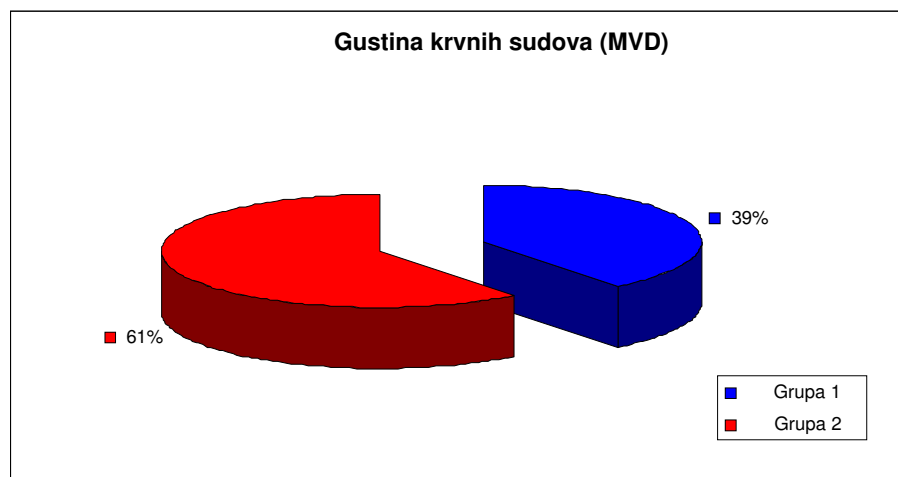
Nakon poređenja prosječnih vrijednosti MVD dobijenih na uzorcima iglenih biopsija prostate s prosječnim vrijednostima MVD na uzorcima odgovarajuće radikalne prostatektomije, korišćenjem MANOVA analize po kojoj je vrijednost p = 0,239, odnosno p > 0,1, nije uočena statistički značajna razlika između ovih vrijednosti.

Tabela 14. Stepen ekspresije faktora angiogeneze u karcinomima prostate u ispitivanoj populaciji

Faktori angiogeneze	Broj pacijenata (n = 61)	%
MVD		
≤ 48	24	39,34
> 48	37	60,65
VEGF		
0	2	3,27
Skor 1	18	32,79
Skor 2	31	47,54
Skor 3	10	16,39
MMP-9		
Skor 1–2	24	39,34
Skor 3–4	23	37,70
Skor 5	14	22,95

U ispitivanoj populaciji vrijednosti MVD u jednoj grupi (MVD ≤ 48) imala su 24 pacijenata (39,34%), a u drugoj grupi (MVD > 48) imalo je 37 pacijenata (60,95%).

Podjela ispitivane populacije na osnovu MVD u tkivu KP prikazana je na grafikonu 10.



Grafikon 10. Prikaz gustine krvnih sudova (MVD) u karcinomima prostate.

U ispitivanoj populaciji prosječna životna dob pacijenata u grupi 1 (MVD ≤ 48) (37 pacijenata) bila je $66,96 \pm 5,34$ (52–74) godina, dok je prosječna vrijednost životne dobi u grupi 2 (MVD > 48) iznosila $66,00 \pm 5,29$ (54–78) godina. Statistički značajne povezanosti

između grupa pacijenata podijeljenih na osnovu stepena angiogeneze i životne dobi bolesnika u momentu operativnog zahvata nije bilo pošto je vrijednost MANOVA $p = 0,493$, tj. $p > 0,1$ (tabela 15).

4.5.1.1. Odnos gustine krvnih sudova karcinoma prostate i predoperativnih serumskih vrijednosti PSA

Analizom grupa pacijenata na osnovu stepena angiogeneze u KP u odnosu na prosječnu vrijednost predoperativne serumske PSA (linearna distribucija) nije dokazana statistički značajna razlika budući da je vrijednost MANOVA $p = 0,393$, odnosno $p > 0,1$. Prosječna vrijednost MVD iznosila je $53,64 \pm 12,51$ (IB), odnosno $47,14 \pm 14,82$ (RP) sa minimalnom vrijednošću 30, a maksimalnom 78 (IB), tj. 81 (RP) kod pacijenata u grupi 1 (PSA < 10 ng/ml). Prosječna MVD iznosila je $48,29 \pm 13,52$ (IB), odnosno $45,71 \pm 13,28$ (RP) sa minimalnom vrijednošću 25 i 28, a maksimalnom 72 (IB), tj. 89 (RP) kod pacijenata u grupi 2 (PSA 10–20 ng/ml), a $46,18 \pm 13,97$ (IB), odnosno $49,18 \pm 17,59$ (RP) sa minimalnom vrijednošću 22 i 29, a maksimalnom 72 (IB), tj. 88 (RP) kod pacijenata u grupi 3 (PSA > 20 ng/ml) (tabela 15).

Analizom grupa pacijenata na osnovu prosječne vrijednosti predoperativne serumske PSA u odnosu na grupe pacijenata zasnovane na stepenu angiogeneze u KP nije dokazana statistički značajna razlika pošto je vrijednost MANOVA $p = 0,220$, tj. $p > 0,1$. Prosječna vrijednost predoperativnog serumskog PSA iznosila je $18,55 \pm 15,59$ (3,4–73,3) ng/ml u grupi pacijenata sa niskim stepenom angiogeneze (MVD ≤ 48), odnosno $14,00 \pm 12,89$ (2,8–70,0) ng/ml kod pacijenata sa visokim stepenom angiogeneze (MVD > 48) (tabela 15).

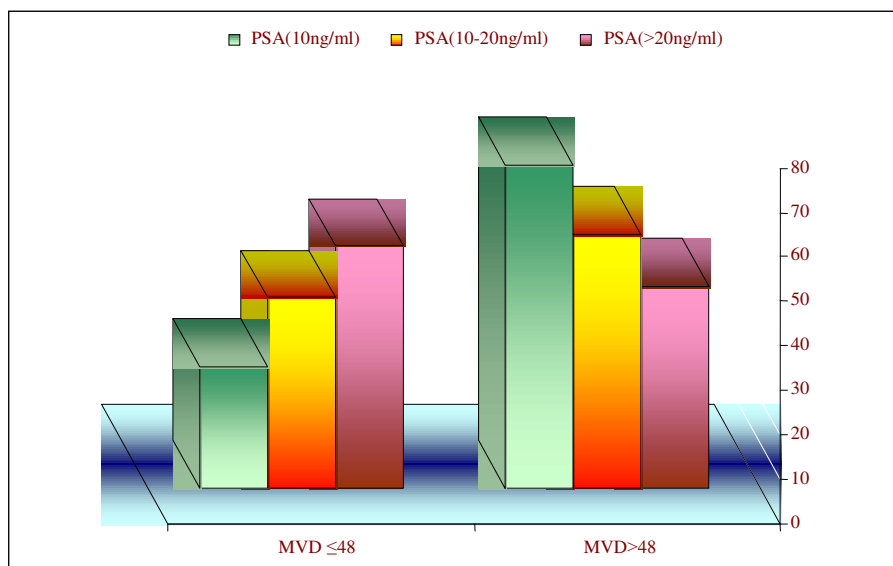
Analizom grupa pacijenata na osnovu stepena angiogeneze u KP u odnosu na vrijednosti sPSA podijeljenog u tri grupe s obzirom na stepen rizika, nije uočena statistički značajna razlika budući da je $p > 0,1$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,279$. U grupi pacijenata sa niskim stepenom angiogeneze (MVD ≤ 48), nizak stepen rizika sPSA imalo je šest pacijenata (25,0%), srednji stepen rizika sPSA 12 pacijenata (50,0%), a visok stepen rizika sPSA šest pacijenata (25,0%). U grupi pacijenata sa visokim stepenom angiogeneze (MVD > 48), 16 pacijenata (43,2%) je imalo nizak stepen sPSA, 16 pacijenata (43,2%) srednji stepen rizika, a pet pacijenata (13,5%) visok stepen rizika sPSA (tabela 15), (grafikon 11).

Tabela 15. Prikaz gustine krvnih sudova (MVD) i kliničko-patoloških karakteristika karcinoma prostate.

	Broj pacijenata	MVD ± SD	MVD ≤ 48 (n=24)	MVD > 48 (n = 37)	Statistički značaj
Starost (prosjeck±SD)			66,96 ± 5,34 (52,0-74,0)	66,00 ±5,29 (54,0 -78,0)	P=0,493 MANOVA; P > 0,1
PSA ± SD (ng/ml)			18,55±15,59 (3,4-73,3)	14,00 ±12,89 (2,8-70,0)	P=0,220 MANOVA, P > 0,1
<10	22	53,64 ± 12,51(30-78) (IB) 47,14 ± 14,82 (30-81) (RP)	6 (25,0%)	16 (43,2%)	p=0,279 χ^2 -test; p > 0,1
10-20	28	48,29 ± 13,52 (25-72) (IB) 45,71 ±13,28 (28-89) (RP)	12 (50,0%)	16 (43,2%)	
> 20	11	46,18 ± 13,97 (22-72) (IB) 49,18 ± 17,59 (29-88) (RP)	6 (25,0%)	5 (13,5%)	
Statistički značaj		P=0,393 MANOVA; p > 0,1			
Gleason skor GS					
< 7	21	46,11± 13,51 (22-73) (IB) 38,79± 9,54 (28-60) (RP)	12 (50,0%)	9 (24,3%)	p=0,039 χ^2 -test; p < 0,05
≥ 7	40	53,00 ± 12,57 (27-78)(IB) 53,70 ± 14,51 (29-89)(RP)	12 (50,0%)	28 (75,7%)	
Statistički značaj		P=0,044 MANOVA; p < 0,1			
Stadijum					
T2	37	46,24 ± 13,10 (22-73) (IB) 42,24 ± 11,64 (28-70) (RP)	19 (79,2%)	18 (48,6%)	p=0,017 χ^2 -test; p < 0,05
T3	24	55,38±11,99(27-78)(IB) 53,96±15,73 (32-89)(RP)	5 (20,8%)	19 (51,4%)	
Statistički značaj		P=0,001 MANOVA; p = 0,001			
pN					
N0	55	48,85 ± 13,63 (22-78) (IB) 45,60 ± 13,79 (28-89) (RP)	24 (100%)	31 (83,8%)	p=0,038 χ^2 -test; p < 0,05
N1	6	58,83 ± 5,19 (50-65) (IB) 58,33 ± 16,83 (39-88)(RP)	0 (0%)	6 (16,2%)	
Statistički značaj		P=0,071 MANOVA; p = 0,082 (IB), p = 0,040 (RP); P < 0,1			

Znači, vrijednosti serumske PSA (kontinualne i kategorijalne) pacijenata oboljelih od karcinoma prostate nisu bile statistički značajno veće kod pacijenata sa većom gustinom

krvnih sudova u tumorskom tkivu u odnosu na pacijente sa manjim brojem krvnih sudova u KP.



Grafikon 11. Odnos gustine krvnih sudova i serumskog PSA.

4.5.1.2. Odnos gustine krvnih sudova karcinoma prostate i stadijuma bolesti

Analizom grupa pacijenata na osnovu prosječne vrijednosti gustine krvnih sudova (MVD) u KP u odnosu na stadijum bolesti primjenom analize MANOVA gdje je vrijednost $p = 0,001$, dokazana je značajna statistička razlika između stadijuma pT2 i pT3, odnosno agresivnija neoplazma (lokalno invazivni karcinom prostate) imala je statistički značajno veći broj krvnih sudova u tumorskom tkivu u odnosu na lokalno ograničen karcinom prostate.

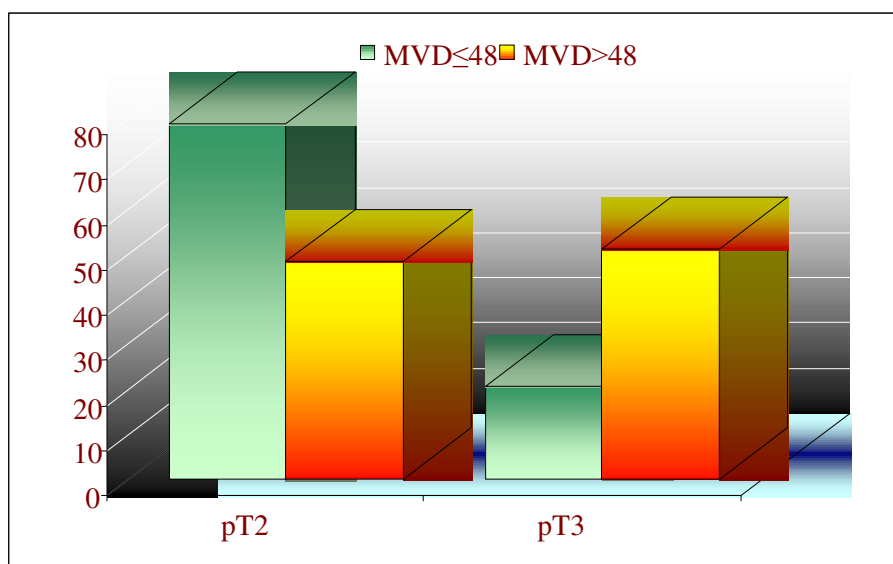
U ispitivanoj populaciji u stadijumu T2 (37 pacijenata) prosječna vrijednost MVD iznosila je 42, 24 sa $SD \pm 11,64$, u rasponu od 28 do 70, a u stadijumu T3 (24 pacijenta) prosječna vrijednost MVD bila je 53,96 ($SD \pm 15,73$) u rasponu od 32 do 89 (tabela 15).

U stadijumu T2, 19 pacijenata (79,2%) je imalo nizak stepen angiogeneze ($MVD \leq 48$), a 18 pacijenata (48,6%) visok stepen angiogeneze ($MVD > 48$). U T3 stadijumu, pet pacijenata (20,8%) je imalo nizak stepen angiogeneze, a 19 pacijenata (51,4%) je imalo $MVD > 48$, odnosno visok stepen angiogeneze (tabela 15).

Budući da je $p < 0,05$, na osnovu vrijednosti χ^2 – testa $p = 0,017$, postoji statistički značajna povezanost između stadijuma bolesti i kategorija gustine krvnih sudova (MVD) KP,

odnosno visok stepen angiogeneze u tumorskom tkivu ($MVD > 48$) bio je statistički značajno češće prisutan kod lokalno invazivnog karcinoma prostate (pT3) u odnosu na lokalno ograničen KP.

Vrijednosti kategorija gustine krvnih sudova u odnosu na stadijum bolesti prikazani su na grafikonu 12 .



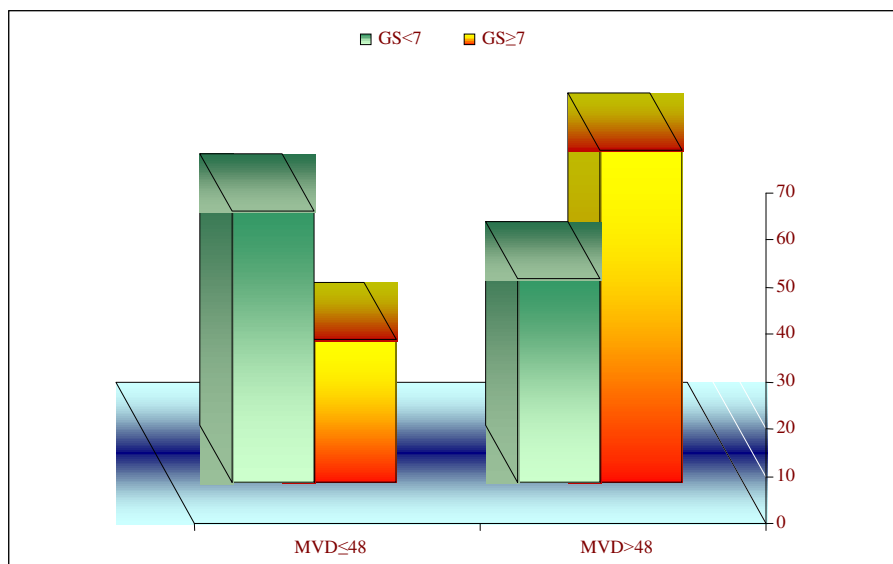
Grafikon 12. Odnos gustine krvnih sudova (MVD) i stadijuma bolesti (pT).

4.5.1.3. Odnos gustine krvnih sudova i patohistološkog gradusa karcinoma prostate – *Gleason* skor (GS)

Analizom grupa pacijenata na osnovu prosječne vrijednosti gustine krvnih sudova (MVD) u KP u odnosu na *Gleason* skor (GS) primjenom analize MANOVA gdje je vrijednost $p = 0,044$, odnosno $p < 0,05$, dokazana je značajna statistička razlika, tj. loše diferentovani karcinomi prostate imali su statistički značajno veću gustinu krvnih sudova u tumorskom tkivu u odnosu na umjereno i dobro diferentovane KP.

U ispitivanoj populaciji u grupi u kojoj je *Gleason* skor < 7 (21 pacijent), prosječna vrijednost MVD iznosila je $46,11 \pm 13,51$, u rasponu od 22 do 73, a u grupi sa *Gleason* skorom ≥ 7 (40 pacijenta) prosječna vrijednost MVD bila je $53,00 \pm 12,47$ u rasponu od 27 do 78 (tabela 15).

U grupi pacijenata sa niskim GS ($GS < 7$) 12 pacijenata (50%) je imalo nizak stepen angiogeneze ($MVD \leq 48$), a devet pacijenata (24,3%) visok stepen angiogeneze ($MVD > 48$). U grupi pacijenata sa $GS \geq 7$, 12 pacijenata (50%) je imalo nizak stepen angiogeneze, a 28 pacijenata (75,7%) je imalo $MVD > 48$, odnosno visok stepen angiogeneze (tabela 15).



Grafikon 13. Odnos gustine krvnih sudova i patohistološkog gradusa karcinoma prostate (*Gleason* skor, GS).

Poređenjem kategorija gustine krvnih sudova MVD i kategorija GS, nađena je statistički značajna razlika, budući da je $p < 0,05$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,039$, što znači da su pacijenti sa visokim stepenom angiogeneze u tumorskom tkivu ($MVD > 48$) imali statistički značajno češće loše diferentovani karcinom prostate ($GS \geq 7$), nego dobro ili umjereno diferentovan KP.

Vrijednosti kategorija MVD u odnosu na GS prikazane su na grafikonu 13.

4.5.1.4. Odnos gustine krvnih sudova i pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod oboljelih od karcinoma prostate

Analizom grupa pacijenata na osnovu prosječne vrijednosti gustine krvnih sudova (MVD) u KP u odnosu na prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima primjenom analize MANOVA gdje je vrijednost $p = 0,071$ (za uzorke IB vrijednost $p = 0,082$, a za

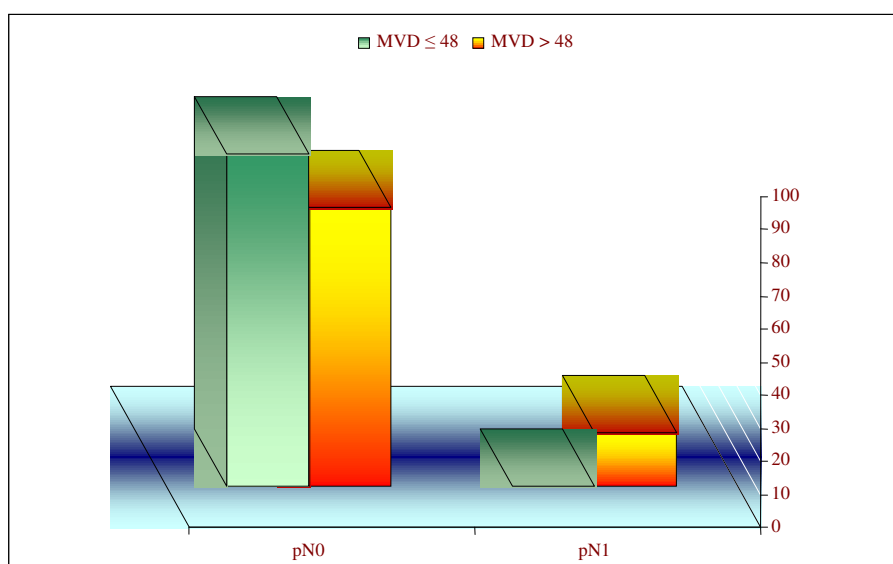
uzorke dobijene RP vrijednost $p = 0,040$), tj. $p < 0,1$, dokazana je značajna statistička razlika. To znači da su pacijenti sa metastatski proširenom bolesti imali statistički značajno veću gustinu krvnih sudova u odnosu na pacijente sa KP bez metastaza.

U ispitivanoj populaciji, kod šest pacijenata sa metastazama KP u regionalnim limfnim čvorovima, pN1, prosječna vrijednost MVD iznosila je $58,83 \pm 5,19$ u rasponu od 50 do 65 (IB), odnosno $58,33 \pm 16,83$ u rasponu od 39 do 88 (RP), a kod 55 pacijenata bez metastaza KP, pN0, prosječna vrijednost MVD bila je $48,85 \pm 13,63$ u rasponu od 22 do 78 (IB), tj. $45, 60 \pm 13,79$ sa rasponom od 28 do 89 (RP) (Tabela 15).

U grupi pN1, svih pet pacijenata (16,2%) je imalo visok stepen angiogeneze (MVD > 48). U grupi pN0, 24 pacijenata (100%) je imalo nizak stepen angiogeneze, a 31 pacijenta (83,8%) je imao MVD > 48, odnosno visok stepen angiogeneze (tabela 15).

Poređenjem kategorija gustine krvnih sudova MVD i grupa pN0 i pN1, nađena je statistički značajna razlika, budući da je $p < 0,05$, tj. vrijednost χ^2 – testa $p = 0,038$, odnosno visok stepen angiogeneze bio je statistički značajno češći kod pacijenata sa metastatski proširenim KP, u odnosu na pacijente sa karcinomom prostate bez metastaza.

Vrijednosti kategorija MVD u odnosu na prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima prikazane su na grafikonu 14.



Grafikon 14. Odnos gustine krvnih sudova i prisustva metastaza u limfnim čvorovima.

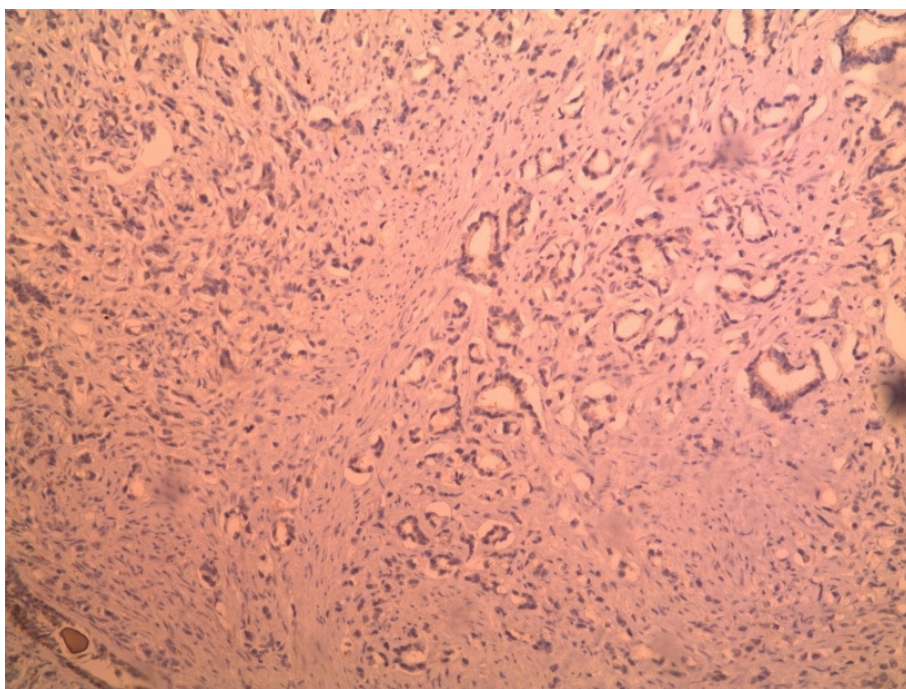
4.5.2. Demografske i kliničke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta – VEGF

Vrijednosti ekspresije VEGF određene su na osnovu jasne citoplazmatske smeđe prebojenosti hromogenom supstancom. Semikvantitativna analiza ekspresije VEGF izvršena je prema procentu pozitivnih tumorskih ćelija i intenzitetu obojenosti citoplazme.

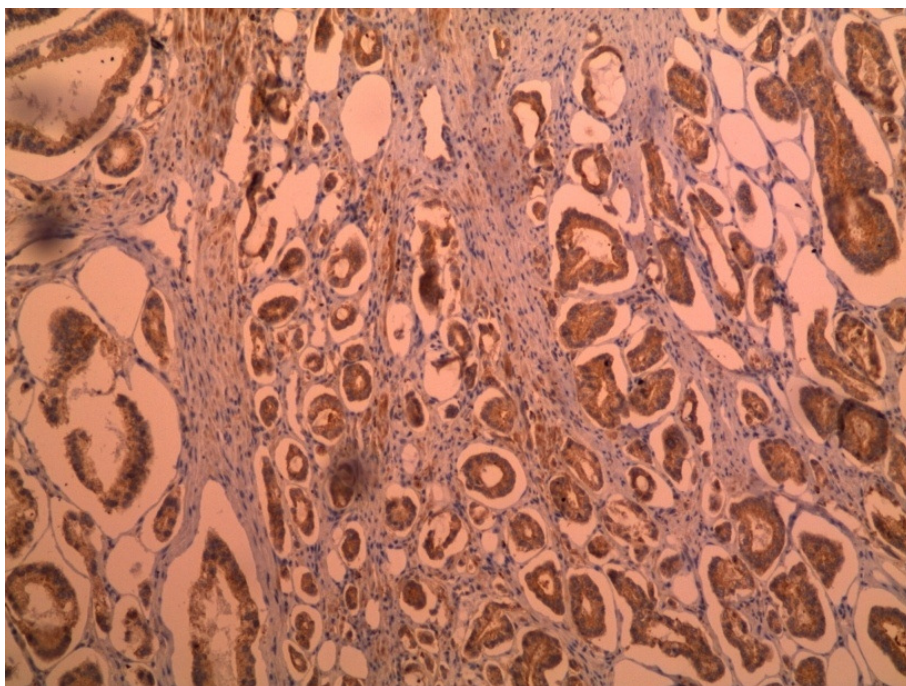
Ekspresija VEGF prikazana je kroz sljedeći skor:

- skor 1 = 0–20% tumorskih ćelija koje pokazuju slabu pozitivnost (slika 17).
- skor 2 = 21–50% tumorskih ćelija koje pokazuju umjerenu do jaku pozitivnost;
- skor 3 = >50% tumorskih ćelija koje pokazuju umjerenu do jaku pozitivnost (slika 18).

S obzirom na kvantitet i kvalitet imunohistohemijske reakcije, grupa tumora sa skorom 1 označena je tumorima niske ekspresije VEGF, grupa tumora sa skorom 2 činila je tumore sa srednjom ekspresijom VEGF, a u kategoriju tumora sa visokom ekspresijom VEGF svrstani su tumori označeni skorom 3.



Slika 17. Niska ekspresija VEGF u karcinomima prostate (VEGF x 100)

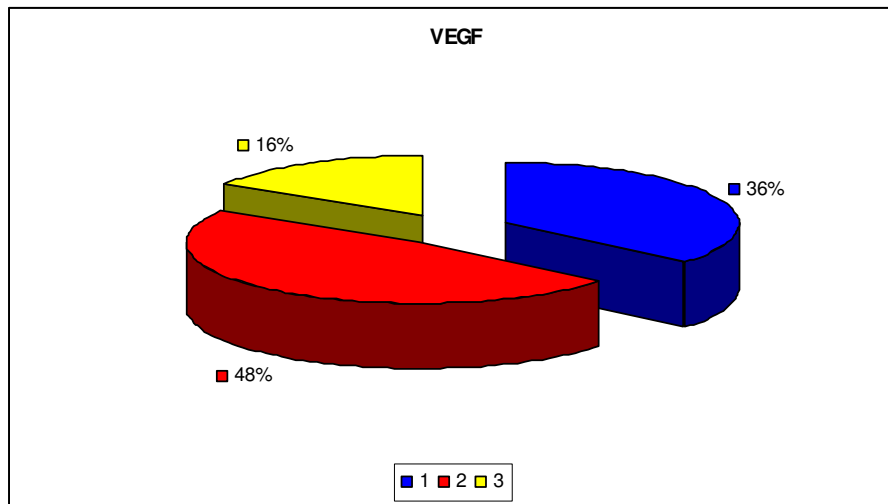


Slika 18. Visoka ekspresija VEGF u karcinomima prostate (VEGF x 200).

Uzorci karcinoma prostate 59 pacijenata pokazali su pozitivnu difuznu citoplazmatsku ekspresiju, sa područjima pozitivne ekspresije i fokusima negativne ekspresije citoplazme tumorskih ćelija. Pozitivna citoplazmatska ekspresija VEGF nije bila jednolika, različiti tumorski fokusi su pokazivali različit stepen ekspresije VEGF. Fokalno su bila prisutna područja peritumoralne stromalne pozitivne ekspresije VEGF. Karcinomi prostate dva pacijenta nisu pokazala ekspresiju VEGF.

U ispitivanoj populaciji visoka ekspresija VEGF (skor 3) bila je prisutna kod 10 pacijenata (16,39%), umjerena ekspresija VEGF (skor 2) nađena je kod 31 pacijenta (47,54%), niska/negativna ekspresija VEGF (skor 1) kod 20 pacijenata, od kojih niska kod 18 pacijenta (32,79%), a negativna kod dva pacijenta (3,27%) (tabela 14),(grafikon 15).

Prosječna starost pacijenata sa niskom ekspresijom VEGF u tumorskim ćelijama je bila $67,80 \pm 5,88$ (52–75) godina, sa umjerenom ekspresijom VEGF prosječna životna dob je iznosila $66,00 \pm 5,10$ (55–78) godina, dok je prosječna životna dob kod pacijenata sa visokom ekspresijom VEGF iznosila $64,70 \pm 4,27$ (54–70) godina. Razlika u starosti oboljelih od adenokarcinoma prostate u odnosu na nivo ekspresije VEGF u tumorskim ćelijama nije bila od statističkog značaja, pošto je vrijednost MANOVA $p = 0,274$, tj. $p > 0,1$ (tabela 16).



Grafikon 15. Prikaz ekspresije VEGF u karcinomima prostate

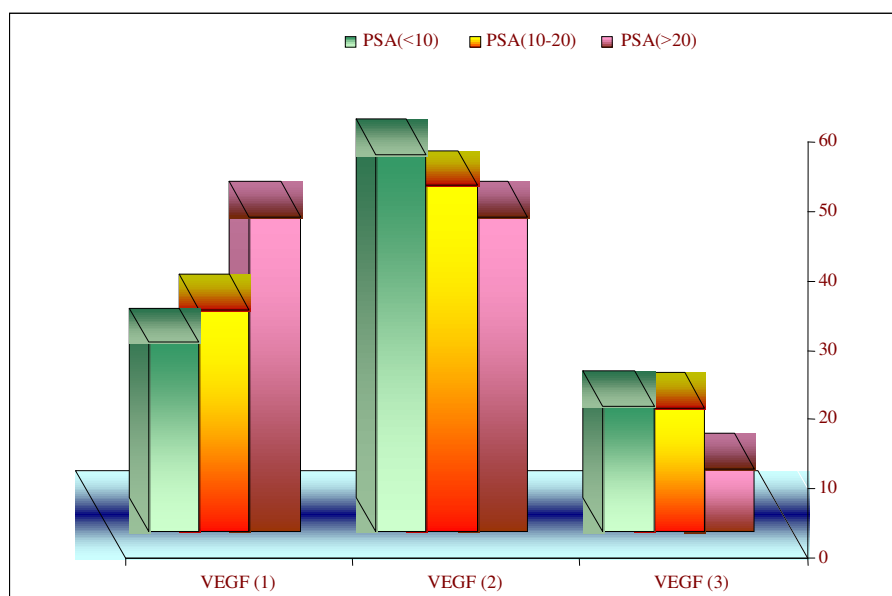
4.5.2.1. Odnos ekspresije VEGF i predoperativnih serumskih vrijednosti PSA

Prosječna vrijednost predoperativnog serumskog PSA iznosila je $16,64 \pm 11,99$ ng/ml, sa minimalnom vrijednošću 5,9 ng/ml, a maksimalnom 47,8 ng/ml kod pacijenata sa niskom ekspresijom VEGF, a $14,76 \pm 13,99$ ng/ml, rasponom 2,8–73,3 ng/ml kod pacijenata sa umjerenom ekspresijom VEGF, odnosno $17,30 \pm 18,84$ ng/ml i rasponom 6,5–70,0 ng/ml kod pacijenata sa visokom ekspresijom VEGF. Poređenjem vrijednosti kategorija ekspresije VEGF i prosječnih vrijednosti sPSA nije nađena statistički značajna razlika, budući da je vrijednost MANOVA $p = 0,842$, odnosno $p > 0,1$ (tabela 16).

U grupi pacijenata sa niskom ekspresijom VEGF, nizak stepen rizika sPSA imalo je šest pacijenata (27,3%), srednji stepen rizika sPSA devet pacijenata (32,1%), a visok stepen rizika sPSA pet pacijenata (45,5%). U grupi pacijenata sa umjerenom ekspresijom VEGF, 12 pacijenata (54,5%) je imalo nizak stepen sPSA, 14 pacijenata (50,0%) srednji stepen rizika, a pet pacijenata (45,5%) visok stepen rizika sPSA. U grupi pacijenata sa visokom ekspresijom VEGF, četiri pacijenta (18,2%) su imala nizak stepen sPSA, pet pacijenata (17,9%) srednji stepen rizika, a jedan pacijent (9,1%) visok stepen rizika sPSA. Poređenjem kategorija ekspresije VEGF u karcinomima prostate i vrijednosti serumске PSA podijeljenih u grupe u odnosu na stepen rizika, nije dokazana statistički značajna razlika, budući da je $p > 0,1$ odnosno vrijednost χ^2 -testa $p = 0,860$ (tabela 16, grafikon 16).

Znači, vrijednosti serumskog PSA (i kao kontinualne i kao kategorijalne varijable) pacijenata oboljelih od karcinoma prostate, nisu bile statistički značajno veće kod pacijenata

sa visokom ekspresijom VEGF u tumorskom tkivu, u odnosu na pacijente sa niskom ekspresijom VEGF u KP.



Grafikon 16. Odnos ekspresije VEGF i vrijednosti serumskog PSA.

Tabela 16. Prikaz ekspresije VEGF i kliničko patoloških karakteristika karcinoma prostate.

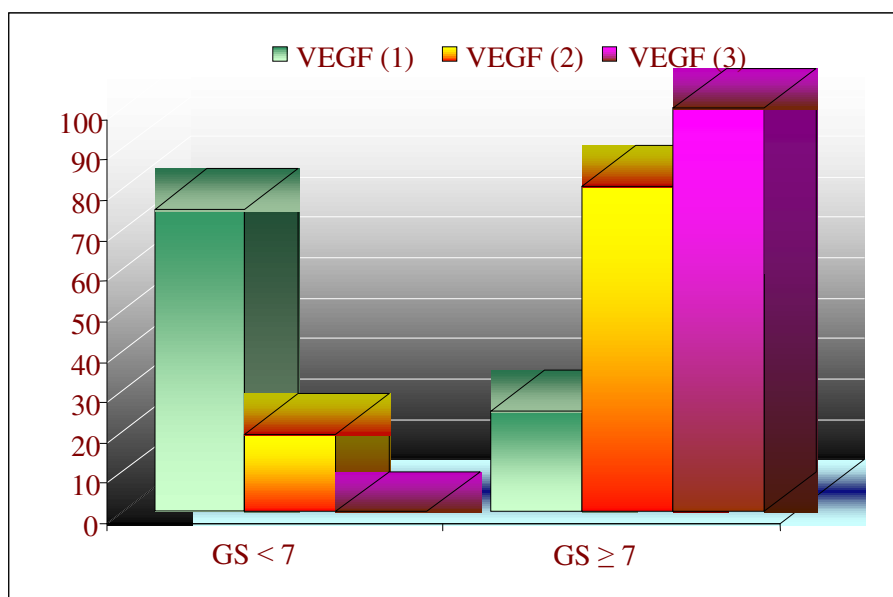
	VEGF skor 1 (-20%) n=20	VEGF skor 2 (21-50%) n=31	VEGF skor 3 (>50%) n=10	Statistički značaj
Starost (prosjeck±SD)	67,80 ± 5,88 (52,0-75,0)	66,00 ± 5,10 (55,0-78,0)	64,70 ± 4,27 (54,0-70,0)	P=0,274 MANOVA; P > 0,1
PSA ± SD	16,64 ± 11,99 (5,9-47,8)	14,76 ± 13,99 (2,8-73,3)	17,30 ± 18,84 (6,5-70,0)	p=0,842 MANOVA; p > 0,1
<10	6 (27,3%)	12 (54,5%)	4 (18,2%)	p=0,860 χ^2 -test; p > 0,1
10-20	9 (32,1%)	14 (50,0%)	5 (17,9%)	
>20	5 (45,5%)	5 (45,5%)	1 (9,1%)	
Gleason skor GS				
< 7	15 (75,0%)	6 (19,4%)	0 (0%)	p=0,000 χ^2 -test; p < 0,001
≥ 7	5 (25,0%)	25 (80,6%)	10 (100%)	
Stadijum				
T2	16 (80,0%)	21 (67,7%)	0 (0%)	p=0,000 χ^2 -test; p < 0,001
T3	4 (20,0%)	10 (32,3%)	10 (100%)	
pN				
N0	19 (95,0%)	29 (93,5%)	7 (70,0%)	p=0,064 χ^2 -test; p < 0,1
N1	1 (5,0%)	2 (6,5%)	3 (30,0%)	

4.5.2.2. Odnos ekspresije VEGF i patohistološkog gradusa karcinoma prostate – *Gleason* skor (GS)

U grupi pacijenata sa niskim GS ($GS < 7$), 15 pacijenata (75,0%) je imalo nisku/negativnu ekspresiju VEGF, a šest pacijenata (19,4%) je pokazalo umjerenu ekspresiju VEGF, dok nijedan pacijent (0%) nije imao visoku ekspresiju VEGF. U grupi pacijenata sa $GS \geq 7$, pet pacijenata (25,0%) je imalo nisku ekspresiju VEGF, 25 pacijenata (80,6%) umjerenu ekspresiju, a 10 pacijenata visoku ekspresiju VEGF (100%) (tabela 16).

Poređenjem vrijednosti kategorija ekspresije VEGF i patohistološkog gradusa karcinoma prostate (*Gleason* skora, GS), uočena je statistički značajna razlika budući da je $p < 0,001$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,000$. To znači da je ekspresija VEGF u tumorskom tkivu bila statistički značajno veća kod pacijenata sa lošije diferentovanim karcinomom prostate ($GS \geq 7$) u odnosu na pacijente sa dobro i umjereno diferentovanim KP (tabela 16).

Vrijednosti ekspresije VEGF u odnosu na *Gleason* skor prikazane su na grafikonu 17.



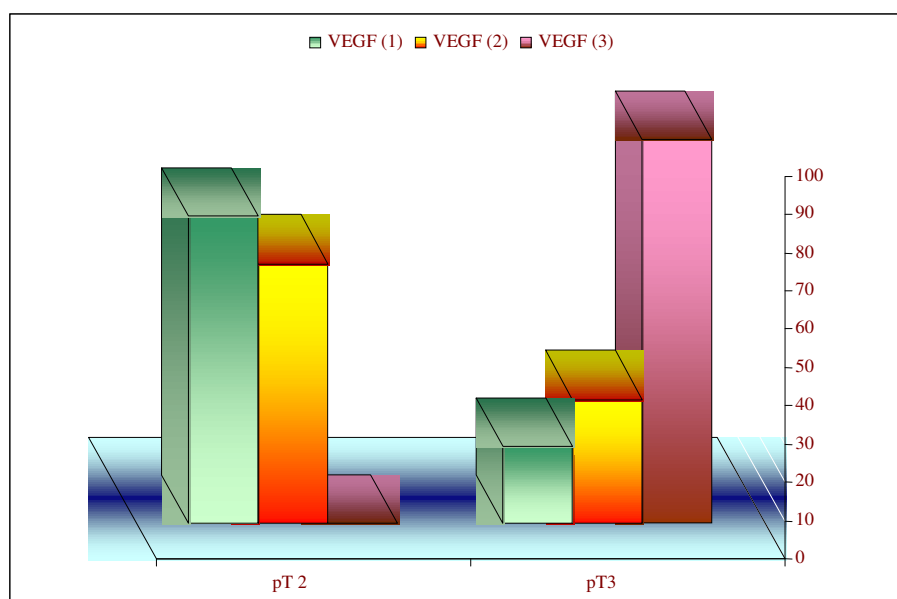
Grafikon 17. Odnos ekspresije VEGF i patohistološkog gradusa karcinoma prostate (*Gleason* skor, GS).

4.5.2.3. Odnos ekspresije VEGF i stadijuma bolesti kod oboljelih od karcinoma prostate

Visoka ekspresija VEGF u pacijenata čija bolest je bila u stadijumu T2 nije bila prisutna niti u jednog pacijenta (0%). Umjerenjena ekspresija VEGF kod pacijenata u T2 stadijumu je zabilježena u 21 slučaju (67,7%), a niska ili negativna ekspresija VEGF kod 16 pacijenata (80,0%). Kod pacijenata u T3 stadijumu bolesti visoka ekspresija je potvrđena u 10 pacijenata (100%), umjerenjena ekspresija u 10 (32,3%) i negativna ili slaba ekspresija u četiri ispitanika (20,0%) (tabela 16).

Poređenjem vrijednosti kategorija ekspresije VEGF i stadijuma bolesti, dobijena je statistički značajna razlika budući da je $p < 0,001$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,000$, tj. statistički značajno veća ekspresija VEGF je bila prisutna u tumorskom tkivu pacijenata sa lokalno proširenim karcinomom prostate (pT3) u odnosu na tkivo pacijenata sa lokalno ograničenim KP (pT2) (tabela 16).

Vrijednosti ekspresije VEGF u odnosu na stadijum bolesti prikazani su na grafikonu 18.



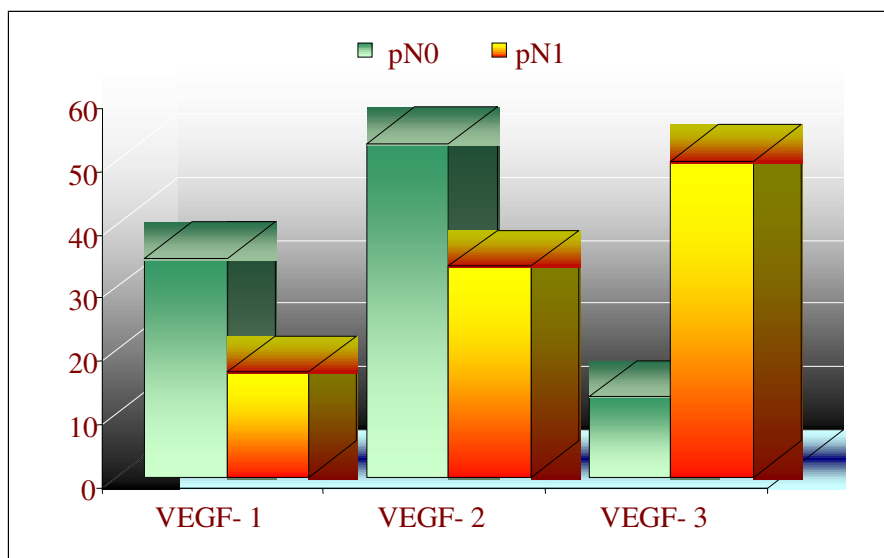
Grafikon 18. Odnos ekspresije VEGF i stadijuma bolesti.

4.5.2.4. Odnos ekspresije VEGF i pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod oboljelih od karcinoma prostate

Kod bolesnika bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, 19 pacijenata je bilo u grupi sa negativnom ili niskom ekspresijom VEGF (95,0%) dok je umjerena ekspresija potvrđena kod 29 (93,5%) slučajeva, a visoku ekspresiju je ispoljilo sedam (70,0%) oboljelih. Visoka ekspresija VEGF je uočena kod tri (30,0%) oboljelih sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima, a negativnu ili nisku ekspresiju VEGF je pokazao jedan (5,0%) pacijent, koji je imao metastaze u limfnim čvorovima. Umjerena ekspresija VEGF u oboljelih sa metastazama u limfnim čvorovima je nađena u dva (6,5%) slučaja (tabela 16).

Poređenjem vrijednosti kategorija ekspresije VEGF kod pacijenata kod kojih nisu nađene metastaze u regionalnim limfnim čvorovima sa pacijentima kod kojih su potvrđene metastaze u regionalnim limfnim čvorovima nađena je razlika od statističkog značaja pošto je $p < 0,1$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,064$. To znači da je ekspresija VEGF u tumorskom tkivu bila statistički značajno veća kod pacijenata sa metastatski proširenom bolesti (pN1) u odnosu na pacijente sa KP bez metastaza (pN0) (tabela 16).

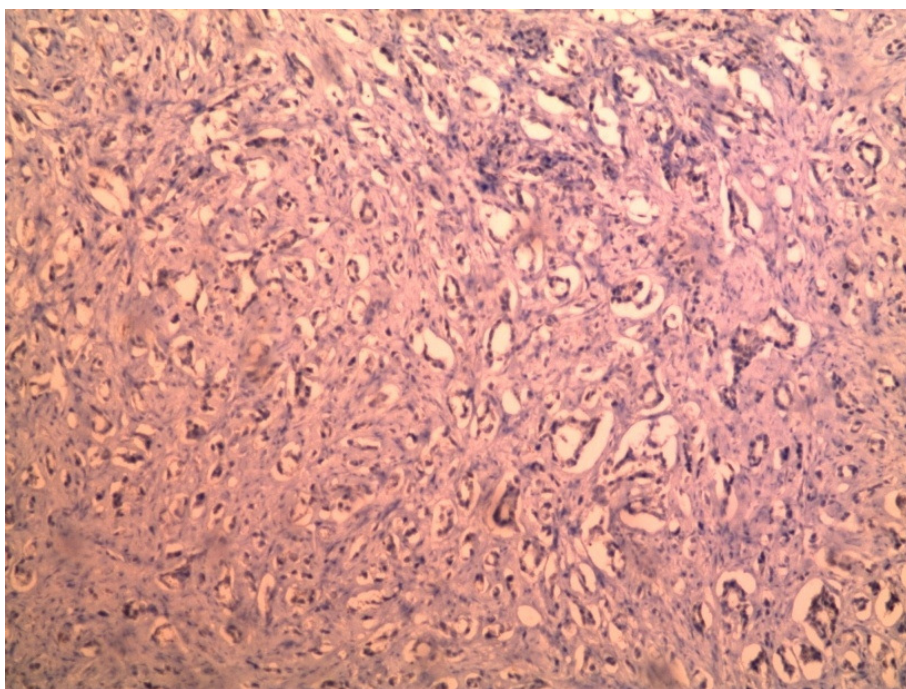
Odnos ekspresije VEGF i prisutnih metastaza u regionalnim limfnim čvorovima je prikazana na grafikonu 19.



Grafikon 19. Odnos ekspresije VEGF i prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.

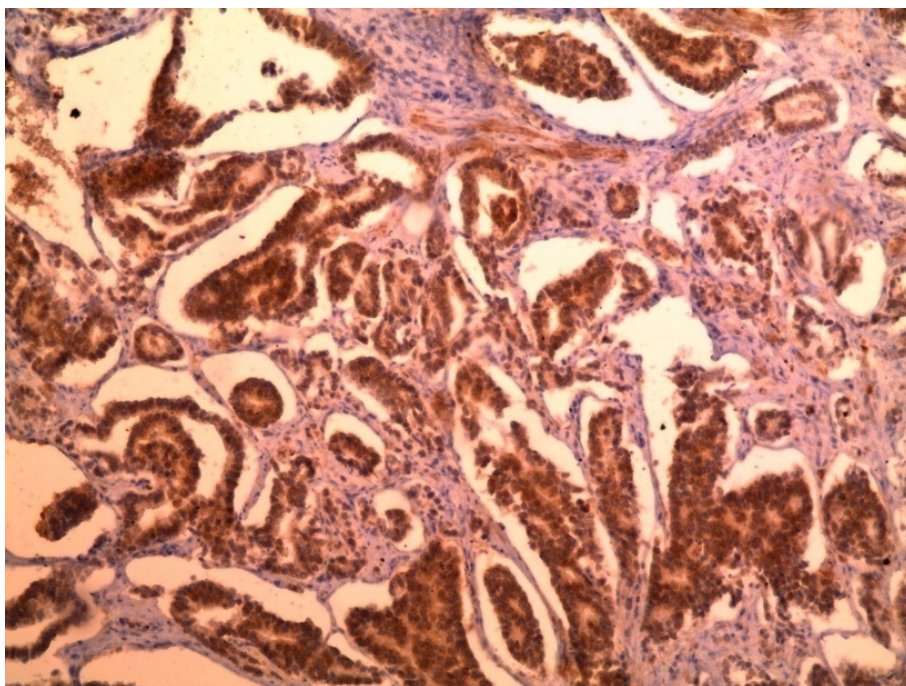
4.5.3. Demografske i kliničke karakteristike karcinoma prostate u odnosu na ekspresiju matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9)

Vrijednosti ekspresije MMP-9 određene su na osnovu jasne citoplazmatske smeđe prebojenosti hromogenim supstratom. Semikvantitativna analiza ekspresije MMP-9 izvršena je prema procentu pozitivnih tumorskih ćelija i intenzitetu obojenosti citoplazme, čijim je sabiranjem određen imunohistohemijski skor, i to: *skor 0 – nema reakcije u ćelijama, skor 1–2 – nizak stepen ekspresije* (slika 19), *skor 3–4 – umjeren stepen ekspresije* i *skor 5–6 – visok stepen ekspresije* (slika 20) (54).

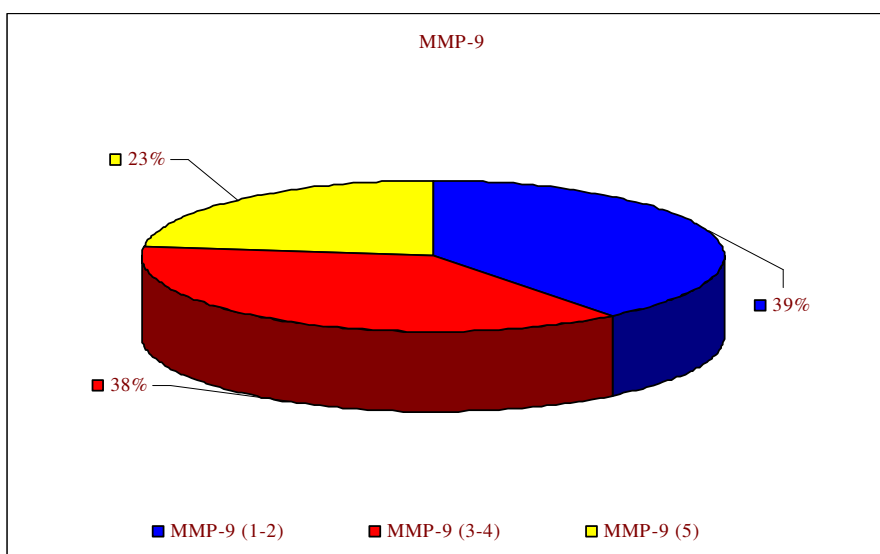


Slika 19. Niska ekspresija MMP-9 u karcinomima prostate (MMP-9 x 100)

Prosječna starost pacijenata sa niskom ekspresijom MMP-9 u tumorskim ćelijama je bila $66,38 \pm 4,65$ godina, sa umjerenom ekspresijom MMP-9 prosječna životna dob je iznosila $66,83 \pm 6,15$ godina, dok je prosječna životna dob kod pacijenata sa visokom ekspresijom MMP-9 iznosila $65,64 \pm 5,06$ godina. Razlika u starosti oboljelih od adenokarcinoma prostate u odnosu na nivo ekspresije MMP-9 u tumorskim ćelijama nije bila od statističkog značaja, pošto je vrijednost MANOVA $p = 0,809$, odnosno $p > 0,1$ (tabela 17).



Slika 20. Visoka ekspresija MMP-9 u karcinomima prostate (MMP-9 x 100)



Grafikon 20. Prikaz ekspresije MMP-9 u karcinomu prostate.

4.5.3.1. Odnos ekspresije MMP-9 i predoperativnih serumskih vrijednosti PSA

Prosječna vrijednost predoperativnog serumskog PSA iznosila je $14,34 \pm 10,24$ ng/ml, sa minimalnom vrijednošću 4,1, a maksimalnom 47,8 ng/ml kod pacijenata sa niskom ekspresijom MMP-9, a $12,74 \pm 8,22$ ng/ml i rasponom 3,4–35,0 ng/ml kod pacijenata sa umjerenom ekspresijom MMP-9, odnosno $23,30 \pm 23,07$ ng/ml i rasponom 2,8–73,3 ng/ml kod pacijenata sa visokom ekspresijom MMP-9.

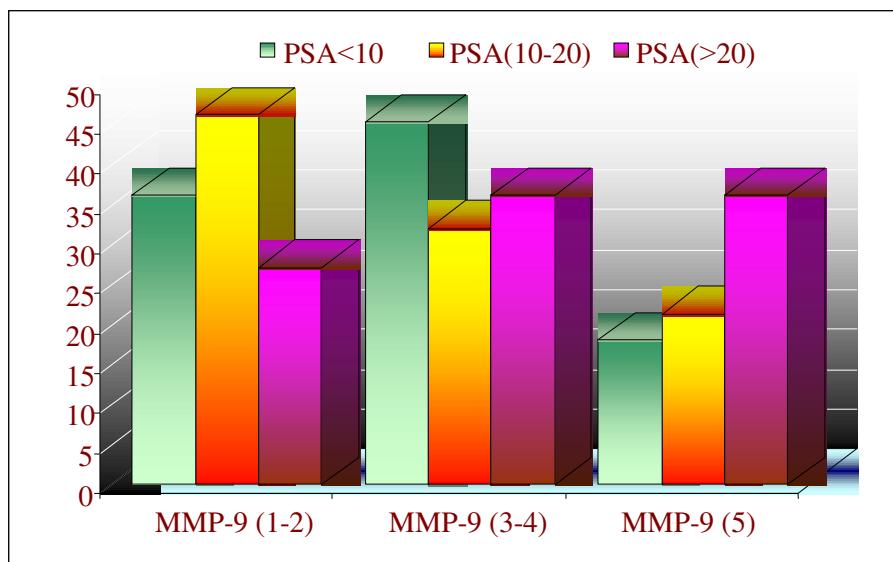
Poređenjem kategorija ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate i prosječne vrijednosti predoperativne serumske PSA, dokazana je statistički značajna razlika budući da je vrijednost MANOVA $p = 0,067$, tj. $p < 0,1$, što znači da je kod pacijenata sa povišenim vrijednostima sPSA bila statistički značajno veća ekspresija MMP-9 u tumorskom tkivu, nego kod pacijenata koji su imali manje vrijednosti predoperativnog sPSA (tabela 17).

Tabela 17. Prikaz ekspresije MMP-9 i kliničko patoloških karakteristika karcinoma prostate

	MMP-9 skor 1-2 n=24	MMP-9 skor 3-4 n=23	MMP-9 skor 5-6 n=14	Statistički značaj
Starost (prosjeck±SD)	$66,38 \pm 4,65$ (54,0-75,0)	$66,83 \pm 6,15$ (52,0-78,0)	$65,64 \pm 5,06$ (55,0-74,0)	$P=0,809$ MANOVA; $P > 0,1$
PSA ± SD	$14,34 \pm 10,24$ (4,1-47,8)	$12,74 \pm 8,22$ (3,4-35,0)	$23,30 \pm 23,07$ (2,8-73,3)	$p=0,067$ MANOVA; $P < 0,1$
< 10	8 (36,4%)	10 (45,5%)	4 (18,2 %)	$P=0,643$ χ^2 -test; $p > 0,1$
10-20	13 (46,4%)	9 (32,1%)	6 (21,4%)	
>20	3 (27,3%)	4 (36,4%)	4 (36,4%)	
Gleason skor GS				
<7	18 (75,0%)	3 (13,0%)	0 (0 %)	$p=0,000$ χ^2 -test; $p < 0,001$
≥ 7	6 (25,0%)	20 (87,0%)	14 (100%)	
Stadijum				
T2	19 (79,2%)	13 (56,5%)	5 (35,7%)	$p=0,027$ χ^2 -test; $p < 0,05$
T3	5 (20,8%)	10 (43,5%)	9 (64,3%)	
pN				
N0	24 (100%)	21 (91,3%)	10 (71,4%)	$p=0,017$ χ^2 -test; $p < 0,05$
N1	0 (0%)	2 (8,7%)	4 (28,6%)	

U grupi pacijenata sa niskom ekspresijom MMP-9, nizak stepen rizika sPSA imalo je osam pacijenata (36,4%), srednji stepen rizika sPSA 13 pacijenata (46,4%), a visok stepen rizika sPSA tri pacijenta (27,3%). U grupi pacijenata sa umjerenom ekspresijom MMP-9, 10 pacijenata (45,5%) je imalo nizak stepen sPSA, devet pacijenata (32,1%) srednji stepen rizika, a četiri pacijenta (36,4%) visok stepen rizika sPSA. U grupi pacijenata sa visokom ekspresijom MMP-9, četiri pacijenata (18,2%) je imalo nizak stepen sPSA, šest pacijenata

(21,4%) srednji stepen rizika, a četiri pacijenta (36,4%) visok stepen rizika sPSA. Poređenjem kategorija ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate i vrijednosti serumske PSA podijeljenih u grupe u odnosu na stepen rizika nije dokazana statistički značajna razlika pošto je $p > 0,1$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,643$ (tabela 17), (grafikon 21).



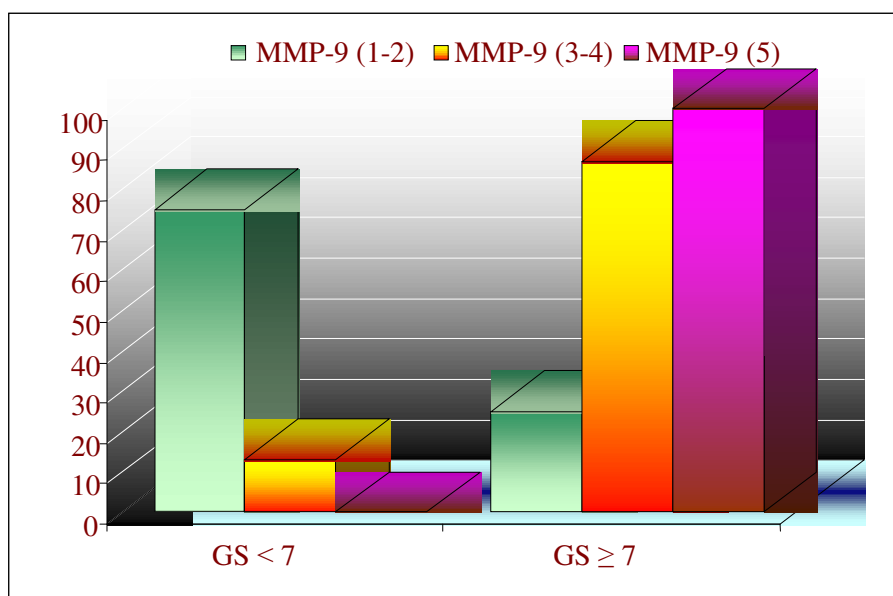
Grafikon 21. Odnos ekspresije MMP-9 i vrijednosti serumskog PSA.

4.5.3.2. Odnos ekspresije MMP-9 i patohistološkog gradusa karcinoma prostate – *Gleason* skor (GS)

U grupi pacijenata sa niskim GS ($GS < 7$), 18 pacijenata (75,0%) je imalo nisku ekspresiju MMP-9, tri pacijenta (13,0%) je pokazalo umjerenu ekspresiju MMP-9, dok nijedan pacijent (0%) nije pokazao visoku ekspresiju MMP-9. U grupi pacijenata sa $GS \geq 7$, 14 pacijenata (100%) je imalo visoku ekspresiju MMP-9, 20 pacijenata (87,0%) umjerenu ekspresiju, a šest pacijenata nisku ekspresiju MMP-9 (25,0%) (tabela 17).

Poređenjem vrijednosti kategorija ekspresije MMP-9 i patohistološkog gradusa karcinoma prostate izraženog u vidu *Gleason* skora (GS), uočena je statistički značajna razlika pošto je $p < 0,001$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,000$, tj. visoka ekspresija MMP-9 je bila statistički značajno češće prisutna u tumorskom tkivu loše diferentovanih karcinoma prostate ($GS \geq 7$) u odnosu na tkivo dobro ili umjereno diferentovanih KP.

Vrijednosti ekspresije MMP-9 u odnosu na *Gleason* skor (GS) prikazane su na grafikonu 22.



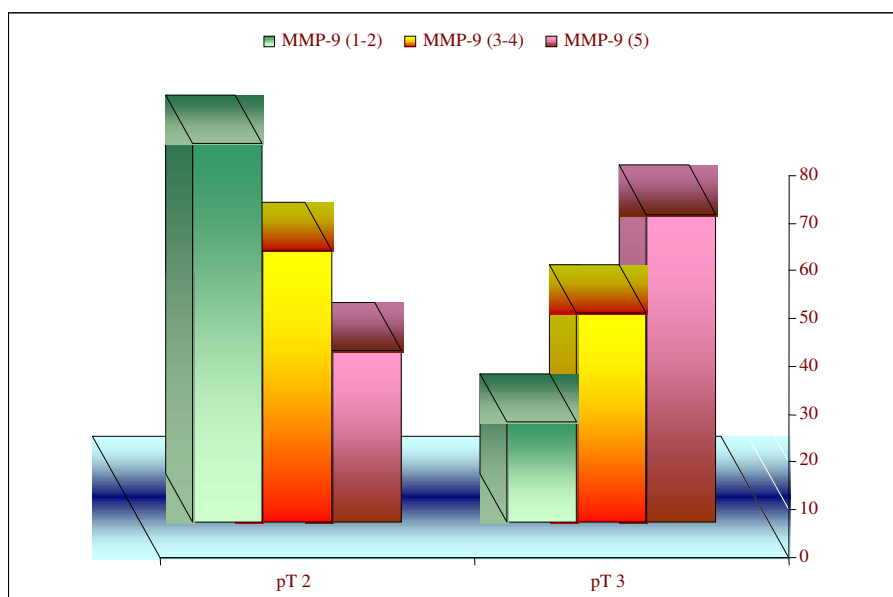
Grafikon 22. Odnos ekspresije MMP-9 i patohistološkog gradusa karcinoma prostate (*Gleason* skor, GS).

4.5.3.3. Odnos ekspresije MMP-9 i stadijuma bolesti kod oboljelih od karcinoma prostate

Visoka ekspresija MMP-9 u pacijenata čija bolest je bila u stadijumu T2, bila je prisutna u pet pacijenata (35,7%). Umjerena ekspresija MMP-9 kod pacijenata u T2 stadijumu zabilježena je u 13 slučajeva (56, 5%), a niska ili negativna ekspresija MMP-9 kod 19 pacijenata (79,2%). Kod pacijenata u T3 stadijumu bolesti, visoka ekspresija MMP-9 je potvrđena u devet pacijenata (64,3%), umjerena ekspresija u 10 (43,5%) i negativna ili slaba ekspresija u pet ispitanika (20,8%) (tabela 17).

Poređenjem vrijednosti kategorija ekspresije MMP-9 i stadijuma bolesti dobijena je statistički značajna razlika pošto je $p < 0,05$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,027$, što znači da je visoka ekspresija MMP-9 bila statistički značajno češće prisutna u tumorskom tkivu lokalno invazivnog KP (pT3) u odnosu na tkivo lokalno ograničenog KP (pT2) (tabela 17).

Vrijednosti ekspresije MMP-9 u odnosu na stadijum bolesti prikazani su na grafikonu 23.



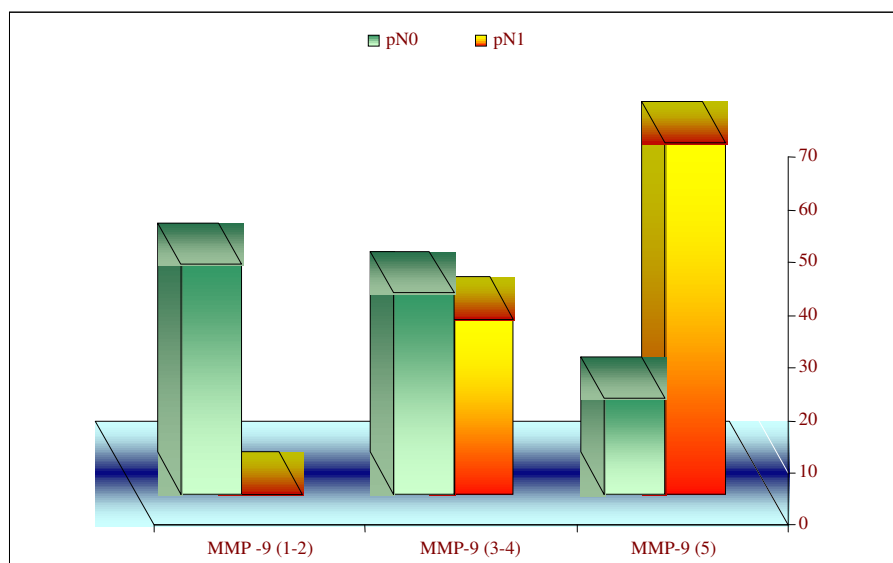
Grafikon 23. Odnos ekspresije MMP-9 i stadijuma bolesti.

4.5.3.4. Odnos ekspresije MMP-9 i pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima kod oboljelih od karcinoma prostate

Kod bolesnika bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, najviše pacijenata je bilo u grupi sa niskom ekspresijom MMP-9 – 24 oboljelih (100%), dok je umjerena ekspresija potvrđena kod 21 (91,3%) slučaja, a visoku ekspresiju je ispoljilo 10 (71,4%) oboljelih. Visoka ekspresija MMP-9 je uočena kod četvero (28,6%) oboljelih sa prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima, a nisku ekspresiju MMP-9 nije imao niti jedan (0%) pacijent. Umjerena ekspresija MMP-9 u oboljelih sa metastazama u limfnim čvorovima je nađena u dva (8,7%) slučaja (tabela 17).

Poređenjem vrijednosti kategorija ekspresije MMP-9 kod pacijenata kod kojih nisu nađene metastaze u regionalnim limfnim čvorovima sa pacijentima kod kojih su potvrđene metastaze u regionalnim limfnim čvorovima, nađena je razlika od statističkog značaja pošto je $p < 0,05$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,017$. To znači da je visoka ekspresija MMP-9 statistički značajno češće bila prisutna u tumorskom tkivu pacijenata koji su imali metastatski proširenu bolest (pN1), u odnosu na tkivo pacijenata sa KP bez metastaza (pN0) (tabela 17).

Odnos ekspresije MMP-9 i prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima prikazana je na grafikonu 24.



Grafikon 24. Odnos ekspresije MMP-9 i prisustva metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.

4.5.4. Odnos gustine krvnih sudova i proangiogenih faktora u adenokarcinomima prostate

4.5.4.1. Odnos gustine krvnih sudova i ekspresije VEGF u adenokarcinomima prostate

U grupi tumora sa visokom ekspresijom VEGF, prosječna gustina krvnih sudova je iznosila $59,80 \pm 19,20$ (39–89), a od 37 karcinoma sa visokim stepenom angiogeneze (MVD > 48), devet pacijenata (24,3%) je ispoljilo visoku ekspresiju VEGF (tabela 18) .

U grupi pacijenata sa umjerenom ekspresijom VEGF, prosječna gustina krvnih sudova je bila $47,16 \pm 13,11$ (29–70) (tabela 18), a od ukupno 24 pacijenta sa niskom gustinom krvnih sudova (MVD \leq 48), umjerenu ekspresiju VEGF je imalo 12 pacijenata (50,0%), dok je, od 37 pacijenata sa visokim stepenom angiogeneze, njih 19 (51,4%) pokazalo umjerenu ekspresiju VEGF (tabela 18).

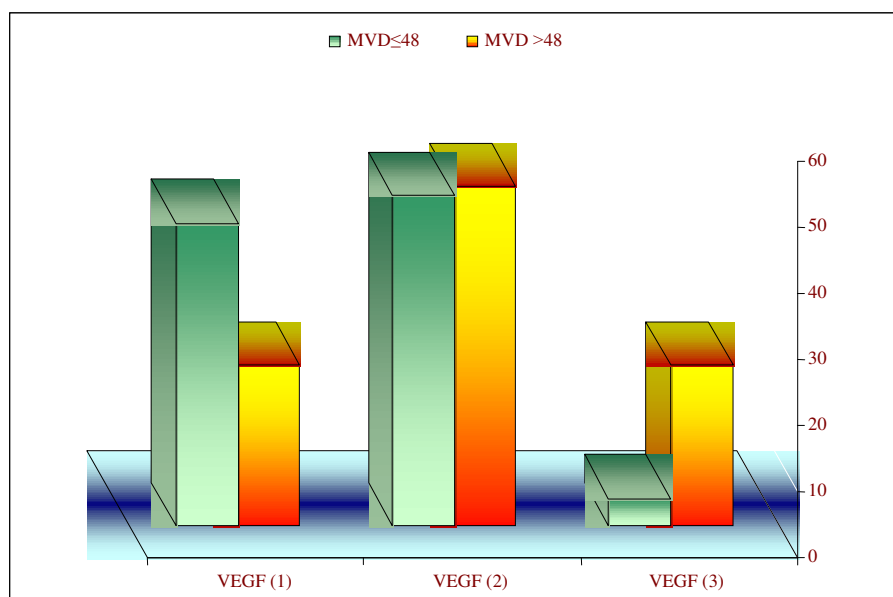
U grupi pacijenata sa negativnom ili niskom ekspresijom VEGF, prosječna gustina krvnih sudova je iznosila $39,90 \pm 8,72$ (28–60). Od ukupno 24 slučaja sa niskim stepenom angiogeneze (MVD \leq 48), visoka ekspresija VEGF je zabilježena kod svega jednog pacijenta (4,2%) (tabela 18).

Tabela 18. Odnos gustine krvnih sudova i proangiogenih faktora u karcinomima prostate

Proangiogeni faktori	Broj pacijenata	MVD \pm SD	MVD \leq 48 n= 24	MVD > 48 n = 37	Statistički značaj
VEGF					
Skor 1(-20%)	20	39,90 \pm 8,72 (28-60)	11 (45,8%)	9 (24,3%)	p = 0,059 χ^2 test; p < 0,1
Skor 2 (21-50%)	31	47,16 \pm 13,11 (29 -70)	12 (50,0%)	19 (51,4%)	
Skor 3 (> 50%)	10	59,80 \pm 19,20 (39-89)	1 (4,2%)	9 (24,3%)	
Statistički značaj		p=0,003MANOVA; p < 0,05			
MMP-9					
Skor 1-2	24	37,96 \pm 8,86 (28-60)	14 (58,3%)	10 (27,0%)	p = 0,023 χ^2 test; p < 0,05
Skor 3-4	23	48,35 \pm 10,26 (32-70)	8 (33,3%)	15 (40,5%)	
Skor 5	14	59,64 \pm 17,99 (29-89)	2 (8,3%)	12 (32,4%)	
Statistička značajnost		p=0,000MANOVA; p < 0,001			

Poređenjem vrijednosti prosječne gustine krvnih sudova koja je dobijena za svaku VEGF kategoriju, potvrđeno je postojanje razlike od visokog statističkog značaja budući da je vrijednost MANOVA p = 0,003, odnosno p < 0,05, što znači da KP sa većom gustinom krvnih sudova imaju statistički značajno češće i visoku ekspresiju VEGF u tumorskom tkivu, u odnosu na KP sa manjim brojem krvnih sudova (tabela 18).

Statistički je potvrđeno postojanje značajne razlike između grupa pacijenata sa niskim i visokim stepenom angiogeneze u odnosu na grupe pacijenata sa visokom, umjerenom i niskom ekspresijom VEGF na osnovu vrijednosti χ^2 – testa p = 0,059 , tj. p < 0,1, odnosno visoka ekspresija VEGF je statistički značajno češće bila prisutna u tumorskom tkivu KP koji su imali i visok stepen angiogeneze (MVD > 48), u odnosu na tumore sa niskim stepenom angiogeneze (tabela 18), (grafikon 25).



Grafikon 25. Odnos gustine krvnih sudova i ekspresije VEGF u karcinomima prostate.

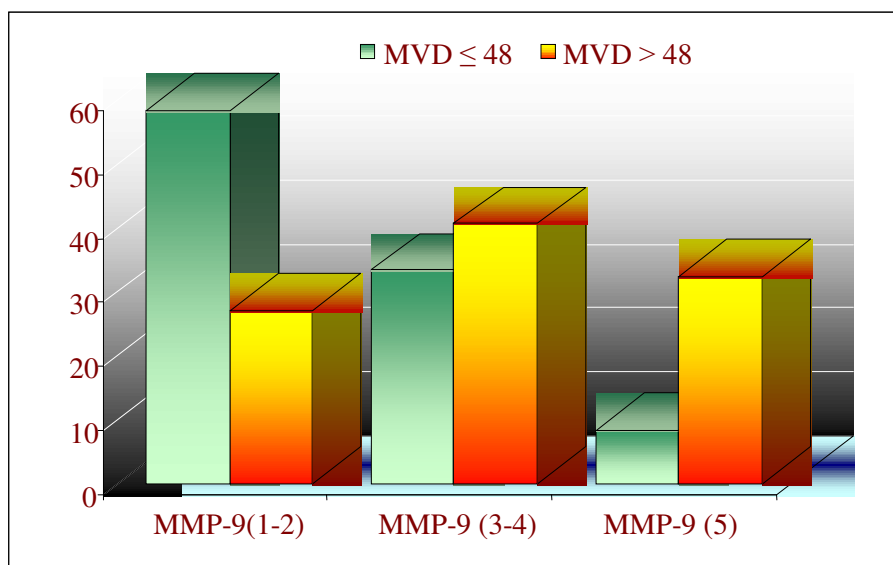
4.5.4.2. Odnos gustine krvnih sudova i ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate

Prosječna gustina krvnih sudova u pacijenata sa niskom ekspresijom MMP-9 iznosila je $37,96 \pm 8,86$ (28–60), dok su pacijenti sa visokom ekspresijom MMP-9 imali gustinu $59,64 \pm 17,99$ (29–89), a sa umjerenom ekspresijom $48,35 \pm 10,26$ (32–70) (tabela 18).

Poređenjem vrijednosti prosječne gustine krvnih sudova koja je dobijena za svaku MMP-9 kategoriju, potvrđeno je postojanje razlike od visokog statističkog značaja pošto je vrijednost MANOVA $p = 0,000$, tj. $p < 0,001$, odnosno visoka ekspresija MMP-9 je statistički značajno češće bila prisutna u KP sa većim brojem krvnih sudova, nego u tumorima sa nižom gustinom krvnih sudova (tabela 18).

Od ukupno 24 pacijenta sa niskom gustinom krvnih sudova ($MVD \leq 48$), niska ekspresija MMP-9 je nađena kod 14 (58,3 %) pacijenta, umjerena ekspresija kod osam pacijenata (33,3%), a visoka ekspresija kod dva pacijenta (8,3%). Od 37 pacijenata sa visokom gustinom krvnih sudova u tumorskom tkivu ($MVD > 48$), niska ekspresija MMP-9 je potvrđena kod 10 (27,0%) ispitanika, umjerena ekspresija kod 15 pacijenata (40,5%), a 12 pacijenata (32,4%) imalo je visoku ekspresiju (tabela 18).

Poređenjem odnosa kategorija gustine krvnih sudova i ekspresije MMP-9, nađena je razlika od statističkog značaja, pošto je vrijednost χ^2 – testa $p = 0,023$, tj. $p < 0,05$. To znači da je visoka ekspresija MMP-9 bila statistički značajno češće prisutna u tkivu KP sa visokim stepenom angiogeneze ($MVD > 48$), nego u tkivima tumora sa nižim stepenom angiogeneze (tabela 18), (grafikon 26).



Grafikon 26. Odnos gustine krvnih sudova i ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate

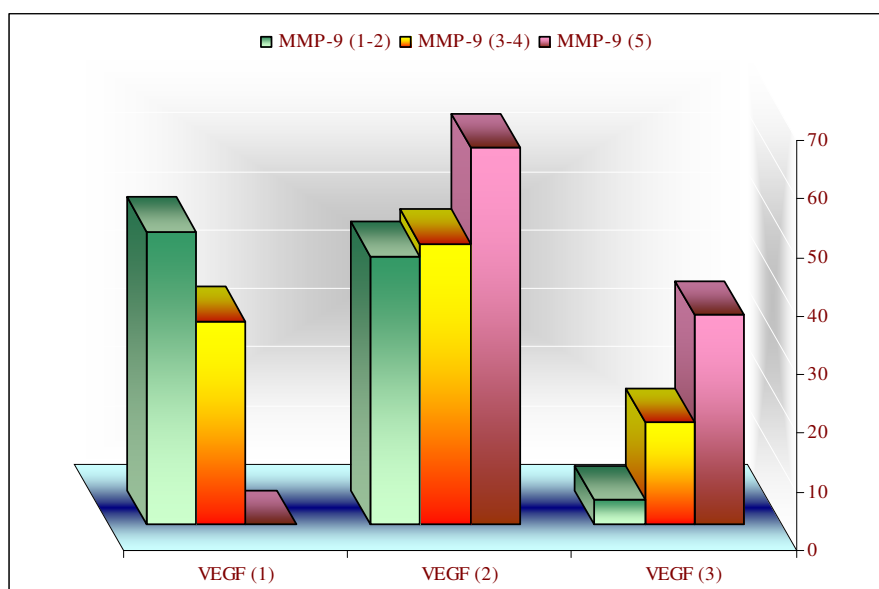
4.5.4.3. Odnos ekspresije VEGF i MMP-9 u karcinomima prostate

U grupi pacijenata sa niskom ekspresijom VEGF, nizak stepen ekspresije MMP-9 imalo je 12 pacijenata (60%), srednji stepen ekspresije MMP-9 osam pacijenata (40%), a visok stepen ekspresije MMP-9 nijedan pacijent (0%). U grupi pacijenata sa umjerenom ekspresijom VEGF, 11 pacijenata (35,5%) je imalo nizak stepen ekspresije MMP-9, 11 pacijenata (35,5%) srednji stepen ekspresije MMP-9, a devet pacijenata (29%) visok stepen ekspresije MMP-9. U grupi pacijenata sa visokom ekspresijom VEGF, jedan pacijent (10%) je imao nizak stepen ekspresije MMP-9, četiri pacijenata (40%) srednji stepen ekspresije MMP-9, a pet pacijenata (50%) visok stepen ekspresije MMP-9 (tabela 19).

Poređenjem kategorija ekspresije VEGF i kategorija ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate, dokazana je statistički značajna pozitivna korelacija, budući da je $p < 0,05$, odnosno vrijednost χ^2 – testa $p = 0,012$. Znači da je visoka ekspresija VEGF u tumorskom tkivu bila statistički značajno češće prisutna u KP koji su imali i visoku ekspresiju MMP-9, u odnosu na KP sa niskom ekspresijom MMP-9 (tabela 19, grafikon 27)

Tabela 19. Odnos ekspresije VEGF i ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate.

	MMP-9 skor 1-2	MMP-9 skor 3-4	MMP-9 skor 5	Statistički značaj
VEGF 1	12 (60,0%)	8 (40,0%)	0 (0%)	p=0,012 χ^2 -test; p < 0,05
VEGF 2	11 (35,5%)	11 (35,5%)	9 (29,0%)	
VEGF 3	1 (10,0%)	4 (40,0%)	5 (50,0%)	



Grafikon 27. Odnos ekspresije VEGF i ekspresije MMP-9 u karcinomima prostate.

4.6. MULTIVARIJANTNA ANALIZA ODNOSA KLINIČKOPATOLOŠKIH PARAMETARA, GUSTINE KRVNIH SUDOVA, EKSPRESIJE PROANGIOGENIH FAKTORA I STADIJUMA BOLESTI (pT2 vs pT3) KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD KARCINOMA PROSTATE

Budući da su sve dosad analizirane varijable (kliničkopatohistološke karakteristike KP, uključujući i *Gleason* skor, MVD, ekspresija proangiogenih faktora VEGF i MMP-9) bile

statistički visoko povezane sa patohistološki određenim stadijumom bolesti (pT), urađene su univarijantne analize (Pirsonov test kontingencije, koeficijent multiple korelacije) i multivarijantne analize (MANOVA, diskriminativna analiza) svih ovih varijabli u cilju određivanja faktora koji bi se pokazali najznačajnijim u predviđanju lokalno ograničenog KP (pT2), odnosno lokalno invazivnog KP (pT3).

Tabela 20. Značaj razlike između stadijuma (pT2 vs pT3) u odnosu na kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore.

Varijable	χ	R	F	p	k.dsk
Predoperativni sPSA (<10 vs 10-20 vs >20 ng/ml)	.128	.129	.999	.322	.027
MVD (≤48 vs >48)	.292	.305	6.059	.017	.012
VEGF (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	.489	.561	27.111	.000	.286
MMP - 9 (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	.326	.345	7.971	.006	.032
Gleason skor (<7 vs ≥7)	.456	.513	21.065	.000	.237
pN (pN0 vs pN1)	.379	.410	11.929	.001	.183

Legenda: Pirsonov koeficijent kontingencije (χ); koeficijent multiple korelacije (R); koeficijent diskriminacije (k.dsk).

Kao nezavisni prognostički parametri u predviđanju stadijuma bolesti (pT2 vs pT3) oboljelih od karcinoma prostate, u ovoj analizi pokazali su se *Gleason* skor ($p < 0,001$), VEGF ($p < 0,001$) i metastaze u limfnim čvorovima (pN1) ($p = 0,001$). Kao nezavisni prognostički parametri u procjeni pT mogli bi se smatrati i MMP-9 ($p < 0,05$) i MVD ($p < 0,05$) (tabela 20).

Na osnovu ovakvih rezultata moglo bi se očekivati da bi pacijenti sa loše diferentovanim KP ($GS \geq 7$) i pozitivnom ekspresijom VEGF u tumorskim ćelijama, kao i prisutnim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (pN1) imali viši stadijum bolesti (pT3). Veća vjerovatnoća da pacijenti imaju i viši stadijum bolesti bila bi i kod pacijenata sa KP koji ima veću gustinu krvnih sudova (MVD) i pozitivnu ekspresiju MMP-9.

U ovoj analizi se jedino predoperativni sPSA nije pokazao kao nezavisni prognostički parametar u procjeni pT ($p > 0,1$) (tabela 20).

4.6.1. Karakteristike i homogenost stadijuma (pT2 vs pT3) u odnosu na različite kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore

Na osnovu dosadašnje analize ispitivane populacije i rezultata da je $p = 0,000$ (diskriminativna analiza) utvrđeno je da postoji jasno definisana granica između stadijuma, tj. da je moguće odrediti karakteristike i homogenost svakog od stadijuma (pT2 vs pT3) u odnosu na različite kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore.

Tabela 21. Karakteristike i homogenost stadijuma (pT2 vs pT3) u odnosu na različite kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore

Varijable	pT2	pT3	dpr %
VEGF (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	VEGF (niska ekspresija)	VEGF (visoka ekspresija)	36.808
Gleason skor (<7 vs ≥ 7)	GS <7	GS ≥ 7	30.502
pN (pN0 vs pN1)	pN0	pN1	23.552
MMP9 (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	MMP9 (niska ekspresija)	MMP9 (visoka ekspresija)	4.118
Predoperativni sPSA (<10 vs $10-20$ vs >20 ng/ml)	-	-	3.475
MVD (≤ 48 vs >48)	MVD ≤ 48	MVD > 48	1.544
n/m	31/37	18/24	
%	83.78	75.00	

Legenda: hmg – homogenost; dpr % – doprinos obilježja karakteristikama

Svojstvo svakog subuzorka stadijuma u ispitivanoj populaciji najviše definiše VEGF jer je doprinos obilježja karakteristikama 36,81%, zatim slijedi GS (30,50%). Homogenost stadijuma pT2 je 83,78%, a pT3 75,0%. Odnosno, karakteristike pT2 ima 31 od 37 pacijenata, dok homogenost pT2 od 83,8% znači da šest pacijenata ima druge karakteristike, a ne karakteristike svoje grupe. Karakteristike pT3 ima 18 od 24 pacijenta, a homogenost je 75,0% jer šest pacijenata ima druge karakteristike. To znači da je kod pacijenata čije su karakteristike slične karakteristikama pT2, a nepoznata je njihova pripadnost stadijumu, moguće izvršiti prognozu sa pouzdanošću od 83,8%, da pripadaju baš pT2. (tabela 21).

Na osnovu prethodno iznesenih rezultata može se reći da su:

- karakteristike pT2: niska ekspresija *VEGF*, $GS < 7$, pN0, niska ekspresija MMP-9, $MVD \leq 48$, dok sPSA nema definisan nivo;
- karakteristike pT3: visoka ekspresija *VEGF*, $GS \geq 7$, pN1, visoka ekspresija MMP-9, $MVD < 48$, dok sPSA nema definisan nivo.

4.7. MULTIVARIJANTNA ANALIZA ODNOSA KLINIČKOPATOLOŠKIH PARAMETARA, GUSTINE KRVNIH SUDOVA, EKSPRESIJE PROANGIOGENIH FAKTORA I METASTAZA U REGIONALNIM LIMFNIM ČVOROVIMA (pN0 vs pN1) KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD KARCINOMA PROSTATE

Skoro sve dosad analizirane varijable (kliničkopatohistološke karakteristike KP, MVD, ekspresija proangiogenih faktora VEGF i MMP-9) bile su statistički značajno povezane sa patohistološki verifikovanim prisustvom metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN1). Urađene su univarijantne analize (Pirsonov test kontingencije, koeficijent multiple korelacije) i multivarijantne analize (MANOVA, diskriminativna analiza) svih ovih varijabli u cilju određivanja faktora koji bi se pokazali najznačajnijim u predviđanju metastatski proširenog KP (pN1).

Tabela 22. Značaj razlike između postojanja metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN0 vs pN1) u odnosu na kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore.

	χ	R	F	p	k.dsk
Predoperativni sPSA (<10 vs 10-20 vs > 20 ng/ml)	.159	.161	1.571	.215	.070
MVD (≤ 48 vs >48)	.257	.266	4.493	.038	.031
VEGF (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	.288	.301	5.861	.019	.003
MMP-9 (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	.344	.366	9.154	.004	.057
Gleason skor (<7 vs ≥ 7)	.233	.239	3.584	.063	.015
pT2 vs pT3	.379	.410	11.929	.001	.124

Legenda: Pirsonov koeficijent kontingencije (χ); koeficijent multiple korelacije (R); koeficijent diskriminacije (k.dsk).

Kao nezavisni prognostički parametar u predviđanju metastatski proširene bolesti (pN0 vs pN1) oboljelih od karcinoma prostate u ovoj analizi pokazao se samo stadijum

bolesti, pT ($p = 0,001$). Kao nezavisni prognostički parametri u procjeni pN mogli bi se smatrati i MMP-9 ($p < 0,05$), VEGF ($p < 0,05$) i MVD ($p < 0,05$), eventualno i GS ($p < 0,1$) (tabela 22).

U ovoj analizi jedino se predoperativni sPSA nije pokazao kao nezavisni prognostički parametar u procjeni pN ($p > 0,1$) (tabela 22).

4.8. MULTIVARIJANTNA ANALIZA ODNOSA KLINIČKOPATOLOŠKIH PARAMETARA, GUSTINE KRVNIH SUDOVA, EKSPRESIJE PROANGIOGENIH FAKTORA I HISTOLOŠKE DIFERENTOVANOSTI, GLEASON SKORA (< 7 vs ≥ 7) KARCINOMA PROSTATE

Sve dosad analizirane varijable (kliničkopatohistološke karakteristike KP, MVD, ekspresija proangiogenih faktora VEGF i MMP-9) bile su statistički značajno povezane sa histološkom gradusom KP, odnosno *Gleason* skorom. Urađene su univarijantne analize (Pirsonov test kontingencije, koeficijent multiple korelacije) i multivarijantne analize (MANOVA, diskriminativna analiza) svih ovih varijabli, u cilju određivanja faktora koji bi se pokazali najznačajnijim u predviđanju umjereno i dobro diferentovanih KP ($GS < 7$), odnosno loše diferentovanih KP ($GS \geq 7$).

Tabela 23. Značaj razlike između histološke diferentovanosti KP ($GS < 7$ vs ≥ 7) u odnosu na kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore.

	χ	R	F	p	k.dsk
Predoperativni sPSA (< 10 vs $10-20$ vs > 20 ng/ml)	.041	.042	.102	.751	.005
MVD (≤ 48 vs > 48)	.255	.264	4.420	.040	.025
VEGF (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	.523	.613	35.596	.000	.710
MMP-9 (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	.571	.696	55.291	.000	1.215
pT2 vs pT3	.456	.513	21.065	.000	.392
pN0 vs pN1	.233	.239	3.584	.063	.039

Legenda: Pirsonov koeficijent kontingencije (χ); koeficijent multiple korelacije (R); koeficijent diskriminacije (k.dsk).

Kao nezavisni prognostički parametri u predviđanju Gleason skora KP (< 7 vs ≥ 7) u ovoj analizi pokazali su se stadijum bolesti, pT ($p < 0,001$), VEGF ($p < 0,001$) i MMP-9

($p < 0,001$). Kao nezavisni prognostički parametri u procjeni GS mogao bi se smatrati i MVD ($p < 0,05$), eventualno i pN ($p < 0,1$) (tabela 23).

U ovoj analizi predoperativni sPSA nije se pokazao kao nezavisni prognostički parametar u procjeni *Gleason* skora ($p > 0,1$) (tabela 23).

4.9. KARAKTERISTIKE I HOMOGENOST HISTOLOŠKE DIFERENTOVANOSTI KP IZRAŽENE PUTEM *GLEASON* SKORA (< 7 VS ≥ 7) U ODNOSU NA RAZLIČITE KLINIČKOPATOLOŠKE PARAMETRE, MVD I PROANGIOGENE FAKTORE

Na osnovu dosadašnje analize ispitivane populacije i rezultata da je $p = 0,000$ (diskriminativna analiza) utvrđeno je da postoji jasno definisana granica između dvije grupe formirane na osnovu vrijednosti *Gleason* skora (< 7 vs ≥ 7), tj. da je moguće odrediti karakteristike i homogenost svake od ove dvije grupe u odnosu na različite kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore.

Tabela 24. Karakteristike i homogenost histološke diferentovanosti KP (*Gleason* skor < 7 vs ≥ 7) u odnosu na različite kliničkopatološke parametre, MVD i proangiogene faktore.

	GS < 7	GS ≥ 7	dpr %
MMP-9 (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	MMP-9 (niska ekspresija)	MMP-9 (umjerena i visoka ekspresija)	50.922
VEGF (niska vs umjerena vs visoka ekspresija)	VEGF (niska ekspresija)	VEGF (umjerena i visoka ekspresija)	29.757
pT2 vs pT3	pT2	pT3	16.429
pN0 vs pN1	pN0	pN1	1.635
MVD (≤ 48 vs >48)	MVD ≤ 48	MVD > 48	1.048
Predoperativni sPSA (<10 vs 10-20 vs > 20 ng/ml)	-	-	.210
n/m	21/21	36/40	
%	100.00	90.00	

Legenda: hmg – homogenost; dpr % – doprinos obilježja karakteristikama

Svojstvo svakog subuzorka histološke diferentovanosti KP, *Gleason* skora (< 7 vs ≥ 7) u ispitivanoj populaciji najviše definiše MMP-9 jer je doprinos obilježja karakteristikama

50,92%, zatim slijedi VEGF (29,75%). Homogenost grupe $GS < 7$ je 100%, a $GS \geq 7$ – 90%. Odnosno, karakteristike $GS < 7$ ima svih 21 pacijenata, dok homogenost $GS < 7$ od 100% znači da 0 pacijenata ima karakteristike druge grupe. Karakteristike $GS \geq 7$ ima 36/40 pacijenta, a homogenost je 90% jer četiri pacijenta imaju druge karakteristike. To znači da je kod pacijenata sa karcinomom prostate čije su karakteristike slične karakteristikama $GS < 7$, a nepoznata je njihova histološka diferentovanost, moguće izvršiti prognozu sa pouzdanošću od 100% (tabela 24).

Na osnovu prethodno iznesenih rezultata može se reći da su:

- karakteristike grupe $GS < 7$: niska ekspresija *VEGF*, pT2, pN0, niska ekspresija MMP-9, $MVD \leq 48$, dok sPSA nema definisan nivo;
- karakteristike grupe $GS \geq 7$: umjerena i visoka ekspresija *VEGF*, pT3, pN1, umjerena i visoka ekspresija MMP-9, $MVD > 48$, dok sPSA nema definisan nivo.

5. DISKUSIJA

Karcinom prostate jedinstven je u odnosu na većinu drugih karcinoma na dva načina (282). Kao prvo, KP ima dugu historiju rasta i razvoja, odnosno progredira mnogo sporije u odnosu na većinu karcinoma. Još uvijek se vode ozbiljne diskusije oko toga da li brojni KP uopšte treba da se liječe, zbog činjenice da će pacijenti umrijeti zbog nekih drugih razloga prije nego što im KP počne ugrožavati život (283). Drugo, KP ima vrlo pouzdan marker svog postojanja, sPSA, koji je jedinstven u cijeloj onkologiji. U skoro svakom slučaju, nivo sPSA će porasti prije nego se rekurentan KP bude mogao klinički detektovati. Dok su još uvijek kontroverzna stajališta oko toga da li je rastući sPSA pravi surogat za neuspjeh sa pojavom metastaza (koje neumitno vode smrtnom ishodu), sigurno je to da niko ne umire od KP bez porasta nivoa sPSA (284). Pacijenti sa nivoom sPSA koji se mjeri u stotinama i hiljadama skoro uvijek imaju metastatski uznapredovalu bolest, ako ne odmah, onda vrlo brzo ispoljenu. Odnosno, šanse da se razvije sistemska bolest su manje što je niži nivo sPSA (282).

Prema literaturnim podacima, KP je rijedak kod pacijenata mlađih od 40 godina (10). Najveća učestalost oboljenja u odnosu na dob bila je u sedmoj dekadi života. U brojnim studijama bolest se klinički dijagnostikovala kod pacijenata 44–95 godina starosti sa srednjom vrednošću 69,5 godina, odnosno u sedmoj deceniji života (73, 78, 85, 90–92, 279, 281, 285, 286). Ispitivanu populaciju u našoj studiji činio je 61 pacijent čija se životna dob kretala 52–78 godina, čija je srednja vrijednost iznosila $66,38 \pm 5,28$ godina.

Kliničari klasifikuju pacijente sa novootkrivenim KP na osnovu stadijuma i gradusa bolesti da bi odredili prognozu. Klasifikacija je posebno bitna za muškarce oboljele od KP zbog velike varijabilnosti u mogućnostima progresije bolesti. Tumorski stadij, gradus i prisustvo konkurentnih medicinskih rizika najmoćniji su pretkazivači preživljavanja (287). Kao rezultat široko rasprostranjenog skrininga pacijenata pomoću sPSA tokom posljednjih decenija, većina pacijenata oboljelih od KP se danas otkrivaju kao klinički lokalizovani karcinomi, veoma rijetko gradirani kao $GS < 6$ (287). PSA testiranje je ubrzalo vrijeme dijagnostikovanja KP za oko 5–10 godina. Sama ova činjenica donijela je dramatična poboljšanja u dužini preživljavanja zato što se doimalo da pacijenti žive dodatnih 5–10 godina sa postavljenom dijagnozom KP, čak i u odsustvu primjene bilo kakve terapije (288). Epidemiolozi su ovaj fenomen nazvali *”zero-time shift”* (doslovno prevedeno *”prebačaj na*

nulto vrijeme” ili ”povratak na nulu”), odnosno pacijentima je naizgled produžen život nakon postavljanja dijagnoze KP, a on to, u suštini, nije (289). U velikoj studiji provedenoj u više zemalja Evrope, koja je obuhvatila 182.000 muškaraca kojima je urađen skrining ranog detektovanja KP, pokazano je da je čak 50% pacijenata imalo tzv. klinički indolentan KP, odnosno, ovi pacijenti tokom svog života nisu ispoljili kliničke simptome KP (31).

Generalno, serumski PSA nivoi koreliraju sa većim volumenom tumora, uznapredovalim stadijumom bolesti i višim gradusom KP (1, 92, 285). Blackwell je našao značajnu pozitivnu korelaciju između sPSA i primarnog *Gleason* gradusa, procenta zastupljenosti GG 4 i 5, nuklearnog gradusa i sadržaja DNK u velikoj seriji uzoraka dobijenih nakon radikalne prostatektomije. KP sa GS 7 imali su značajno veću srednju vrijednost sPSA i volumen tumora u odnosu na KP sa nižim GS (< 7) (290). Međutim, Partin je u svom istraživanju zaključio da je sPSA od ograničene koristi u stadiranju lokalno ograničenog KP zbog uticaja gradusa tumora. Upoređujući volumen KP, a ne volumen prostate (PSA/volumen KP), našao je negativnu korelaciju sa GS. Iako KP viših gradusa stvaraju manje PSA u poređenju sa KP nižih gradusa, uopšte uzev, loše diferentovani tumori su udruženi sa većim vrijednostima sPSA budući da ovi tumori imaju tendenciju da budu veći i u uznapredovalim stadijumima (286). Postoje i izuzeci kad su KP veoma visokog gradusa toliko loše diferentovani da su nivoi sPSA disproporcionalno niski (1).

U našoj studiji nije dokazana statistički značajna povezanost nivoa sPSA (i kontinualnih i kategorijalnih vrijednosti) sa stadijumom bolesti (pT2 vs pT3), kao ni sa histološkom diferentovanošću KP izraženom *Gleason* skorom (< 7 vs ≥ 7). Serumski PSA je u našoj studiji, kao i u nekim drugim studijama, pokazao da ne može objezbijediti korisne patološke korelacije posmatrano za svakog pacijenta pojedinačno (285, 291–294). Značajno preklapanje vrijednosti sPSA između različitih stadijuma (pT2 vs pT3) nije omogućilo razgraničavanje ovih vrijednosti u odnosu na lokalno ograničen KP, odnosno lokalno invazivni KP.

Jednako važna, ali suptilnija pojava koja bi mogla takođe djelovati na ishod KP je tzv. *Will Rogersov* fenomen (295). Iako se *Gleason* sistem određivanja gradusa karcinoma sam po sebi nije promijenio od 1980-ih, njegova primjena jeste. Nekoliko faktora, uključujući pojavu PSA testiranja, transrektalnu ultrasonografiju, pištolj za uzimanje iglenih biopsija prostate i dramatično povećanje izvođenja RP, uzrokovali su statistički značajno povećanje vrijednosti

GS karcinoma prostate na iglenim biopsijama, što je zauzvrat dovelo do naizgled statistički značajnog poboljšanja u preživljavanju pacijenata u brojnim studijama (287). Razlika u primjeni GS u ovim studijama odraz je promjene u načinu interpretacije uzoraka IB prostate od strane patologa, prije nego selektivno identifikovanje agresivnijih KP putem PSA testiranja (287). Epstein je zaključio da usljed sve češće povišenih vrijednosti GS u karcinomima prostate dobijenih nakon RP u odnosu na GS određene na predoperativnim iglenim biopsijama prostate, GS 2–4 ne bi trebalo dijagnostikovati na iglenim biopsijama prostate (296). Nakon toga, Pan je preporučio modifikaciju *Gleason* skor sistema koja bi trebalo da reflektuje i prisustvo relativno malih područja loše diferentovanog karcinoma (tzv. tercijarni *Gleason* gradus) (297). Još uvijek nema konsenzusa oko upotrebe tercijarnog *Gleason* gradusa, odnosno, da li će se on i dalje voditi kao tercijarni GG, ili bi ga trebalo uvrstiti u *Gleason* skor kao sekundarnu komponentu budući da predstavlja najagresivniju komponentu KP (u slučaju da se radi o GG5). Ukoliko se ovaj prijedlog prihvati, primjena ove modifikacije će dodatno doprinijeti promjeni u tumačenju GS. Dio ili sva prijavljena poboljšanja u ishodu bolesti prilikom poređenja savremenih rezultata sa onim tzv. istorijskim rezultatima iz prošlog vijeka u novijim istraživanjima, u suštini predstavljaju rezultat reklasifikacije *Gleason* skora. Odnosno, danas patolozi ne interpretiraju *Gleason* skor na isti način kao što se radilo decenijama prije. Ukoliko se dovoljno obazrivo ne tumače rezultati poboljšanja u kliničkom ishodu bolesti u poređenju za rezultatima istorijskih istraživanja, doći će do pojave statističkog artefakta (287). Klinički ishodi KP mogu biti pod uticajem upravo prethodno objašnjenog načina u interpretaciji *Gleason* skora danas (298). Danas kliničari u svojoj praksi rijetko liječe pacijente oboljele od KP kojima je određen GS 2-5, dok je ovaj GS prije dvije decenije bio rutinski određivan. Predložene su dvije hipoteze koje bi mogle objasniti ovaj fenomen. Jedno objašnjenje pretpostavlja da PSA testiranje identifikuje muškarce koji imaju agresivniji KP, dok druga hipoteza se oslanja na to da današnji patolozi teško dijagnostikuju niske GS na iglenim biopsijama prostate, budući da su vrijednosti GS često veće na odgovarajućim uzorcima dobijenim radikalnom prostatektomijom (296). Ukoliko se pokaže da je posljednje objašnjenje tačno, ova promjena u interpretaciji GS će dovesti do naizgled poboljšanog ishoda bolesti, koje to u suštini nije.

Postoji značajno neslaganje između *Gleason* gradusa određenih na iglenoj biopsiji u odnosu na RP. IB potcenjuju gradus tumora u 33–45% slučajeva, odnosno precenjuju ga u 4–32% slučajeva (10, 299, 300). Greške u gradiranju su uobičajene kod biopsija sa malom

količinom tumora i tumorima niskog gradusa (301). Kod muškaraca sa "visoko rizičnim" KP (više sPSA koncentracije ili više pozitivnih iglenih biopsija) bila je veća mogućnost povećanja vrijednosti GS nakon RP, ali je povećanje broja iglenih biopsija redukovalo mogućnost precjenjivanja (302). Greške u gradiranju na iglenim biopsijama nisu korelirale sa količinom adenokarcinoma na bioptičkom uzorku ili sa greškama u kliničkom stadiranju bolesti. U jednoj studiji tačnost IB je bila najveća u procjeni primarnog *Gleason* gradusa, ali je sekundarni GG bio nedovoljno precizan u predviđanju GS na RP u cilju obezbjeđivanja prognostičkih parametara naročito u kombinaciji sa primarnim GG (303). Kramer je uporedio GS određen na IB sa odgovarajućim nodalnim metastazama i našao je tačnu korelaciju u 17 od 42 slučaja (40%) (304). Nedostatak anaplastičnih oblika u metastatskim depozitima implicirao je da su neki drugi faktori, a ne gubitak diferencijacije, bili odgovorni za sposobnost ćelija da metastaziraju. Među pacijentima sa GS 8, 45% je imalo niži GS na uzorcima dobijenim nakon RP i shodno tome povoljniju prognozu i ishod bolesti (305).

U našem istraživanju, vrijednosti GS prije i poslije operacije razlikovale su se kod 40,98% pacijenata. Predoperativne vrijednosti GS (uzorci iglenih biopsija) bile su manje u odnosu na postoperativne vrijednosti kod 39,34% pacijenata, sa najvećim brojem slučajeva kod GS 6 određenim predoperativno na IB koji su postoperativno procijenjeni kao GS 7. Kod jednog pacijenta (1,63%) predoperativne vrijednosti GS (GS8) bile su veće nego postoperativne vrijednosti GS (GS7).

Sa reprezentativnijim uzimanjem uzoraka IB (brojniji uzorci i igla većeg promjera) veća je mogućnost da će se i na uzorku IB detektovati komponenta KP višeg gradusa, a samim tim i smanjiti mogućnost "potcjenjivanja" GS na IB u odnosu na GS na RP. Takođe je manja mogućnost potcjenjivanja KP kod manje uznapredovalih KP indiciranih nižim vrijednostim sPSA i nižim kliničkim stadijumom bolesti (1). Tri su moguća velika razloga zašto se *Gleason* gradusi određeni na uzorcima IB i RP razlikuju. Jedan je greška patologa, gdje je GS netačno određen. *Gleason* scoring sistem je subjektivan budući da ga procjenjuje patolog na osnovu izgleda tumora. Slaganje u određenim GS za pojedine KP među uropatolozima je oko 70% (306). Takođe, GS određen na iglenoj biopsiji prostate predstavlja samo relativnu prezentaciju onog koji će biti određen nakon RP. Tačna korelacija između GS određenog na iglenoj biopsiji i onog na RP iznosi oko 50%; svakako da i veći volumen tumorskog tkiva dobijenog RP omogućava tačnije određivanje, što se odnosi i na određivanje

stadijuma bolesti koje je daleko tačnije i preciznije na uzorcima RP, nego klinički određen stadijum bolesti (307). Drugi razlog ovakvoj razlici su granični slučajevi. Budući da postoji kontinuum između gradusa, postoje slučajevi koji su tačno na prelazu iz jednog gradusa u drugi, gdje će postojati različito mišljenje različitih patologa, pa čak i samog patologa ponekad. Treći mogući i čest razlog predstavlja greška u uzimanju uzoraka, a najčešća je kad se komponenta višeg gradusa nalazi u uzorku dobijenom nakon RP, a nema je na materijalu dobijenim IB, a to se tipično javlja kad se IB biopsija gradira kao GS 6 (3 + 3), a na uzorku RP pojavljuje se komponenta GG 4 (GS 3 + 4 = 7) koje nije bilo na uzorku IB, kao što je slučaj i u našoj studiji (282).

Sudeći po brojnim univarijantnim i multivarijantnim studijama, gradus je jedan od najjačih i najkorisnijih prognostičkih faktora koji predviđaju stadijum (1, 10, 308, 309). Ova mogućnost predviđanja može se primijeniti na skoro svako određivanje patološkog stadijuma, uključujući EPE, SVI, metastaze u limfne čvorove i koštane metastaze. Pacijenti se u istraživanjima obično grupišu prema GS kao niskorizični (GS < 7), srednje rizični (GS 7) i visokorizični (GS 8–10). U nekim studijama pacijenti sa GS 7 imaju ishod bolesti i ponašanje KP kao i oni sa GS 8–10, pa ih pojedini istraživači stavljaju u istu grupu (91). Brojni podaci ukazuju da pacijenti GS 8–10 imaju visok rizik od recidiva oboljenja što samo po sebi zahtijeva što raniju primjenu adjuvantne terapije. Po nekim istraživačima, $GS \geq 8$ na IB jeste snažan prognostički faktor koji upućuje na mogućnost postojanja nodalnih metastaza (310). Svakako da i drugi faktori, poput predoperativnog sPSA i patohistološkog nalaza, imaju uticaj na konačni ishod visokogradusnih karcinoma (282). I sPSA i GS mogu obezbijediti značajne prognostičke podatke kad su njihove vrijednosti na visokom (sPSA > 20 ng/ml, GS 8–10) ili niskom (sPSA < 4 ng/ml, GS 2–4) nivou (13, 14). Međutim, većina pacijenata se nalazi upravo na sredini, tj. sa GS 7 i intermedijarnim nivoom sPSA (285).

Istraživanje Kuniyasu, kao i većina ostalih studija, navodi da su KP sa GS 6 bili najčešće lokalno ograničeni, neinvazivni, za razliku od GS 8–10 KP koji su bili najčešće udruženi sa lokalno invazivim i proširenim KP, a time i lošom prognozom. Karcinomi prostate sa GS 7 su bili heterogeni, dijelom lokalno ograničeni (60%), a dijelom lokalno uznapredovali, invazivni (40%) (285). I u našoj studiji nađena je statistički visoka značajna povezanost stadijuma bolesti i GS karcinoma prostate, odnosno 95,8% pacijenata sa $GS \geq 7$ imalo je lokalno uznapredovalu bolest (pT3). Takođe su i svi pacijenti kojima je utvrđeno

postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN1) imali loše diferentovan KP (GS ≥ 7). Uprkos optimističnim mišljenjima da bi određivanje *Gleason* skora moglo predvidjeti stadijum bolesti, vrijednost samog GS kao prognostičkog faktora nije dovoljno visoka da bi dozvolila njegovu primjenu na svakog pacijenta ponaosob, naročito kod onih pacijenata sa umjereno diferentovanim adenokarcinomom prostate (GS 5–6) (10).

Rana detekcija KP u porastu, kao i posljedična radikalna operacija koja ima za cilj kompletnu eradikaciju karcinoma prostate, pojačale su potragu za metodama i markerima koji bi se mogli primijeniti na inicijalnu iglenu biopsiju i predvidjeti patološki stadijum i ishod bolesti. Potreba za korektnim preoperativnim određivanjem stadijuma naročito je naglašena nakon skorašnjih studija velikih serija tumora klinički dijagnostikovanih kao lokalizovani (T2), a od kojih je oko 24–40%, po nekim autorima i do 60%, nakon RP imalo patološku konfirmaciju ekstraprostatično i metastatski proširene bolesti (pT3, pN1) (73, 86, 291, 294, 311–313). Sa druge strane, 8–45% pacijenata oboljelih od karcinoma prostate je preoperativno pogrešno procijenjeno u stadijumu T3 (314). U našem istraživanju, u stadijumu pT2 nakon učinjene radikalne prostatektomije dijagnostikivano je 61%, a u stadijumu pT3 39% pacijenata, dok je 10% pacijenata imalo metastatski proširenu bolest. Po nekim istraživanjima, ekstraprostatična ekstenzija karcinoma nakon učinjene radikalne prostatektomije povećava rizik recidiva bolesti (čak kod 30% pacijenata) unutar 10 godina, mada neki pacijenti imaju bolji postoperativni tok od drugih i predviđanje ishoda bolesti je često teško u ovoj grupi, kao što je i primjena adjuvantne terapije kontroverzna zbog mogućeg nepotrebnog terapijskog morbiditeta (291).

U pokušaju da se predvidi rizik recidiva tumora nakon RP, brojni drugi mogući modifikujući rizični faktori se izučavaju. Međutim, iako ovi faktori pokazuju da su značajni u multivarijantnim analizama, oni se nisu dokazali kao nezavisni prognostički parametri. Smatra se da bi njihova upotreba bila korisna upravo kod one grupe pacijenata koji i inače imaju granični rizik, gdje bi prisustvo ili odsustvo ovih faktora moglo pomoći u konačnoj odluci o načinu liječenja tih pacijenata, odnosno primjeni postoperativne adjuvantne terapije, koja je kod KP još uvijek kontroverzna, za razliku od skoro svih vrsta malignih oboljenja gdje se ona rutinski primjenjuje (282). Primarni cilj je redukcija broja smrtnih slučajeva uzrokovanih KP, odnosno njegovim metastazama. Više od 27.000 muškaraca umire od KP svake godine (315). Budući da prilikom dijagnostikovanja KP mali broj pacijenata (oko 4%)

ima metastatski proširenu bolest, skoro svi smrtni ishodi nastali kao posljedica KP danas javljaju se kod muškaraca kod kojih se metastatska bolest pojavila nakon primarne intervencije. Znači, kod više od 25.000 muškaraca pojaviće se metastatski proširena bolest od koje će i umrijeti, a od kojih je oko pola bilo podvrgnuto radikalnoj operaciji (316). Danas je primarni cilj identifikacija pacijenata koji imaju velik rizik nastanka metastaza radi primjene adekvatne adjuvantne terapije. U studiji Hopkinsa nađeno je da GS, vrijeme od RP do pojave recidiva, kao i vrijeme udvostručenja sPSA, mogu predvidjeti rani razvoj metastatske bolesti. Iako se KP dugo razvija, ova studija je pokazala da će se skoro kod svih muškaraca sa rastućom sPSA postoperativno, a kod 70% njih tokom 10 godina, razviti metastatski proširena bolest koja će se završiti fatalno (317). Pacijenti sa najvišim stepenom rizika su upravo oni koji imaju najveću incidencu biohemijskog neuspjeha (porast postoperativnog sPSA) i to u prvih nekoliko godina nakon RP. U identifikaciji pacijenata sa visokim rizikom razvoja metastatske bolesti, sPSA nije samo marker rekurentne bolesti, već je jedan od tri najšire prihvaćena prognostička markera za pojavu recidiva KP, uz gradus (najčešće u vidu GS) i stadijum KP (patološki je daleko precizniji u odnosu na klinički stadijum). Iako je svaki od ova tri faktora pojedinačno nezavisni prognostički parametar, ipak su sva tri zajedno u kombinaciji daleko moćnija (282). Pojedini autori su na osnovu kombinacije ova tri faktora napravili tzv. "nomograme" koji mogu predvidjeti patološki stadijum, odnosno ishod bolesti (311). Iako ovi nomogrami mogu donekle pomoći u procjeni rizika razvoja metastaza kod pacijenata individualno, oni ipak ne mogu tačno predvidjeti ishod bolesti za svakog pacijenta pojedinačno (285).

Ipak, kad se odlučuje o (adjuvantnom) tretmanu lokalno ograničene ili lokalno uznapredovale bolesti, biološko ponašanje tumora je najčešće teško tačno procijeniti. Stoga se i javila potreba za otkrivanjem novih markera koji bi mogli što tačnije predvidjeti ponašanje tumora i posljedični ishod bolesti.

Otkad je 1971. godine Folkman ustanovio da tumorski rast i diseminacija ovise o angiogenezi i da ovi tumori zajedno sa zapaljenskim ćelijama i pripadajućom vaskulaturom čine kompleksni eko-sistem koji komunicira putem hemijskih signala, urađene su brojne studije u cilju podržavanja ove teorije (119). Utvrđeno je da je povećana vrijednost MVD udružena sa povećanom tumorskom agresivnošću, patološkim stadijumom ili ishodom bolesti u različitim tumorima, uključujući tumore dojke, pluća, debelog crijeva, glave i vrata,

melanom, centralnog nervnog sistema (212, 318, 319). MVD varira široko ovisno o tipu tumora; svi tumori, pa i oni sa najmanjom MVD, ovise o angiogenezi. Povećanje MVD ne mora obavezno koincidirati sa početkom angiogeneze, glavnog obilježja neoplastične transformacije. MVD ne odražava angiogenu aktivnost ili angiogenu ovisnost tumora, već je ono mjerilo broja krvnih sudova određenih na mikroskopskim poljima na velikom uveličanju koji reflektuju interkapilarnu distancu (ID na kapilarnom nivou predstavlja ravnotežu između angiogenih faktora i stimulatora i inhibitora, kao i neangiogenih faktora poput kiseonika i hranjivih materija) (212). Ukupan broj krvnih sudova vjerovatno i nije snažan indikator neoangiogeneze, zato što MVD reflektuje i novu i već postojeću vaskulaturu (122). Identifikacija krvnih sudova ne odražava neophodno krvni protok kroz tumor. Povećan intersticijalni pritisak koji komprimuje krvne sudove, zajedno sa izmijenjenom reologijom krvnih sudova, rezultuje intermitentnim i reverznim protokom, a arteriovenski šantovi premoštavaju velika tumorska područja koje ne mogu otvoriti neovaskulaturu budući da ona nije inervirana i neuobičajeno odgovara na vazoaktivne stimuluse (122). Nekoliko studija je pokazalo značajnu korelaciju između MVD i krvnog protoka mjenenog kolor doplerom (320).

Metaboličke potrebe karcinomskih ćelija variraju ovisno o tkivu porijekla i promjeni tokom progresije tumora (u tumorima je potrošnja kiseonika često značajno niža u odnosu na okolno normalno tkivo). Tumori prostate pokazuju veću MVD nego normalno tkivo koje ih okružuje. Tumorske ćelije dobro podnose hipoksiju i mogu biti otporne na apoptozu u uslovima hipoksije. I snižena potražnja tumorskih ćelija za kiseonikom i njihova tolerancija u uslovima hipoksije promovišu povećanu interkapilarnu udaljenost u tumorima u odnosu na okolne normalne ćelije. Iako količina totalne tumorske vaskularizacije mora rapidno porasti u brzorastućim tumorima da bi podržala izuzetno uvećanje tumorske mase, gustina krvnih sudova ne mora biti velika (321).

Literatura sadrži brojne konfliktne studije koje se tiču mogućnosti da se na osnovu angiogeneze predvidi patološki stadijum za pacijente sa klinički lokalizovanim adenokarcinomom prostate. U brojnim studijama dokazana je povezanost između MVD i GS, stadijuma bolesti, kao i mogućnosti razvoja metastatski proširene bolesti u budućnosti, dok u drugim studijama MVD u odnosu na pT nije pokazala superiornu prediktivnu vrijednost (tabela 25).

Većina istraživača ipak procjenjuje da povećane vrijednosti MVD imaju prognostički značaj u procjeni biološkog ponašanja karcinoma prostate. U Weidnerovom istraživanju pacijenti sa metastazama imali su duplo veće vrijednosti MVD u odnosu na lokalno invazivne KP, a veće vrijednosti MVD bile su povezane sa većim GS, ali samo kod loše diferentovanih KP (322). Offersen u svojoj studiji ukazuje na to da je maksimalna vrijednost, a ne srednja vrijednost MVD, značajno udružena sa procjenom preživljavanja pacijenata oboljelih od KP (323). Multiinstitucionalnom studijom koju je predvodio Bostwick optimizovana MVD (logOMVD) bila je statistički značajno povezana sa GS i predoperativnim vrijednostima sPSA, kao i sa pT3. Međutim, predviđanje ishoda bolesti putem OMVD nije se odnosilo i na pacijente koji su imali lokalizovano oboljenje (pT2) i GS 6–9 (92).

U dosad najvećoj studiji (tkivnoj mikroerej studiji, TMA) koristeći uzorke 3261 RP, Erbersdobler dokazuje univarijantnim analizama značajnu povezanost povećanja MVD i uznapređovalog stadijuma bolesti, pT3, kao i većeg GS ($GS \geq 7$), ali i ukazuje na postojanje značajnih razlika između tumora s obzirom na njihovu lokalizaciju, odnosno da KP prisutni u tranzicionalnoj zoni (TZ) imaju nižu MVD u odnosu na tumore periferne zone (PZ) prostate. Međutim, MVD se nije pokazao kao nezavisan prognostički parametar u multivarijantnim analizama, već je usko povezan sa drugim faktorima doprinoseći tumorskoj agresivnosti. Autor napominje, da iako antiangiogena terapija za KP još nije ustanovljena, a ukoliko bi se počela primjenjivati, poznavanje razlika u MVD između individualnih KP i njihove lokalizacije bi imalo značaja (324). Steiner je pokazala slabu povezanost između mRNA individualnih endotelnih faktora (CD31, CD 34) u KP i histološki određene MVD, iako su veće vrijednosti hitološki određene MVD bile statistički značajno povezane sa većim GS i uznapređovalim stadijumom bolesti (325).

U našem istraživanju veće vrijednosti MVD (kontinualne i kategorijalne) bile su povezane sa lošije diferentovanim KP, odnosno $GS \geq 7$, sa većim stadijumom bolesti (pT3), tj. bile su veće kod metastatski proširene bolesti (pN1). Ovakvi rezultati potvrđeni su i u radovima brojnih autora (86, 90, 91, 292, 294, 326-328). U našoj studiji nije nađena statistički značajna povezanost sa predoperativnim vrijednostima sPSA, što je u skladu sa pojedinim literaturnim navodima (291–293).

Za razliku od prethodno izloženih rezultata istraživanja, pojedini autori su u svojim studijama došli do sasvim suprotnih zaključaka. Silberman je u svojoj studiji utvrdio

korelaciju između MVD i progresije tumora nakon RP, ali ne i patološkog stadijuma kod pacijenata kod kojih je GS 5–7 (329). Povezanost MVD sa stadijumom bolesti, kao i metastazama, nije dokazana u radu Matsushima, dok je povezanost između MVD i *Gleason* gradusa bila statistički skoro signifikantna (330).

Rubin takođe nije našao povezanost MVD sa GS, stadijumom tumora, stanjem hirurških resekcionih rubova ili invazijom sjemenih kesica, ali ni sa povećanim postoperativnim vrijednostima sPSA kao znaka recidiva bolesti (293).

Krupski je, koristeći procjenu p53, retinoblastoma, chromogranin A i MVD, multivarijantnom analizom utvrdio da vrijednosti MVD nisu pokazale bitnu prognostičku značajnost u poređenju sa p53 i retinoblastomom u procjeni preživljavanja pacijenata (220). U svom istraživanju Gettman nije našao povezanost OMVD sa DNA ploidijom, *Gleason* gradusom, patološkim stadijumom, ni predoperativnim vrijednostima sPSA, niti je primjenom univarijantnih i multivarijantnih analiza OMVD dokazan kao prediktor kliničkog ili biohemijskog recidiva bolesti (291).

Kompjuterskim određivanjem MVD (image analysis system), Van Niekerk je odredio da u TZ tumorima ne postoji konzistentno povećanje MVD u odnosu na okolno nepromijenjeno tkivo prostate i BPH, za razliku od karcinoma prostate u perifernoj zoni (PZ), koji su imali gotovo dvostruko veće vrijednosti MVD, objašnjavajući to intrinzičnim biološkim razlikama između dva zonalna tipa tumora koji barem djelomično, uslovljavaju njihovo biološko ponašanje, poput heterogenosti mikrovaskulature TZ tumora. U ovom istraživanju nije utvrđena povezanost između većih MVD i većeg GS u karcinomima prostate i u tranzicionalnoj i u perifernoj zoni (331). Za razliku od Van Niekerk, Tretiakova također kompjuterski analizirajući MVD, zaključuje da MVD nije statistički značajno povećan u karcinomima prostate u odnosu na okolno netumorsko tkivo prostate, kao ni u KP niskog gradusa ($GS \leq 3+4$) u odnosu na KP visokog gradusa ($GS \geq 4+3$), te da se MVD ne može smatrati korisnim prognostičkim parametrom (332). Taverna je, proučavajući dvodimenzionalnu geometrijsku kompleksnost vasculature KP, podijelio pacijente u dvije grupe shodno povećanju/smanjenju fraktalne dimenzije tumorske vaskularne površine i okolnog netumorskog tkiva, utvrdivši da su pacijenti sa nižom tumorskom vaskularnom površinom imali lošiji klinički ishod bolesti, odnosno da je tumorska progresija neovisna o angiogenezi (333). Na kraju sam autor ostavlja otvoreno pitanje da li je angiogeneza

standardno obilježje karcinoma prostate i ukazuje da i dalje ne postoji moćan metod kvantifikacije reverzibilnosti neovaskularizacije (334-5).

Tabela 25. Studije MVD: povezanost MVD sa patohistološkim parametrima

Studija	Uzorak	IHH/Metod	Korelacija / Da	Korelacija / Ne
Weidner	74 RP	F 8/Weidner	GS, pN1	
Brawer	32 RP i 5 TURP	F 8/kompjuter	pT	
Silberman	109 RP (GS5-7)	CD31/Weidner modifikovan x400		GS, EPE
Rubin	87 RP	CD31/Weidner		GS, pT
Rogatsch	36 IB i RP	CD31/Weidner modifikovan x400	pT	
Offersen	64 TURP	CD31, F8/ -	Preživljavanje	
Borre	221 IB	F8/ -	GS, klinički stadijum	
Bostwick	186 IB i RP	F8/kompjuter	pT	
Di Lorenzo	72 RP	CD31/Weidner	pT, GS, sPSA	
Tretiakova	169 RP	CD31/kompjuter		GS
Taverna	27 RP	CD34/kompjuter	sPSA	pT, GS
Erbersdobler	3261 RP	CD31/Weidner	pT, GS	sPSA
Van Niekerk	28 RP	CD31/kompjuter		GS
Steiner	69 RP	CD31,CD34 /Weidner x400	pT, GS	
Jiang	73 IB	CD31/Weidner modifikovan x400	GS	sPSA

Većina ovih studija, koristeći različita antitijela, metode brojanja i selekcije, pokazala je neke značajne korelacije između angiogeneze prisutne u loše diferentovanim karcinomima prostate i smanjenog preživljavanja pacijenta, sugerišući da su metode brojanja krvnih sudova snažno mjerilo angiogene aktivnosti prisutne u tumoru (tabela 25). Kontroverznost rezultata posljedica je praktičnih problema koji ograničavaju korišćenje mjerenja MVD na hirurškom materijalu, odnosno, nema dogovora o metodama brojanja krvnih sudova, niti tzv. "cut-off" vrijednosti koja bi razdvojila neoplazme niskog i visokog gradusa. Prilikom brojanja krvnih sudova javljaju se metodološki problemi kao što su različita zapažanja između različitih patologa, čak i samog patologa prilikom ponovnog brojanja, selekcija područja sa najintenzivnijom neovaskularizacijom ("hot-spot"), kao i heterogenost tumora, koji i dalje ostaju neriješeni i mogu zato uticati na rezultate imunohistohemijskih analiza. Broj dosad

objavljenih rezultata MVD iznosi 14–300, a samim tim i "cut-off" koji se kreće 23–160 (321, 322, 327, 336-339). U našem istraživanju prosječna vrijednost MVD iznosila je, na uzorcima iglenih biopsija prostate (IB), $49,84 \pm 13,36$ (22–78), a na uzorcima radikalne prostatektomije (RP) $46,85 \pm 14,47$ (28–89) nakon čijeg poređenja nije uočena statistički značajna razlika, dok je "cut off" vrijednost iznosila 48. Ako se zanemare varijacije u selekciji pacijenata (npr., Tretiakova dijeli najveći broj pacijenata sa GS7 na dvije grupe, niskogradusni KP ($\leq 3+4$) i visokogradusni KP ($\geq 4+3$), smatra se da su te različite vrijednosti najvećim dijelom uslovljene različitim tehnikama brojanja tumorskih krvnih sudova (332). Ove razlike mogu biti posljedica izbora endotelnih antitijela, odabira vaskularnih parametara, izbora tumorskog polja u kojem se vrši mjerenje, načina brojanja krvnih sudova, određivanja "cut-off" vrijednosti koja se koristi u korelacionim analizama sa drugim kliničko-patološkim varijablama i preživljavanjem, kao i pogrešnih statističkih metoda koje su korišćene. Odabir "cut-off" vrijednosti zasnovan je na lično procijenjenim srednjim vrijednostima MVD, ispod koje je prognoza dobra, a iznad koje loša, te bi zbog toga trebalo da se posmatra arbitrarno dok se ne identifikuje validna vrijednost. Ovakve razlike mogu ovisiti i o tome da li je MVD procjenjivana na periferiji ili u centru tumorske promjene (321). Budući da je pokazano da postoji jaka korelacija u vrijednostima MVD dobijenim korišćenjem različitih antitijela od kojih se CD-31, koji smo koristili u našoj studiji, pokazao senzitivnijim, pokazujući 18–33% veće rezultate brojanja malih krvnih sudova (MVD) nego neka druga antitijela koje se uobičajeno koriste (npr., CD34 se osim u endotelnim ćelijama, nalazi i u mezenhimnim i inflamatornim ćelijama, kao i limfnim sudovima) (91, 330, 340), najvažnije diskrepancije se odnose na preostale nabrojane razloge. Studije koje nisu mogle potvrditi prognostičku značajnost MVD su bile one koje su najviše odstupile od metodologije koju je opisao Weidner (322). Svaki od prethodno navedenih autora koristio je brojne modifikacije ove metode (npr. određivanje tzv. "hot spots" odnosno područja sa najvećim brojem krvnih sudova, koliko polja se broji i gdje, da li se fokusi preklapaju). I u našoj studiji primijenjena je modifikacija određivanja MVD po Weidneru zbog brojanja malih krvnih sudova i na uzorcima KP na iglenim biopsijama i na uzorcima RP na polju uveličanja x400 (91). Ovaj izbor metode u našem istraživanju potkrijepljen je pojedinim studijama na različitim tumorima koje su pokazale dobru korelaciju između rezultata brojanja krvnih sudova na uveličanju x400 u odnosu na uveličanje x200 (336-8). Vrijednosti MVD u našoj studiji su veće u odnosu na prethodne studije (321, 339). Moguće objašnjenje ovakvih rezultata je, kao što je to i Rogatsch naglasio, da veća rezolucija x400 rezultuje povećanjem vrijednosti MVD

za 11–33% kad se poredi sa uveličanjem x200, što su pokazali i Horak i Weidner kod karcinoma dojke (91, 335, 338). Primjena kompjuterskog određivanja i brojanja krvnih sudova (eng. *Image analysis system*) koju je nekoliko grupa istraživača predložilo, skuplja je, zahtjevnija, neprikladna za rutinsku upotrebu, a nije tačnija u odnosu na brojanje koje su izvršili drugi istraživači lično (92, 291, 293, 294, 331–333). Upravo ove različitosti u načinu određivanja MVD u mnogim studijama, onemogućavaju adekvatnu interpretaciju i poređenje, stoga bi bilo potrebno konsenzusom utvrditi tačnu metodologiju za određivanje MVD koja bi onda omogućila mnogo tačnija poređenja i interpretacije vrijednosti MVD u odnosu na kliničkopatološke parametre.

Imajući u vidu vrijednost GS i MVD, neinvazivne imidžing tehnike koje mogu reflektovati i GS i MVD mogle bi obezbijediti pravovremenu dijagnostiku i determinaciju karcinoma prostate (341). Histološka heterogenost i multifokalnost karcinoma prostate ograničavaju upotrebu iglenih biopsija u određivanju svih histoloških gradusa i lokalizacija KP (314). Smatra se da bi u ciljanom procjenjivanju područja prostate, odnosno karcinoma prostate, iz kojeg bi se uzela iglena biopsija pomogla upotreba imidžing metoda koja bi omogućila procjenu područja sa najvećom MVD i samim tim područja sa najlošijom histološkom diferencijacijom, odnosno $GS \geq 7$. Ovo bi trebalo rezultirati promjenom strategije uzimanja iglenih biopsija prostate, čiji bi ishod bio veća detekcija KP i tačniji GS, odnosno adekvatnija procjena strategije liječenja pacijenta (314). U skladu sa ovim, najviše korišćena imidžing metoda danas je kontrastom pojačana ultrasonografija (eng. *ultrasonography with molecularly targeted contrast microbubbles, CEUS*) i magnetna rezonanca (eng. *magnetic resonance imaging, MRI*), dopunjene molekularnim, metaboličkim i funkcionalnim imidžing tehnikama (341). Neki istraživači u svojim radovima vrše korelaciju rezultata dobijenih imidžing metodama sa histološki određenim MVD. Lee je procjenjivao tumorsku angiogenezu na ksenografnom mišjem modelu sa ubrizganim humanim PC-3 ćelijama karcinoma prostate koristeći ultrasonografiju pojačanu kontrastom (eng. *contrast-enhanced sonography, CEUS*), utvrdivši značajnu korelaciju ultrazvučno određenog maksimalnog intenziteta i histološki određenog MVD upotrebom CD31 (342). Jiang je utvrdio na uzorcima iglenih biopsija prostate da je najveći intenzitet u KP određen upotrebom CEUS, statistički značajno povećan sa većim GS i histološki određenim MVD (314). Osimani je pokazao da su, u karcinomima prostate, volumen krvi i mjerenja produkata površine zone permeabilnosti pomoću perfuzione kompjuterizovane tomografije, najviše povezani sa imunohistochemijskim

markerima angiogeneze, MVD (343). Za razliku od njega, Franiel nije dokazao statistički značajnu korelaciju MRI perfuzije i "hot spots" krvnog volumena sa histološki određenim MVD objašnjavajući to heterogenom vaskularizacijom normalnog i tumorskog tkiva prostate, kao različitom debljinom MRI slajsova, odnosno histoloških parafinskih blokova, ali i tehničkim ograničenjima MRI, sugerišući da bi kompjuterski određeni 3D modeli prostate mogli u budućnosti omogućiti tačniju korelaciju histoloških i MRI imidžing nalaza (344).

Poznato je da maligni tumori ovise o angiogenezi, tj. formiranju novih krvnih sudova od već postojeće mikrovaskulature. Kod karcinoma prostate takođe je bilo sugerisano da je stepen angiogeneze KP povezan sa kliničkim stadijumom, progresijom nakon radikalne prostatektomije i preživljavanjem (326). Pokazalo se da sekrecija i aktivacija različitih endotelnih faktora rasta, tzv. angiogenih faktora, od strane tumorskih ćelija igra važnu ulogu u formaciji neovaskulature (345-6). Mada se tzv. angiogeni "prekidač" posredovan angiogenim faktorima pokazao ranim događajem u razvoju tumora, do sada ništa nije indikovalo da se taj prekidač inaktivira tokom progresije tumora (347). Naprotiv, pokazalo se da MVD raste značajno sa dediferencijacijom, tumorskim rastom i metastaziranjem (322). Ograničenje upotrebe MVD kao kvantitativnog odraza patološke angiogeneze dovelo je do istraživanja nekih drugih mjerila angiogene aktivnosti tumora koja bi mogla biti objektivnija i/ili preciznija, kao što su nivoi ekspresije angiogenih promotora i inhibitora.

Individualni tumori mogu proizvoditi brojne različite proangiogene faktore čija se relativna ekspresija može mijenjati vremenom. U genetski nestabilnim tumorskim promjenama ekspresija angiogenih faktora često se izmakne normalnoj regulatornoj kontroli, što se manifestuje visokom konstitutivnom tumorskom ekspresijom (npr. disocijacija VEGF ekspresije od regulacije nivoa kiseonika – u tumorskim ćelijama ekspresija VEGF je često visoka bez obzira na količinu kiseonika) (321).

VEGF, takođe poznat kao faktor vaskularne permeabilnosti, predstavlja jedan od najmoćnijih i specifičnih angiogenih faktora dosad izolovanih. Radi se o multifunkcionalnom citokinu koji stimuliše rast endotelnih ćelija i angiogenezu i povećava mikrovaskularnu permeabilnost (321).

Mnoge studije su ispitivale povezanost MVD i nivoa pojedinačnih angiogenih faktora poput VEGF. Imunohistohemijske studije su pokazale da tumorske ćelije KP mogu

proizvoditi VEGF i da je granularno citoplazmatsko bojenje naročito intenzivno kod neuroendokrinih prostatičnih tumorskih ćelija (214, 321).

Rezultati brojnih istraživanja VEGF ekspresije u tumorskim ćelijama karcinoma prostate su i dalje još uvijek oprečni (tabela 26). VEGF ekspresija je niska u normalnom tkivu prostate, ali se povećava u tumorskom tkivu karcinoma prostate. U studiji Mazzucchelli i saradnika, ekspresija VEGF bila je prisutna u svim KP, naročito na periferiji tumora, a najizraženija kod tumorskih ćelija neuroendokrino fenotipa (279). U istraživanjima procenat pozitivne ekspresije VEGF u tumorskom tkivu karcinoma prostate kretao se od 65% (85), pa do 100% u većini istraživanja (90, 279, 326, 348-9). U našoj studiji, 97 % karcinoma prostate pokazalo je pozitivnu ekspresiju. Međutim, u studiji Jackson, pozitivna ekspresija VEGF je bila prisutna kao kod KP, tako i u okolnom tkivu benigne hiperplastične prostate, a ovakve rezultate autor tumači produkcijom VEGF u tumorskim ćelijama KP i njegovom sekvestracijom u okolnim stromalnim ćelijama (216).

Veći broj istraživača potvrdio je pozitivnu korelaciju ekspresije VEGF sa tumorskim stadijumom i gradusom (GS), kao i preživljavanjem pacijenata oboljelih od karcinoma prostate (tabela 26). Ovakvi rezultati potvrđeni su univarijantnim analizama, ali se u multivarijantnim analizama VEGF u većini studija nije pokazao statistički značajnim parametrom preživljavanja pacijenata (90, 279, 285, 348, 326, 349, 350-1). U našoj studiji, veća ekspresija VEGF bila je prisutna kod loše diferentovanih ($GS \geq 7$), lokalno uznapredovalih (pT3) i metastatski proširenih karcinoma prostate (pN1).

Hideaki u svojoj studiji nije našao povezanost ekspresije VEGF sa metastazama u limfnim čvorovima (350). Nasuprot njemu, Peyromaure je utvrdio veću ekspresiju VEGF kod pacijenata kod kojih su se postoperativno razvile koštane i nodalne metastaze u odnosu na pacijente bez metastatski raširene bolesti, a u multivarijantnoj analizi VEGF ekspresija je bila najznačajniji prediktivni faktor progresije KP nakon radikalne prostatektomije (351).

Kwak nije utvrdio povećanje ekspresije VEGF sa slabijom diferencijacijom tumora (85), kao ni Jackson (216). Ferrer je univarijantnim analizama dokazao povezanost ekspresije VEGF sa stepenom diferencijacije tumora, odnosno bolje diferentovani KP su pokazali jaču ekspresiju u odnosu na loše diferentovane tumore. Autor objašnjava ovakav rezultat gubitkom ekspresije VEGF ili ćelijskih receptora VEGF u loše diferentovanim neoplazmama. Takođe

smatra da se ne jedan, već prije brojni faktori angiogeneze, udruženi zajedno, mogu smatrati odgovornim za tumorsku neovaskularizaciju (212).

Proučavajući ekspresiju VEGF i MVD određenu pomoću endoglina i CD31 kao prognostičke parametre u KP, El-Gohary je utvrdio da veću specifičnost endoglina u određivanju MVD u odnosu na CD31, odnosno veće vrijednosti MVD su bile statistički značajno povezane sa većom ekspresijom VEGF, većim GS (≥ 7), metastazama u limfnim čvorovima, uznapredovalim stadijumom bolesti (pT3) i većim predoperativnim sPSA, kao i kraćim preživljavanjem. Veća ekspresija VEGF bila je udružena i sa angiolimfatičnom invazijom, udaljenim metastazama, kao i metastazama u limfnim čvorovima. Autor navodi da ovakvi rezultati istraživanja upućuju na značajnu ulogu VEGF u formiranju krvnih sudova, odnosno na agresivniji tumorski fenotip, objašnjavajući da VEGF može pojačati ulazak tumorskih ćelija u cirkulaciju putem indukovanja hiperpermeabilnosti krvnih sudova, proliferacijom endotelnih ćelija i migracijom (352). Concato je utvrdio povezanost bcl-2, p53 i visokih vrijednosti MVD na uzorcima iglenih biopsija prostate i povećanog rizika mortaliteta uzrokovanog karcinomom prostate, dok je ekspresija VEGF u KP bila slabo izražena (353). Proučavajući ekspresiju VEGF u lokalno uznapredovalim karcinomima prostate kod pacijenata prethodno tretiranih radioterapijom i hemoterapijom, Pan nije dokazao povezanost intenziteta ekspresije VEGF i preživljavanja pacijenta, lokalne progresije i metastatskog širenja bolesti, kao ni relapsa bolesti (354).

Našim istraživanjem potvrđena je povezanost povećane vaskularizacije (MVD) i ekspresije VEGF u karcinomima prostate, odnosno intenzivnija ekspresija VEGF bila je prisutna u tumorima sa većom gustom krvnih sudova, kao što je i navedeno u nekim studijama (279, 285, 326, 349, 352).

Neto angiogeni uticaj tumorske mikrosredine bi trebalo posmatrati kao sumu pozitivnih i negativnih regulatora angiogeneze koji potiču i od tumora i od ćelija domaćina, te zato nivoi jednog jedinog angiogenog faktora nisu striktno udruženi sa MVD, što i pokazuju rezultati studija kod kojih nije ustanovljena korelacija između MVD i VEGF, kao u studiji Gyftopoulosa i saradnika gdje su loše diferentovani KP (GS 8–10) pokazali nisku do umjerenu ekspresiju VEGF i jaku ekspresiju COX-2, što su autori objasnili mogućom zamjenom uloga ova dva angiogena faktora u loše diferentovanim neoplazmama (355).

U našem istraživanju nije nađena statistički značajna povezanost predoperativnih vrijednosti sPSA sa ekspresijom VEGF u tumorskim ćelijama KP, kao što je navedeno i nekim drugim istraživanjima (314,350, 356).

Rezultati multivarijantnih i univarijantnih analiza povezanosti VEGF sa kliničkopatološkim parametrima u većini studija, kao i našoj, potvrđuju ulogu VEGF kao moćnog angiogenog faktora u uspostavljanju, razvoju i progresiji karcinoma prostate.

Tabela 26. Studije VEGF: povezanost VEGF sa patohistološkim parametrima

Studija	Uzorak	Metod	Korelacija / DA	Korelacija /NE
Hideaki	193, RP	IHH	pT, GS	pN1, sPSA
Boxler	278, RP	IHH/semikvantitativna analiza	Preživljavanje	
Ferrer	25, RP	IHH, ELISA		G (WHO)
Jackson	30, RP	IHH, RT PCR		G (WHO)
Kwak	52, RP	IHH	pT	GS
Borre	221, TURP	IHH/semikvantitativna analiza	pT, G (WHO), MVD	
Kuniyasu	40, RP	ISH	pT, GS, MVD	
Mazzucchelli	35, RP	IHH/semikvantitativna analiza	GS, MVD	
Strohmeier	55, RP	IHH/semikvantitativna analiza	pT, G (WHO), MVD	
West	67, TURP	IHH/semikvantitativna analiza	pT, GS, sPSA	
Peyromaure	40, RP	IHH	pT	
Duque	80, plazma	ELISA	pT	sPSA, GS
Gyftopoulos	139, RP	IHH	GS, MVD	
Pallares	58, RP	IHH	GS	
El-Gohary	50, RP	IHH	GS, MVD, preživljavanje	pN1, pT, sPSA
Concato	1270, IB, TURP, RP	IHH		Mortalitet uzrokovan KP
Pan	103 IB, TURP	IHH		pT, pM, preživljavanje, relaps KP

Brojnim istraživanjima dokazano je da je MMP-9 jedan od faktora koji najviše doprinosi u tumorski indukovanom pokretanju angiogenog prekidača esencijalnog za opstanak i progresiju tumora, odnosno metastaziranje (357). Snižena regulacija produkcije MMP-9 na ksenografnim modelima karcinoma prostate smanjuje rast tumora i vodi njegovoj regresiji (274). MMP-aze degradiraju bazalne membrane i ekstracelularni matriks i time podstiču invaziju strome. Ekspresija gena MMP-9 najviše je izražena na invazivnim rubovima

KP, naročito kod lošije diferentovanih KP (285). Karcinomi prostate imaju veću ekspresiju svih MMP-aza i TIMP u odnosu na okolno netumorsko tkivo prostate (358).

Literaturni podaci o ekspresiji MMP-9 u karcinomima prostate su oprečni, kao i u prethodno analiziranim studijama o MVD i ekspresiji VEGF (tabela 27.).

Rezultati većine studija o ekspresiji MMP-9 u tkivima ili serumu pacijenata oboljelih od KP pokazali su pozitivnu korelaciju sa GS, odnosno povišeni nivoi MMP-9 udruženi su sa slabijom diferentovanošću tumora ($GS \geq 7$) (285, 349,350, 359–363). Kuniyasu je u svom istraživanju pokazao da su KP sa GS7 imali umjerenu ekspresiju MMP-9, odnosno ovi tumori kod pT2 su pokazivali ekspresiju kao i bolje diferentovani KP, dok su se KP sa GS7 u pT3 stadijumu ponašali kao loše diferentovani tumori (285). Značajno povećanje ekspresije TIMP-1 u lošije diferentovanim KP dokazao je Escaff u svom istraživanju, za razliku od ekspresije različitih MMP-aza koje se u odnosu na ovaj kliničko patološki parametar nisu pokazale statistički značajnim (358).

U našem istraživanju, intenzitet ekspresije MMP-9 bio je veći kod loše diferentovanih tumora ($GS \geq 7$), kao i kod lokalno invazivnih (pT3) i metastatski proširenih tumora (pN1). Karcinomi prostate sa visokom ekspresijom MMP-9 imali su i veću gustinu krvnih sudova ($MVD > 48$), a koekspresija VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu, odnosno veća ekspresija VEGF praćena i jačom ekspresijom MMP-9 u karcinomima prostate, još više ukazuje na povećan maligni potencijal tumora, kao što je i Kuniyasu naveo u svojoj studiji (285). I multivarijantne analize u našoj studiji pokazale su da je MMP-9 nezavisan prognostički parametar u predviđanju stadijuma bolesti, što je i rezultat pojedinih istraživanja (285).

Ravnoteža ekspresije MMP i porodice inhibitora MMP (TIMP-1 i TIMP-2) korelira sa invazivnim i metastatskim kapacitetom KP, ali i produkcija MMP u metastatskim tumorskim ćelijama korelira sa invazivnim kapacitetom ćelija humanih KP. U svom istraživanju Wood i saradnici ukazuju na to da TIMP ekspresija može biti marker neinvazivnog dobrodiferentovanog KP, dok se MMP ekspresija može smatrati markerom nediferentovanog uznapredovalog KP, odnosno, smanjena ekspresija TIMP je praćena povećanjem MMP kod KP visokog GS i uznapredovalog stadijuma (pT3). Po mišljenju autora, stromalne ćelije koje okružuju dobrodiferentovane tumorske žlijezde mogu proizvoditi velike količine TIMP, a male količine MMP, te na taj način limitirati nivo destrukcije bazalne membrane i invazivne

aktivnosti tumorskih ćelija. Suprotno se dešava kod loše diferentovanih, uznapredovalih KP, što navodi na zaključak da se invazivno ponašanje tumorskih ćelija može limitirati dejstvom TIMP (264). Gubitak ravnoteže između MMP i TIMP je po mišljenju Brehmera uglavnom uzrokovan značajnim gubitkom TIMP-1 u malignim ćelijama, a značajna ekspresija MMP-2 i znatno manja ekspresija MMP-9 u palpabilnim KP (T2, T3) u odnosu na nepalpabilne tumore (T1c). Nedostatak karakteristične induracije u T1c tumorima prilikom rektalne palpacije autor objašnjava povećanim količinama MMP-9 koje uzrokuju pojačanu disimilaciju stromalnog kolagena (363). Escaff je u svom istraživanju da postoji značajna varijabilnost u MMP/TIMP ekspresiji u karcinomima prostate koja potvrđuje biološku heterogenost ovih tumora. Naročito je povećana ekspresija MMP-11 i MMP-13 u KP bila značajno povezana sa većom mogućnošću biohemijskog relapsa bolesti (358). U brojnim studijama nađeno je da je MMP-9 značajno povišen kod metastatski proširenog KP (231, 285, 350, 364-66). Ekspresija MMP-9 u karcinomu prostate pokazala se i kao značajan prediktor recidiva KP (350).

Castellano i saradnici su u svom istraživanju utvrdili da su plazmatski nivoi osteopontina (OPN) i MMP-9 značajno povišeni kod pacijenata kojima je sPSA bio veći od 4 ng/ml. Istovremeno, imunohistohemijska analiza tumorskog tkiva pacijenata pokazala je MMP-9 ekspresiju i u tumorskim ćelijama, ali i okolnom ekstracelularnom matriksu. Autori su time ukazali da OPN i MMP-9, koji su jako povišeni u plazmi oboljelih od KP, mogu poticati iz prostatičnih tumorskih ćelija, odnosno, da se najvećim dijelom otpuštaju iz tumorskih ćelija KP, kao i da postoji mogućnost da se radi o koregulaciji ova oba markera u tumorskim ćelijama, budući da OPN indukuje aktivaciju MMP-9 (359). Morgia ukazuje da su koncentracije MMP-2, MMP-9 i MMP-13 u plazmi veće, a koncentracije TIMP-1 niže, kod pacijenata koji imaju metastatski proširen KP, i da kod ovih pacijenata dolazi do značajnog opadanja koncentracija MMP u plazmi nakon primjene terapije (366). U našem istraživanju pokazano je da, što su pacijenti imali više nivoe sPSA predoperativno, to im je bila i intenzivnija ekspresija MMP-9 u tumorskom tkivu KP.

Istraživanja MMP-9 govore da ona ima i antiangiogenu ulogu koju ostvaruje putem generiranja endogenih inhibitora angiogeneze i modulacijom signaliranja ćelijskih receptora otcjepljivanjem njihovih ligand-vezujućih domena, odnosno čini se da MMP-9 čini dio kompleksne ravnoteže angiogeneze, tj. nema isključivo proangiogenu, niti antiangiogenu ulogu (231, 367). U svojoj studiji, Boxler je utvrdio da je jaka ekspresija MMP-9 povezana sa

nižim stadijumom bolesti i dužim preživljavanjem, kao i preživljavanjem bez relapsa bolesti i preživljavanjem specifičnim za obolijevanje od karcinoma prostate. Primjenom multivarijantnih analiza nijedan faktor se nije izdvojio kao nezavisan prognostički parametar, izuzev patološkog stadijuma bolesti, kao i prisustva metastaza u limfnim čvorovima (281).

Analiza MMP-9 u uzorcima RP pokazala je da ovaj enzim može biti i marker terapijske efikasnosti, budući da se nivo i aktivnost plazmatskih MMP-9 smanjuje značajno kod pacijenata sa metastatski proširenom bolesti nakon primijenjene terapije (366).

Rezultati prethodnih studija sugeriraju da mjerenje nivoa VEGF i MMP-9 može osigurati korisne informacije o tumorskom statusu i prognozi. Još uvijek ne postoje ustanovljene ili adekvatne metode kvantifikacije imunohistohemijske ekspresije VEGF i MMP-9 (tabele 26 i 27). Različiti autori su koristili potpuno drukčije metode procjene nivoa ekspresije VEGF i MMP-9 (imunohistohemijska analiza, ELISA, in situ hibridizacija, želatinazna zimografija), testirana su različita tkiva obrađena na različite načine (TURP, RP, plazma), primijenjeni su različiti tipovi antitijela, a i "cut-off" nivoi korišćeni za procjenu ekspresije VEGF i MMP-9 su bili različiti, što može i objasniti kontradiktorne zaključke (tabele 26 i 27). U našem istraživanju primijenjena je semikvantitativna analiza ekspresije VEGF i MMP-9 u tkivu KP (procenat pozitivnih tumorskih ćelija i intenzitet obojenosti citoplazme), koja je korišćena u pojedinim studijama (279, 281, 326, 348-9).

Tabela 27. Studije MMP-9: povezanost MMP-9 sa patohistološkim parametrima

Studija	Uzorak	Metod	Korelacija/DA	Korelacija/NE
Boxler	278, RP	IHH/semikvantitativna analiza	pT, GS, pN	
Kuniyasu	40, RP	ISH	pT, GS, pN	
Hideaki	193, RP	IHH	pT, GS, pN, sPSA	
Castellano	96, RP, krv	ELISA, želatinazna zimografija	GS, sPSA	
Wood	101, RP, TURP	ISH	pT, GS,	
Escaff	133 RP	IHH/semikvantitativna analiza/tkivna mikroerej studija	Biohemijski relaps bolesti	GS
Brehmer	40 RP	IHH	GS	pT, sPSA
Morgia	40	ELISA, plazma	pT, pN, pM	

Takođe, kriterijumi za uključenje u studiju nisu bili homogeni; u pojedinim studijama bili su uključeni i muškarci sa uznapredovalim KP, ali i pacijenti koji su primali različite terapije. U našem istraživanju korišćeni su uzorci radikalnih prostatektomija pacijenata sa klinički dijagnostikovanim lokalno ograničenim KP (T2) koji predoperativno nisu primali hormono-, radio- ili citostatsku terapiju. Stoga je teško vršiti poređenja rezultata i utvrditi tačan prognostički uticaj ekspresije VEGF i MMP-9 na osnovu ovakvih studija. Nedostatak zlatnog standarda testiranja VEGF i MMP-9, kao i nedostatak validnog scoring sistema za nivoe ekspresije VEGF i MMP-9, trenutno onemogućavaju testiranje ova dva molekularna markera u rutinskoj praksi.

Našim istraživanjem, primjenom multivarijantnih analiza kliničkopatohistoloških karakteristika KP, MVD, ekspresije proangiogenih faktora VEGF i MMP-9 u tumorskom tkivu, kao nezavisni prognostički parametri u predviđanju stadijuma KP (pT2 vs pT3) pokazali su se *Gleason* skor, VEGF i prisustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (pN1), a kao potencijalni prognostički parametri (statistički sa manjim nivoom značajnosti, $p < 0,05$) i MMP-9 i MVD.

VEGF i MMP-9 ekspresija u našem istraživanju primijenjena je na uzorcima karcinoma prostate dobijenim nakon RP. Bilo bi korisno primijeniti ove markere i na uzorcima IB u cilju što tačnije preoperativne procjene stadijuma karcinoma prostate, koji je još uvijek, sudeći prema mnogim prethodno navedenim istraživanjima, ali i našem, potcijenjen u kliničkoj procjeni u odnosu na patohistološku procjenu stadijuma (pT) u čak 20–60% slučajeva, te na taj način poštedjeti pacijente nepotrebnog operativnog zahvata. Određivanje ekspresije VEGF, MMP-9 i angiogeneze u karcinomu prostate moglo bi omogućiti identifikaciju pacijenata u ranom stadijumu bolesti sa visokim rizikom relapsa bolesti nakon učinjene radikalne prostatektomije, a koji bi mogli povoljno odreagovati na primjenu antiangiogenih lijekova u kombinaciji sa hormonoterapijom u cilju sprečavanja progresije bolesti i razvoja androgen-nezavisne hormonski refraktorne bolesti. Kenny napominje u svom članku kako bi dobro bilo kad bismo mogli, uz pomoć molekularnih markera, otkriti one pacijente čiji će karcinom prostate progredirati i koji će imati korist od primjene adekvatne terapije u odnosu na one pacijente koji imaju indolentan karcinom (368).

Iako su mnoge od prethodno navedenih studija, uključujući i našu, pokazale značajnu povezanost između različitih mjerenja angiogene aktivnosti karcinoma prostate i stadijuma

bolesti, nijedno od ovih mjerenja nije dovoljno validno kao senzitivno, specifično i dovoljno reproducibilno da bi se koristilo u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Složenost tumorske angiogeneze i izražena heterogenost unutar samog tkiva adenokarcinoma prostate koje utiču na javljanje i dejstvo različitih angiogenih faktora na različitim nivoima razvoja karcinoma, teško će omogućiti tačnu procjenu angiogene aktivnosti tumora na osnovu procjene samo jednog aspekta angiogeneze.

Pitanje je i dalje da li će analize različitih biomarkera biti dovoljno prediktivne na uzorcima iglenih biopsija kao jedinog tkivnog uzorka pacijenta koji nije tretiran hirurški, kao što su to bile na uzorcima radikalnih prostatektomija, a imajući u vidu potencijalne limitirajuće faktore kao što je heterogenost karcinoma prostate, ali i egzogeno oštećenje tkiva prilikom uzimanja iglene biopsije.

Iako obećavajuće, dalje studije su potrebne da bi ocijenile dosadašnje studije i odredile povezanost između tumorske neovaskularizacije (procijenjene na uzorcima iglene biopsije i uzorcima radikalnih prostatektomija) prije nego što se ove tehnike budu mogle primijeniti u kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

- U ispitanoj populaciji, koju je činio 61 pacijent obolio od karcinoma prostate dijagnostikovanih na osnovu iglene biopsije prostate i klinički procijenjenih kao stadijum T2, odnosno lokalno ograničen karcinom prostate, postoperativno na uzorcima tkiva karcinoma prostate dobijenim nakon radikalne prostatektomije 24 pacijenta (39,34%) su imala lokalno proširenu bolest (pT3), od kojih je kod 19 pacijenata (31,14%) bila prisutna invazija u sjemene kesice. Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima bile su prisutne kod šest pacijenata (9,84%).
- Vrijednosti MVD, odnosno broj krvnih sudova izmjeren na iglenim biopsijama prostate, nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na broj krvnih sudova određen na uzorcima karcinoma prostate dobijenim nakon radikalne prostatektomije.
- Veća ekspresija VEGF, a naročito veći nivo ekspresije MMP-9, bili su prisutni u karcinomima prostate koji su imali veću gustinu krvnih sudova (MVD). Pacijenti sa visokom ekspresijom VEGF u karcinomima prostate imali su i viši nivo ekspresije MMP-9.
- Multivarijantnom analizom kao nezavisni prognostički parametri u predviđanju stadijuma KP (pT2 vs pT3) statistički visoko značajnim pokazali su se *Gleason* skor, VEGF i metastaze u limfnim čvorovima (pN1) ($p < 0,001$), dok su manji nivo značajnosti imali i MMP-9 i MVD ($p < 0,05$).
- Nezavisnim prognostičkim parametrom nakon primjene multivarijantne analize u predviđanju metastatski proširene bolesti (pN0 vs pN1) oboljelih od karcinoma prostate pokazao se samo stadijum bolesti, pT ($p = 0,001$), a kao eventualni nezavisni prognostički parametri, ali sa manjim nivoom statističke značajnosti, mogli bi se smatrati i MMP-9, VEGF i MVD ($p < 0,05$), dok se GS u procjeni pN nije pokazao visoko statistički značajnim ($p > 0,05$).
- Kao nezavisni prognostički parametri u predviđanju histološke diferentovanosti karcinoma prostate, odnosno *Gleason* skora, pokazali su se stadijum bolesti (pT), VEGF i MMP-9 ($p < 0,001$). Kao nezavisni prognostički parametar u procjeni GS, ali sa manjim nivoom značajnosti, mogao bi se smatrati i MVD ($p < 0,05$; $p = 0,040$).

- Rezultati ovih analiza koji ukazuju na to da su veći nivoi ekspresije VEGF i MMP-9, kao i MVD, povezani sa višim stadijumom tumora (pT3), kao i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (pN1), time potvrđujući ulogu angiogeneze, ćelijske kohezije i invazije u procesu metastaziranja. Povezanost povišenih vrijednosti ovih varijabli potvrđena je i u odnosu na veći Gleason skor ($GS \geq 7$), kao odraz loše histološke diferentovanosti karcinoma prostate.

7. LITERATURA

1. Epstein J, Netto G: Prostate biopsy interpretation. 4th ed., Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 2008; pp13-330.
2. Oyen RH, van de Voorde WM, Van Poppel HP, et al. Benign hyperplastic nodules that originate in the peripheral zone of the prostate gland. *Radiology*. 1993;189:707-11.
3. Mc Neal JE. Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology*. 1981;17:11-16.
4. SrigleyJR, Dardick I, Hartwick RW, et al. Basal epithelial cells of human prostate gland are not myoepithelial cells. A comparative immunohistochemical and ultrastructural study with the human salivary gland. *Am J Pathol*. 1990; 136:957-966.
5. Howat AJ, Mills PM, Lyons TJ, et al. Absence of s-100 protein in prostatic glands. *Histopathology*. 1988; 13:468-470.
6. Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate*. 1994;24:114-118.
7. Ro J, Amin M, Sahin A, Ayala A. Adenocarcinoma of the prostate. In: Fletcher C (ed.). *Diagnostic histopathology of tumors*, 3rd ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007; pp.755-770
8. Montironi R. Prognostic factors in prostate cancer. *BMJ*. 2001;322:378-379.
9. Banerjee AG, Liu J, Yuan Y, et al. Expression biomarkers modulating prostate cancer angiogenesis: differential expression of annexin II in prostate carcinomas from India and USA. *Molecular Cancer*. 2003;2:1-34
10. Bostwick DG, Meiers I. Neoplasms of the prostate. In: Bostwick DG, Cheng L (ed). *Urologic surgical pathology*, 2nd ed, Mosby Elsevier, 2008; pp443-580.
11. Mikuz G. Pathology of prostate cancer, old problems and new facts. *Adv Clin Path* 1997;1:21-34.
12. Epstein J, Murphy W. Diseases of the prostate gland and seminal vesicles. In: Murphy W (ed.). *Urological Pathology*, 2nd ed., W.B.Saunders, Philadelphia, 1997; pp.148-241
13. Database created by: Ferlay J, Parkin DM. Descriptive epidemiology group. International Agency for Research on Cancer. Lyon: GLOBOCAN; 2008.

14. Institut za zaštitu zdravlja Srbije Dr Milan Jovanović Batut. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji. Beograd 2010;16-40.
15. Kompjuterska baza podataka. Registar za maligne bolesti u Vojvodini, 2006.
16. Miladinov Mikov M. Epidemiology of malignant gastrointestinal tumors. In: 17th Academy of Studenica: Diagnostics and Therapy for Advanced Gastrointestinal Tumors, Vrnjačka banja; 2012.
17. Shimada H, Misugi K, Sasaki Y, et al: Carcinoma of the prostate in childhood and adolescence: report of a case and review of the literature. *Cancer*.1980; 46:2534-2542.
18. Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. (Eds.): Tumors of the prostate. In: World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. IARC Press: Lyon; 2004: 159-216.
19. Rosai J.:Ackerman's Surgical Pathology, 9th ed. Mosby, St Louis 2004; pp.1368-1390
20. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, et al: Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 2004; 101:2371-2490.
21. Heinonen OP, Albanes D, Virtamo J, et al: Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:440-446.
22. McNeal JE, Bostwick DG, Kindrachuk RA, Redwine EA, Freiha FS, Stamey T A: Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet* 1986; 1:60-63.
23. Bostwick DG, Montironi R: Prostatic intraepithelial neoplasia and the origins of prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract* 1995; 191:828-832.
24. Bostwick DG: Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* 1996; 78:330-336.
25. Bostwick DG, Shan A, Qian J, et al: Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with matched foci of prostate carcinoma. *Cancer* 1998; 83:1995-2002.
26. Sakr WA, Grignon DJ, Haas GP, et al: Epidemiology of high grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Pathol Res Pract* 1995; 191:838-841.

27. Iczkowski KA, MacLennan GT, Bostwick DG: Atypical small acinar proliferation suspicious for malignancy in prostate needle biopsies: clinical significance in 33 cases. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:1489-1495.
28. Iczkowski KA: Current prostate biopsy interpretation: criteria for cancer, atypical small acinar proliferation, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, and use of immunostains. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:835-843.
29. Iczkowski KA, Bassler TJ, Schwob VS, et al: Diagnosis of 'suspicious for malignancy' in prostate biopsies: predictive value for cancer. *Urology* 1998; 51:749-757.
30. Bullock AD, Andriole GL. Screening for prostate cancer: Prostate specific antigen, digital rectal examination, and free, density, and age- specific derivatives. *Prostate cancer: principles and practice*. Lippincott Williams&Wilkins; 2002: 195-207.
31. Schroder FH. Screening for prostate cancer. *Urol Clin N Am* 2003; 30: 239-51.
32. Kojima M, Babaian RJ. Algorithms for early detection of prostate cancer. *Cancer* 1995; 75 (suppl) : 1860 -8.
33. Ellis WJ, Chetner MP, Preston SD, Brawer MK. Diagnosis of prostatic carcinoma: the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. *J Urol* 1994; 152: 1520-5.
34. Oesterling JE. Prostate specific antigen: a critical assesment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991; 145: 907 -32.
35. Lee F, Torp- Pedersen ST, McLeary RD. Diagnosis of prostate cancer by transrectal ultrasound. *Urol Clin North Am* 1989;16:663-73.
36. Terris MK, Freiha FS, McNeal JE, Stamey TA. Efficacy of transrectal ultrasound for identification of clinically undetected prostate cancer. *J Urol* 1991; 146: 78-84.
37. Bostwick DG, Dundore PA. Grading. In: Bostwick DG, Dundore PA: *Biopsy Pathology of the Prostate*. London: Chapman & Hall, 1997; 141-67.
38. Long J-A, Daanen V, Gaudry AM, Troccaz J, Rambeaud JJ, Descotes JL. Prostate Biopsies Guided Three-Dimensional Real- Time (4D) Transrectal Ultrasonography on a Phantom: Comparative Study versus Two- Dimensional transrectal Ultrasound – Guided Biopsies. *Eur Urol* 2007; 52: 1097-105.

39. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, et al: Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2005;34-63.
40. Srigley JR: Key issues in handling and reporting radical prostatectomy specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:303-317.
41. Srigley JR, Amin MB, Epstein JI, et al: Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:936-946.
42. Desai A, Wu H, Sun L, et al: Complete embedding and close step-sectioning of radical prostatectomy specimens both increase detection of extra-prostatic extension, and correlate with increased disease-free survival by stage of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002; 5:212-218.
43. Sehdev AE, Pan ML, Epstein JI: Comparative analysis of sampling methods for grossing radical prostatectomy specimens performed for nonpalpable (stage T1c) prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32:494-499.
44. Epstein JI, Amin M, Boccon-Gibod L, et al: Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2005.34-63.
45. . Bostwick DG, Adolfsson J, Burke HB, et al: Epidemiology and statistical methods in prediction of patient outcome. *Scand J Urol Nephrol* 2005; 216:94-110.
46. DiGiuseppe JA, Sauvageot J, Epstein JI: Increasing incidence of minimal residual cancer in radical prostatectomy specimens. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:174-178.
47. Bostwick DG, Bostwick KC: 'Vanishing' prostate cancer in radical prostatectomy specimens: incidence and long-term follow-up in 38 cases. *BJU Int* 2004; 94:57-58.
48. Moskaluk CA: Vanishing prostate cancer syndrome: symptom of a larger clinical issue. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:561-563.

49. Helpap B, Bonkhoff H, Cockett A, et al: Relationship between atypical adenomatous hyperplasia (AAH), prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostatic adenocarcinoma. *Pathologica* 1997; 89:288-300.
50. Jiang Z, fanger GR, Woda BA et al. Expression of alpha-metylacyl-CoA racemase (P504s) in various malignant and normal tissues: a study of 761 cases. *Hum Pathol* 2003;34:792-796.
51. Sanderson SO, Sebo TJ, Murphy LM et al. An analysis of the p63/ alpha-metylacyl-CoA racemase immunohistochemical cocktail stain in prostate needle biopsy specimens and tissue microarrays. *Am J Clin pathol* 2004; 121:220-225.
52. Gleason DF: Histologic grade, clinical stage, and patient age in prostate cancer. *NCI Monogr* 1988;15-18.
53. Gleason DF: Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992; 23:273-279.
54. Aihara M, Wheeler TM, Ohori M, Scardino PT: Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology* 1994; 43:60-66.discussion 66–67
55. Epstein JI, Allsbrook Jr WC, Amin MB, Egevad LL: Update on the Gleason grading system for prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic pathologists. *Adv Anat Pathol* 2006; 13:57-59.
56. Mc Neal JE, Redwine EA, Freiha FS. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 1988; 12:897-906.
57. Arora R, Koch MO, Eble JN, et al: Heterogeneity of Gleason grade in multifocal adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 2004; 100:2362-2366.
58. Coard KC, Freeman VL: Gleason grading of prostate cancer: level of concordance between pathologists at the University Hospital of the West Indies. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:373-376.

59. Millar EK, Sharma NK, Lessells AM: Ductal (endometrioid) adenocarcinoma of the prostate: a clinicopathological study of 16 cases. *Histopathology* 1996; 29:11-19.
60. Lane BR, Magi-Galluzzi C, Reuther AM, et al: Mucinous adenocarcinoma of the prostate does not confer poor prognosis. *Urology* 2006; 68:825-830.
61. Gumus E, Yilmaz B, Miroglu C: Prostate mucinous adenocarcinoma with signet ring cell. *Int J Urol* 2003; 10:239-241.
62. Bonkhoff H: Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 2001; 12:S141-S144.
63. Reyes A, Moran CA: Low-grade neuroendocrine carcinoma (carcinoid tumor) of the prostate. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:e166-e168.
64. Ferguson J, Zincke H, Ellison E, et al: Decrease of prostatic intraepithelial neoplasia following androgen deprivation therapy in patients with stage T3 carcinoma treated by radical prostatectomy. *Urology* 1994; 44:91-95.
65. Perez N, Castillo M, Santos Y, et al: Carcinosarcoma of the prostate: two cases with distinctive morphologic and immunohistochemical findings. *Virchows Arch* 2005; 446:511-516.
66. Tran TT, Sengupta E, Yang XY. Prostatic foamy gland carcinoma with aggressive behavior: clinicopathologic, immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Am J Surg Pathol* 2001;25:618-623.
67. Bostwick DG, Foster CS: Predictive factors in prostate cancer: current concepts from the 1999 College of American Pathologists Conference on Solid Tumor Prognostic Factors and the 1999 World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Semin Urol Oncol* 1999; 17:222-272.
68. Cheng L, Darson MF, Bergstralh EJ, et al: Correlation of margin status and extraprostatic extension with progression of prostate carcinoma. *Cancer* 1999; 86:1775-1782.

69. Swanson GP, Thompson IM, Basler J: Current status of lymph node-positive prostate cancer: Incidence and predictors of outcome. *Cancer* 2006; 107:439-450.
70. Bubendorf L, Schopfer A, Wagner U, et al: Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* 2000; 31:578-583.
71. Augustin H, Eggert T, Wenske S, et al: Comparison of accuracy between the Partin tables of 1997 and 2001 to predict final pathological stage in clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2004; 171:177-181.
72. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, et al: Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2005; 23:7005-7012.
73. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB: Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA* 1994; 271:368-374.
74. Nam RK, Toi A, Trachtenberg J, et al: Making sense of prostate specific antigen: improving its predictive value in patients undergoing prostate biopsy. *J Urol* 2006; 175:489-494.
75. Henson DE, Hutter RV, Farrow G: Practice protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinoma of the prostate gland. A publication of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Task Force on the Examination of Specimens Removed From Patients With Prostate Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118:779-783.
76. Cheng L JT, Lin H, Eble JN, et al: Lymphovascular invasion is an independent prognostic factor in prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 2005; 174:2181-2185.
77. Nelson BA, Shappell SB, Chang SS, et al: Tumour volume is an independent predictor of prostate-specific antigen recurrence in patients undergoing radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *BJU Int* 2006; 97:1169-1172.

78. Wheeler TM, Dilliogluligil O, Kattan MW, et al: Clinical and pathological significance of the level and extent of capsular invasion in clinical stage T1–2 prostate cancer. *Hum Pathol* 1998; 29:856-862.
79. Shannon BA, McNeal JE, Cohen RJ: Transition zone carcinoma of the prostate gland: a common indolent tumour type that occasionally manifests aggressive behaviour. *Pathology* 2003; 35:467-471.
80. Sakai I, Harada K, Kurahashi T, et al: Analysis of differences in clinicopathological features between prostate cancers located in the transition and peripheral zones. *Int J Urol* 2006; 13:368-372.
81. McNeal JE, Hailiot O: Patterns of spread of adenocarcinoma in the prostate as related to cancer volume. *Prostate* 2001; 49:48-57.
82. Zincke H, Bergstralh EJ, Larson-Keller JJ, et al: Stage D1 prostate cancer treated by radical prostatectomy and adjuvant hormonal treatment. Evidence for favorable survival in patients with DNA diploid tumors. *Cancer* 1992; 70:311-323.
83. Bantis A, Gonidi M, Athanassiades P, et al: Prognostic value of DNA analysis of prostate adenocarcinoma: correlation to clinicopathologic predictors. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24:273-278.
84. Jones EC, McNeal J, Bruchovsky N, de Jong G: DNA content in prostatic adenocarcinoma. A flow cytometry study of the predictive value of aneuploidy for tumor volume, percentage Gleason grade 4 and 5, and lymph node metastases. *Cancer* 1990; 66:752-757.
85. Kwak C, Jin R. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2002;89(3): 303-9.
86. Di Lorenzo G, De Placido S, Autorino R. Expression of biomarkers modulating prostate cancer progression: implications in the treatment of the disease. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2005;8(1): 54-9.

87. Algaba F, Arce Y, Oliver A, et al: Prognostic parameters other than Gleason score for the daily evaluation of prostate cancer in needle biopsy. *Eur Urol* 2005; 48:566-571.
88. Bahnson RR, Dresner SM, Gooding W, Becich MJ: Incidence and prognostic significance of lymphatic and vascular invasion in radical prostatectomy specimens. *Prostate* 1989; 15:149-155.
89. Cheng L, Jones TD, Lin H, et al: Lymphovascular invasion is an independent prognostic factor in prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 2005; 174:2181-2185.
90. Pallares J, Rojo F, Iriarte J, et al: Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol Histopathol* 2006; 21:857-865.
91. Rogatsch H, Hittmair A, Reissigl A, et al: Microvessel density in core biopsies of prostatic adenocarcinoma: a stage predictor?. *J Pathol* 1997; 182:205-210.
92. Bostwick DG, Wheeler TM, Blute M, et al: Optimized microvessel density analysis improves prediction of cancer stage from prostate needle biopsies. *Urology* 1996; 48:47-57.
93. McNeal JE, Yemoto CE: Significance of demonstrable vascular space invasion for the progression of prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1351-1360.
94. Takahashi S, Qian J, Brown JA, et al: Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. *Cancer Res* 1994; 54:3574-3579.
95. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, et al: PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 2007; 69:532-535.
96. Böhle AS, Kalthoff H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbeck's Arch Surg* 1999;384:133-140.
97. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 2000; 100: 57–70.

98. Baselga J. Why the Epidermal Growth Factor Receptor? The Rationale for Cancer Therapy. *Oncologist* 2002;7:2-8.
99. Fenjveši A. Prognostički značaj analize tumorske angiogeneze, formiranja bazalne membrane i aktivnosti kolagenaze IV u kolorektalnim karcinomima. Magistarska teza, Medicinski fakultet Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad 2002.
100. Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Matsui S, Tsukita S, Kikkawa N, Monden M. Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma: correlation with cancer invasion and metastasis. *Am J Clin Pathol* 1999;111:29-37.
101. Ogawa X, Hirakawa K, Nakata B, Fujikara T, Sawada T, Kato Y, Yoshikawa K, Sowa M. Expression of intercellular adhesion molecule 1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement and good prognosis. *Clin cancer Res* 1998;4:31-36.
102. Frisch SM, Ruusolahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:701-706.
103. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: review. *Int J Cancer* 1997;72:1-22.
104. Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, Wilhelm O, Magdolen V, Reunig U, Ulm K, Hofler H, Janicke F, Graeff H. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Thromb Haemost* 1997;78:285-296.
105. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 1994;370:61-65.
106. Sato H, Seiki M. Membrane-type metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis. *J Biochem* 1996;119:209-215.
107. Takanami I, Takeuchi K, Naruke M, Kodaira S, Tanaka F, Watanabe H, Raz A. Autocrine motility factors in pulmonary adenocarcinomas. Results of an immunohistochemical study. *Tumor Biol* 1998;19:384-389.

108. Hu M, Pollock RE, Nakamura T, Nicholson GL. Human peri-tumoral and lung fibroblasts produce paracrine motility factors for recently established human sarcoma cell stains. *Int J Cancer* 1995;62:585-592.
109. Pasqualini R, Bourdoulos S, Koivunen E, Woods VL Jr, Ruoslahti E. A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nat Med* 1996;2:1196-1203.
110. O Connel J, O Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Fas-mediated T-cell Killing by colon cancer cells expressing Fas ligand *J Exp Med* 1996;184:1075-1082.
111. Smark R, Edelstein R, Israel L. Immunosuppressive effect of acute phase reactant proteins in vitro and its relevance to cancer. 1982;13:38-43.
112. Narayanan S. Sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci* 1994;24:376-384.
113. Brodt P, Fallavolita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzki BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer* 1997;71:612-619.
114. Lewalle JM, Bajou K, Desreux J, Mareel M, Dejana E, Noel A, Foidart JM. Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro. *Exp Cell Res* 1997;237:347-356.
115. Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: New Insight and Therapeutic Potential. *Anat Rec (New Anat)* 2000;261:126-135.
116. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular Hyperpermeability, Angiogenesis, and Stroma Generation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;4 :1-14.
117. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1835-42.
118. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49:407-424.
119. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:10931-10934.
120. Pluda JM. Tumor-associated angiogenesis: Mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin Oncol* 1997; 24: 203-218.

121. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3: 401-409
122. Fox SB. Tumor angiogenesis and prognosis. *Histopathology* 1997; 30: 294-301.
123. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21:505-515.
124. Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *British Journal of Cancer*.2009; 100:865–869.
125. Warren BA. The vascular morphology of tumors. In: *Tumor Blood Circulation: Angiogenesis, Vascular Morphology and Blood Flow of Experimental and Human Tumors*. Peterson, H-I (ed), CRC Press Inc.: Boca Raton, FL 1979; 1– 47.
126. Dvorak HF. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003;162: 1747–1757
127. Dvorak HF. Tumor blood vessels. In: *Endothelial Biomedicine*. Aird W. (ed). Cambridge University Press: New York 2007; 1457–1470.
128. Nagy JA, Dvorak HF, Dvorak AM. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2007; 2: 251–275
129. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361–381
130. Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhoefer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC, Dvorak HF. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2000; 80: 99–115.
131. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability,vascular hyperpermeability and angiogenesis.*Angiogenesis* 2008;11: 109–119.

132. Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J Leukoc Biol* 1996;59: 100–115.
133. Nagy JA, Morgan ES, Herzberg KT, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Pathogenesis of ascites tumor growth: angiogenesis, vascular remodeling, and stroma formation in the peritoneal lining. *Cancer Res* 1995;55: 376–385
134. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *trends Cardiovasc Med* 1993; 3:244- 250.
135. Klagsbrun M, D' Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:217- 239
136. Weidner N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol.* 1998; 184:119-122
137. Gasparini G. Biological and clinical role of angiogenesis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 1995;36:103-107.
138. Paku S. Current concepts of tumor induced angiogenesis. *Pathol Oncol Res* 1998; 4: 62- 75.
139. Liotta L. A. Tumor invasion and metastasis—role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 1986; 46: 1–7.
140. Keshet E, Ben- Sason SA. Anticancer drug targets. approaching angiogenesis. *J Clin Investig* 1999; 104: 1497- 1501.
141. Timar J, Dome B, Fazekas K, Jovanovic A, Paku S. Angiogenesis- dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 85- 94.
142. Rice A, Quinn CM. Angiogenesis, thrombospondin and ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin pathol* 2002;55:569-574.
143. Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor- derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 1984; 223: 1296-1299.
144. Nicholson B, Theodorescu D. Angiogenesis and Prostate Cancer Tumor Growth. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;91:125–150.

145. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851- 858.
146. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 824- 831.
147. Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1994; 145: 1023- 1029.
148. Leung DW, Cachianes G, Klagsbrun W, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306- 1309.
149. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AT T20 cells. *EMBO J* 1989; 8: 3801- 3806.
150. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 902- 908.
151. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153: 557- 562.
152. Mandriota S, Montesano R, Orci L, Seghezzi G, Vassalli J-D, Ferrara N, Mignatti P, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 9709- 9716.
153. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane. Requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 1989; 108: 671- 682.

154. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650- 1658.
155. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57: 673- 686.
156. Ferrara N, Davis- Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews* 1997; 18: 4- 25.
157. Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Connolly. Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor- α , but not by insulin. *J Biol Chem* 1990; 265: 18051- 18054.
158. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone D. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Natur Med* 1996; 2: 1096- 1103.
159. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Keyt B, Ferrara N, Ross J, Jin H. Effects of VEGFR on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 838- 844.
160. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 227–37.
161. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 2002; 29: 10–4.
162. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–76.
163. No author given. Turn down angiogenesis through VEGF inhibition. Understanding VEGF and anti-angiogenesis. Anti –VEGF disease education. Roche Diagnostic GmbH; 2004.
164. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93:1493-1495.

165. Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947- 11954.
166. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro . *Lab Invest* 1994; 71: 374-379.
167. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia- initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359-: 843- 845.
168. Shima TD, Adamis AP, Ferrara n, Yeo K-T, Yeo T-K, Allende M, Folkman J, D' Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in the retina: identification and characterisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the sole mitogen. *Mol Med* 1995; 2: 64- 71.
169. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF expression only. *Circulation* 1994; 90: 649- 652.
170. Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1176- 1179.
171. Frank S, Hubner G Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995, 270: 12607- 12613.
172. Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie Gy. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 1993; 4; 121- 133.
173. Ben- Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin- 1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 1995; 372: 83- 87.
174. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736- 741.

175. Claffey KP, Wilkinson WO, Spielgeman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* 1992; 267: 16317- 16322.
176. Kieser A, Weich H, Brandner g, Marme D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 1994, 9: 963- 969.
177. Grugel SFinkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D. Both v- Ha- Ras and v- Raf stimulate exprssion of vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Bil Chen* 1995; 270: 25915- 25919.
178. de Vries C, Escobjedo JA, Ueno H, Houck KA, Ferrara n, Villiams LT. The fms- like tyrosin kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255:989- 991.
179. Millauer B, Shawver LK, Plate K, Risau W, Urlich A. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Nature* 1994; 367: 576- 579.
180. Ortega N, Hutchings H, Plouet J. Signal relays in the VEGF System. *Bioscience* 1999; 4: 141-152.
181. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stackner SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF D) ia a ligand for tirosine kinase VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 548- 553.
182. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt- 1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66- 70.
183. Hoeben A, Landuyt B., Highley SM, Wildiers H, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 2004;4; 56:549–580.
184. Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 1990; 127: 965- 968.

185. Jakeman LB, Armanini M Phillips HS, Ferrara N. Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 1993; 133: 848- 859.
186. Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe RB. In the human fetus, vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 316- 322.
187. Millauer B, Wizzigman- Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity binding and developmental expression suggests Flk- 1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835- 846.
188. Peters KG, de Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8915- 8919.
189. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992; 13: 18- 23.
190. Patz A. Studies of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19: 1133- 1138.
191. Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest* 2004; 113: 516–527
192. Ferrara N, Keyt B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 1997; 79: 209–232
193. Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Galiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela- Arispe ML, Kalen M, Gerhardt H, Betsholtz C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007; 445: 776–780.

194. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 169: 681–691
195. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73: 931- 934.
196. Vigelitto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedela M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G, Persico MG. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (plGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cellines. *Oncogene* 1995; 11: 1569- 1579.
197. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Guidi Aj, Dvorak HF, Senger DR, Connoly JL, Schnitt SJ. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995; 26: 86- 91.
198. Yoshiji H, Gomez DE, shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors, and other angiogenic factors i breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 2013- 2016.
199. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53: 4727- 4735.
200. Suzuki K, Hayashi n, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamahuchi Y, Nakase H, Noda K, Enemoto N, Arai k, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3004- 3009.
201. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1255- 1262.

202. Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res* 1994; 54: 276- 280.
203. Guidi AJ, Abu- Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 12137-1245.
204. Brown LF, Lanir N, McDonagh J, Czarnecki K, Estrella P, Dvorak AM, Dvorak HF. Fibroblast migration in fibrin gel matrices. *Am J Pathol* 1993;142: 273–283.
205. Karayiannakis AJ, Bolanaki H, Syrigos KN. Serum vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Lett* 2003;194:119-24.
206. Zheng S, Han MY, Xiao ZX. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1227-30.
207. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for anti-angiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000;60:1388-93.
208. Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev cancer* 2002;2:727-39.
209. Beecken WD, Fernandez A, Jousen AM,. Effect of antiangiogenic therapy on slowly growing, poorly vascularized tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:382-7.
210. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339:58–61.
211. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* 1986;46:5629–5632.

212. Ferrer FA, Miller LJ, Andrawis RI, Kurtzman SH, Albertsen PC, Laudone VP, Kreutzer DL. Angiogenesis and prostate cancer: In vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 1998;51:161–167.
213. Kollermann J, Helpap B. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benign, premalignant, and malignant prostate tissue. *Am J Clin Pathol* 2001;116:115–121.
214. Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L, Thurston VJ, Griffiths K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostatic tumours and its relationship to neuroendocrine cells. *Br J Cancer* 1996;74:910–916.
215. Uotila P, Valve E, Martikainen P, Nevalainen M, Nurmi M, Harkonen P. Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. *Urol Res* 2001;29:23–28.
216. Jackson MW, Robjerts JS, Heckford SE, Ricciardelli C, Stahl J, Choong C, Horsfall DJ, Tilley WD. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:854–859.
217. Stewart RJ, Panigrahy D, Flynn E, Folkman J. Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: Evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts. *J Urol* 2001;165:688–693.
218. Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM. Angiogenesis and prostate cancer: Identification of a molecular progression switch. *Cancer Res* 2001;61:2736–2743.
219. Balbay MD, Pettaway CA, Kuniyasu H, Inoue K, Ramirez E, Li E, Fidler IJ, Dinney CP. Highly metastatic human prostate cancer growing within the prostate of athymic mice overexpresses vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999;5:783–789.
220. Krupski T, Harding MA, Hecce ME, Gulding KM, Stoler MH, Theodorescu D. The role of vascular endothelial growth factor in the tissue specific in vivo growth of prostate cancer cells. *Growth Factors* 2001;18:287–302.

221. Carmeliet P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 2003;4: 710–720.
222. Deryugina EI, Quigley JP. Pleiotropic Roles of Matrix Metalloproteinases in TumorAngiogenesis: Contrasting, Overlapping and Compensatory Functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1): 103–120.
223. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009;15:220–231.
224. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009;15:232–239.
225. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Schepke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresh DA. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* 2008;456:809–813.
226. Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, Zhang N, Takeda N, Greenberg JI, Cheresh DA, Johnson RS. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* 2008;456:814–818.
227. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592–603.
228. Kahari VM, Saarialho/ Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exo Dermatol* 1997; 6: 199-213.
229. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix:biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:602- 608.
230. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almoholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 667- 671.
231. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cel Mol Med* 2005; 9, 2; 267-285.

232. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, van Hinsbergh VW; Helaakoski T, Kainulainen T, Ronka H, Tschesche H, Salo T. Matrix metalloproteinase- 8 expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- α and doxycycline. *J Biol Chem* 1997; 272: 31504- 31509.
233. Knauper V, Cowwell S, Smith B, Lopez- Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G. The role of the C- terminal domain of human collagenase- 3 (MMP- 13) in the activation of procollagenase- 3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 1997; 272:7608- 7616
234. Airola K, Johansson N, Kariniemi AL; Kahari VM, Saarialho- Kere U. Human collagenase- 3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 225- 231.
235. Johansson N, Vaalamo M, Grenman S, Hietanen S, Klemi P, Saarialho- Kere U, Kahari VM. Collagenase- 3 (MMP- 13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 154: 469- 480.
236. Basset P, Okada A, Chenard MP, Cannan R, Stoll I, Anglard P, Bellocq P, Rio MC. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutical implications. *Matrix Biol* 1997; 15: 535- 541.
237. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. Matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370: 61- 65.
238. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781- 792.)
239. Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR. The ETS- domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 12: 1371- 1387.
240. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP cascades. *Adv Cancer Res* 1998; 74: 49- 129.
241. Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C., Yasuda J, Davis RJ. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 1998; 281: 1671- 1674.

242. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5287-5297.
243. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006;66:605–612.
244. Bergers G, Brekken R, Hannahan D, et al. Matrix Metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology* 2000;2:737-44.
245. Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb Z, Coussens LM, DeClerck YA. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res* 2004;64:1675–1686
246. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161–174.
247. Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene* 2000;19:1102–1113.
248. McCawley LJ, Crawford HC, King LE Jr, Mudgett J, Matrisian LM. A protective role for matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:6965–6972.
249. Larrivee B, Niessen K, Pollet I, Corbel SY, Long M, Rossi FM, Olive PL, Karsan A. Minimal contribution of marrow-derived endothelial precursors to tumor vasculature. *J Immunol* 2005;175:2890–2899.
250. Gao D, Nolan DJ, Mellick AS, Bambino K, McDonnell K, Mittal V. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 2008;319:195–198.
251. Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell* 2008;13:181–183.
252. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR. Vasculogenic mimicry and tumor-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature reviews cancer* 2003;3:411-21.
253. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006;66:605–612.

254. Tazzyman S, Lewis CE, Murdoch C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2009;90:222–231.
255. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592–603.
256. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20262–20267.
257. Gaudin P, Trocme C, Berthier S, Kieffer S, Boutonnat J, Lamy C, Surla A, Garin J, Morel F. TIMP-1/ MMP-9 imbalance in an EBV-immortalized B lymphocyte cellular model: evidence for TIMP-1 multifunctional properties. *Biochim Biophys Acta* 2000;1499:19–33.
258. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175–189.
259. Rafii S, Lyden D. Cancer. A few to flip the angiogenic switch. *Science* 2008;319:163–164.
260. Jodele S, Blavier L, Yoon JM, DeClerck YA. Modifying the soil to affect the seed: role of stromal derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:35–43.
261. Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Sarkar FH. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'- diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2007;67:3310–3319.
262. Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. *Cancer Res* 2003;63:5224–5229.
263. Lokeshwar BL, Selzer MG, Block NL, Gunja-Smith Z. Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate in explant cultures: Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues. *Cancer Res* 1993;53:4493–4498.

264. Wood M, Fudge K, Mohler JL, Frost AR, Garcia F, Wang M, Stearns ME. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:246–258.
265. Dong Z, Nemeth JA, Cher ML, Palmer KC, Bright RC, Fridman R. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer* 2001. ;93:507–515.
266. Nagakawa O, Murakami K, Yamaura T, Fujiuchi Y, Murata J, Fuse H, Saiki I. Expression of membrane- type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) on prostate cancer cell lines. *Cancer Lett* 2000;155:173–179.
267. Jiang Y, Muschel RJ. Regulation of matrix metalloproteinase- 9 (MMP-9) by translational efficiency in murine prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 2002;62:1910–1914.
268. Stearns ME, Rhim J, Wang M. Interleukin 10 (IL-10) inhibition of primary human prostate cell induced angiogenesis: IL-10 stimulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 secretion. *Clin Cancer Res* 1999b;5:189–196.
269. Stearns M, Wang M, Stearns ME. 1995. Cytokine (IL-10, IL-6) induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in primary human prostate tumor cell lines. *Oncol Res* 1995;7:173–181.
270. Stearns ME, Garcia FU, Fudge K, Rhim J, Wang M. Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res* 1999a;5:711–720.
271. Fingleton, B. MMP Inhibitor Clinical Trials - The Past, Present, and Future. In: D'Ee, al, editor. *The Cancer Degradome*. Vol. Part V. New York: Springer; 2008. p. 759-785.
272. Pahler JC, Tazzyman S, Erez N, Chen YY, Murdoch C, Nozawa H, Lewis CE, Hanahan D. Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia* 2008;10:329–340
273. Ardi VC, Van den Steen PE, Opdenakker G, Schweighofer B, Deryugina EI, Quigley JP. Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes

efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway. *J Biol Chem* 2009;284:25854–25866.

274. London CA, Sekhon HS, Arora V, Stein DA, Iversen PL, Devi GR. A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Gene Therapy* 2003; 10: 823–832.

275. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:657–672.

276. Han M, Partin AW, Zahurak M, et al. Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2003; 169:517-23.

277. Weidner N, Folkmann J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic factor in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875–1887.

278. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Research and Treatment* 1995; 36:169-180.

279. Mazzucchelli R et al. Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients. *Prostate* 2000;45: 72-79

280. Kumaki F, Matsui K, Kawai T. Expression of matrix metalloproteinases in invasive pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar component and atypical adenomatous hyperplasia. *Am J Pathol* 2001; 159:2125-2135.

281. Boxler S, Djonov V, Kessler ZM, Hlushchuk R, Bachmann LM, Held U, Markwalder R, Thalmann GN. Matrix Metalloproteinases and Angiogenic Factors. Predictors of Survival after Radical Prostatectomy for Clinically Organ-Confined Prostate Cancer?. *Am J Pathol* 2010; 177:2216–2224.

282. Swanson GP, Basler J: Prognostic Factors for Failure after Prostatectomy. *Journal of Cancer* 2011, 2 :1-19.

283. Klotz L. Low-risk prostate cancer can and should often be managed with active surveillance and selective delayed intervention. *Nat Clin Pract Urol*. 2008 ;5:2-3.

284. Collette L, Burzykowski T, Schröder FH. Prostate-specific antigen (PSA) alone is not an appropriate surrogate marker of long-term therapeutic benefit in prostate cancer trials. *Eur J Cancer*. 2006 ;42:1344-50.

285. Kuniyasu H et al. Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ confined from pathologically advanced prostate cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6: 2295-2308
286. Partin AW, Carter HB, Chan DW, et al: Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol* 1990; 143:747-752.
287. Albertsen PC, Hanley JA , BarrowsGH , Penson DF et al. Prostate Cancer and the Will Rogers Phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1248 – 53
288. Welch HG, Schwartz LM, Woloshin S. Are increasing 5-year survival rates evidence of success against cancer? *JAMA* 2000 ; 283 : 2975 – 8.
289. Hutchinson GB, Shapiro S. Lead time gained by diagnostic screening for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1968 ; 41 : 665 – 73.
290. Blackwell KL, Bostwick DG, Myers RP, et al: Combining prostate specific antigen with cancer and gland volume to predict more reliably pathological stage: the influence of prostate specific antigen cancer density. *J Urol* 1994; 151:1565-1570.
291. Gettman MT, Bergstralh EJ, et al. Prediction of patient outcome in pathologic stage T2 adenocarcinoma of the prostate:lack of significance for microvessel density analysis. *Urology* 1998;51:79-85.
292. Brawer, M. K., Deering, R. E., Brown, M., Preston, S. D., and Bigler, S. A. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma: the role of neovascularity. *Cancer (Phila.)*,1994; 73: 678–687.
293. Rubin MA, et al. Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumor grade, pathologic stage and clinical outcome. *Urology* 1999; 53 (3): 542-547, 1999.
294. Mucci LA, Powolny A, Giovannucci E, Liao Z, Kenfield SA, Shen R,Stampfer MJ, Clinton SK. Prospective Study of Prostate Tumor Angiogenesis and Cancer-Specific Mortality in the Health Professionals Follow-Up Study. *J Clin Oncol* 2009; 27:5627-5633.
295. Feinstein AR, Sosin DM, Wells CK. The Will Rogers phenomenon: stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer. *New Engl J Med* 1985 ; 312 : 1604 – 8.

296. Epstein JI. Gleason score 2 – 4 adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 2000 ; 24 : 477 – 8.
297. Pan C, Potter SR, Partin AW, Epstein JI. The prognostic significance of tertiary Gleason patterns of higher grade in radical prostatectomy specimens. *Am J Surg Pathol* 2000 ; 24 : 563 – 9
298. Kondylis FI, Moriarty RP, Bostwick D, Schellhammer P. Prostate cancer grade assignment: the effect of chronological, interpretive and translation bias. *J Urol* 2003 ; 170 : 1189 – 93.
299. Tomioka S, Nakatsu H, Suzuki N, et al: Comparison of Gleason grade and score between preoperative biopsy and prostatectomy specimens in prostate cancer. *Int J Urol* 2006; 13:555-559.
300. King CR, McNeal JE, Gill H, et al: Reliability of small amounts of cancer in prostate biopsies to reveal pathologic grade. *Urology* 2006; 67:1229-1234.
301. Tsui KH, Shen BY, Sun GH, et al: Probability based diagnostic biopsy specimens as predictors of tumor grade and stage found. *Arch Androl* 2004; 50:333-337.
302. Freedland SJ, Kane CJ, Amling CL, et al: Upgrading and downgrading of prostate needle biopsy specimens: risk factors and clinical implications. *Urology* 2007; 69:495-499.
303. Poulos CK, Daggy JK, Cheng L: Preoperative prediction of Gleason grade in radical prostatectomy specimens: the influence of different Gleason grades from multiple positive biopsy sites. *Mod Pathol* 2005; 18:228
304. Kramer SA, Farnham R, Glenn JF, Paulson DF: Comparative morphology of primary and secondary deposits of prostatic adenocarcinoma. *Cancer* 1981; 48:271-273.
305. Donohue JF, Bianco Jr FJ, Kuroiwa K, et al: Poorly differentiated prostate cancer treated with radical prostatectomy: long-term outcome and incidence of pathological downgrading. *J Urol* 2006; 176:991-995.
306. Allsbrook WC, Mangold KA , Johnson MH, et al. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma: urologic pathologists. *Hum Pathol* 2001. 32:74–80.

307. Steinberg DM, Sauvageot J, Piantadosi S, et al. Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *Am J Surg Pathol.*1997, 21:566-76.
308. Haese A, Vaisanen V, Lilja H, et al: Comparison of predictive accuracy for pathologically organ confined clinical stage T1c prostate cancer using human glandular kallikrein 2 and prostate specific antigen combined with clinical stage and Gleason grade. *J Urol* 2005; 173:752-756.
309. Augustin H, Eggert T, Wenske S, et al: Comparison of accuracy between the Partin tables of 1997 and 2001 to predict final pathological stage in clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2004; 171:177-181.
310. Bluestein DL, Bostwick DG, Bergstralh EJ, Oesterling JE: Eliminating the need for bilateral pelvic lymphadenectomy in select patients with prostate cancer. *J Urol* 1994; 151:1315-1320.
311. Partin AW, Yoo J, Carter HB, et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol.* 1993;150:110-4.
312. Walsh PC, Partin AW, Epstein JI: Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol* 1994, 152:1831–1836
313. Partin, A. W., Kattan, M. W., Subong, E. N. P., Walsh, P. C., Wojno, K. J., Oesterling, J. E., Scardino, P. T., and Pearson, J. D. The use of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer: a multiinstitutional update. *J. Am. Med. Assoc.*, 1997;277: 1445–1451, 1997.
314. Jiang J, Chen Y, Zhu Y, Yao X, Qi J. Contrast enhanced ultrasonography for the detection and characterisation of prostate cancer: correlation with microvessel density and Gleason score. *Clinical radiology* 2011; 66:732-737.
315. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59:225-49.
316. Cooperberg MR, Broering JM, Carroll PR. Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28:1117-23.

317. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, et al. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*. 1999; 281:1591-7.
318. Tadic Latinovic Lj. Značaj ekspresije proangiogenih faktora vaskularnog endotelnog faktora rasta, epidermalnog faktora rasta i Matriks-metaloproteinaze 9 za prognozu oboljelih od adenokarcinoma pluća. Doktorska teza, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd 2008.
319. Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Matsui S, Tsukita S, Kikkawa N, Monden M. Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma: correlation with cancer invasion and metastasis. *Am J Clin Pathol* 1999;111:29-37.
320. Shigeno, -K; Igawa, -M; Shiina, -H; Kishi, -H; Urakami, -S. Transrectal colour Doppler ultrasonography for quantifying angiogenesis in prostate cancer. *BJU-Int*. 2003 Feb; 91(3): 223-6
321. Hlatky L et al. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002;94: 883-893
322. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993, 143:401-409
323. Offersen, B. V., Borre, M., and Overgaard, J. Immunohisto-chemical determination of tumor angiogenesis measured by the maximal microvessel density in human prostate cancer. *APMIS* 1998;106: 463-469.
324. Erbersdobler A, Isbarn H, Dix K, Steiner I, Schlomm T, Mirlacher M. Prognostic value of microvessel density in prostate cancer: a tissue micro array study. *World J.Urol*.2010; 28: 687-692.
325. Steiner I, Jung K, Miller K, Stephan C, Erbersdobler A. Expression of endothelial factors in prostate cancer: a possible role of caveolin-1 for tumor progression. *Oncology reports* 2012; 27:389-395.
326. Borre M et al. Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Clin Cancer Res* 2000;6: 1882-1890.

327. Bono AV et al. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002;5: 123-127
328. Arakawa A, Soh S, et al. Prognostic significance of angiogenesis in clinically localized prostate cancer (staining for Factor VIII-related antigen and CD34 Antigen). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 1997; 1: 32-38.
329. Silberman MA, Partin AW, Veltri RW, Epstein JI. Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1997;79(4):772-9
330. Matsushima H, Goto T, Hosaka Y, Kitamura T, Kawabe K. Correlation between proliferation, apoptosis, and angiogenesis in prostate carcinoma and their relation to androgen ablation. *Cancer*. 1999;85(8):1822-7
331. vanNiekerk,C.G.,Witjes,J.A.,Barentsz,J.O., van der Laak,J.A., Hulsbergen-van de Kaa, C.A. Microvasculature in transition zone prostate tumors resembles normal prostatic tissue. *Prostate* 2013; 73:467-475.
332. Tretiakova M, Antic T, Binder D, Kocherginsky M. Microvessel density is not increased in prostate cancer: digital imaging of routine sections and tissue microarrays. *Hum Path* 2013; 44:495-502.
333. Taverna,G.,Colombo,P.,Grizzi,F.,Franceschini, B.,Ceva-Grimaldi, G.,Seveso, M. Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non- tumoral parenchyma. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 438–444.
334. Taverna,G.,Grizzi,F.,Colombo,P.,Graziotti,P.P. Microvessel density estimate: friend or foe in the light of prostate vascular system complexity? *World J Urol* 2010; 28: 405–406.
335. Taverna G, Grizzi F, Colombo P, Graziotti P. Is angiogenesis a hallmark of prostate cancer?.*Front Oncol* 2013;3(15):1-3.
336. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 33–41.
337. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/ endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340: 1120–1124.
338. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324: 1–8.

339. Vartanian RK, Weidner N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995; 73:844–850.
340. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 454–466.
341. Russo G, Mischi M, Scheepens W, de la Rosette J, Wijkstra H. Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. *BJUI* 2012; 110:794-808.
342. Lee HJ, Hwang SI, Chung JH, Jeon JJ, Choi JH, Jung HS. Evaluation of tumor angiogenesis in a mouse PC-3 prostate cancer model using dynamic contrast-enhanced sonography. *J Ultrasound Med* 2012; 31:1223-1231.
343. Osimani , Bellini D, di Cristofano C, Palleschi G, Petrozza V, Carbone A, Laghi A. Perfusion MDCT of prostate cancer: correlation of perfusion CT parameters and immunohistochemical markers of angiogenesis. *AJR* 2012; 199:1042-1048.
344. Franiel T, Ludemann L, Rudolph B, Lutterbeck E. Differentiation of prostate cancer from normal prostate tissue: role of hotspots in pharmacokinetic MRI and histologic evaluation. *AJR* 2010; 194:675-681.
345. Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Wernstedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., Heldin, C. H. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial growth factor. *Nature (Lond.)*, 1989;338: 557– 562.
346. Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., Ferrara, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature (Lond.)*, 1993;362: 841–844.
347. Hanahan, D., Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*,1996; 86: 353–364.
348. West AF, O'Donnell M, Charlton RG, Neal DE, Leung HY. Correlation of vascular endothelial growth factor expression with fibroblast growth factor-8 expression and clinico-pathologic parameters in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 576–83

349. Strohmeier D, Rossing C, Bauerfeind A et al. Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *Prostate* 2000;45: 216–24
350. Hideaki M, Muramaki M, et al; Expression of potential molecular markers in prostate cancer: Correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2010; 28(2):145-151
351. Peyromaure M, Camparo P, Badoual C, Descazeaud A, Dinh-Xuan AT: The expression of vascular endothelial growth factor is associated with the risk of cancer progression after radical prostatectomy. *BJU Int* 2007, 99:1150–1153
352. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007;127:572-579.
353. Concato J, Jain D, Uchio E, Risch H, Li WW, Wells C. Molecular markers and death from prostate cancer. *Ann Intern Med.* 2009;150:595-603.
354. Pan L, Baek S, Edmonds PR, Roach M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in locally advanced prostate cancer: secondary analysis of radiation therapy oncology group (RTOG) 8610. *Radiation Oncology* 2013;8:100.
355. Gyftopoulos K, Vourda K, Sakellaropoulos G, Perimenis P, Athanasopoulos A, Papadaki E. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor-A and cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma: correlation with microvessel density, androgen receptor content and Gleason grade. *Urol Int.* 2011;87(4):464-9.
356. Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 1999;54: 523–7.
357. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D: Matrix metalloproteinase- 9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000, 2:737–744.
358. Escaff S, Fernandez JM, Gonzales LO. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. *Br J Cancer* 2010;102:922-9.
359. Castellano G, Malaponte G, Mazzarino MC, Figini M, Marchese F, Gangemi P, Travali S, Stivala F, Canevari S, Libra M: Activation of the osteopontin/matrix

metalloproteinase-9 pathway correlates with prostate cancer progression. *Clinical Cancer Res* 2008, 14:7470–7480.

360. Roy R, Louis G, Loughlin KR, et al: Tumorspecific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: Identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clin Cancer Res* 2008;14:6610-6617.

361. Sauer CG, Kappeler A, Spath M, et al: Expression and activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in serum, core needle biopsies and tissue specimens of prostate cancer patients. *Virchows Arch* 2004; 444:518-526.

362. Riddick AC, Shukla CJ, Pennington CJ, et al: Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues. *Br J Cancer* 2005;92:2171-2180.

363. Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2003;6:217-22.

364. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA: Expression of bFGF/FGFR-1 and vascular proliferation related to clinicopathologic features and tumor progress in localized prostate cancer. *Virchows Arch* 2006; 448:68–74.

365. Vasala K, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T: Matrix metalloproteinase- 9 (MMP-9) immunoreactive protein in urinary bladder cancer: a marker of favorable prognosis. *Anticancer Research* 2008; 28:1757–1761

366. Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, et al: Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* 2005;33:44-50.

367. Hamano Y, Kalluri R: Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 333:292–298.

368. Kenny LM, Ngan S, Waxman J. / „Time, gentlemen, please“ for watchful waiting in prostate cancer? *BJU int.* 2007;100:244-6.)