

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**Ekspresija estrogenog receptora β
u prekanceroznim lezijama i adenokarcinomu
prostate**

Aleksandra Fejsa Levakov

Novi Sad, 2016.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
НАЗИВ ФАКУЛТЕТА - Medicinski fakultet

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 Fejsa Levakov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Matilda Djolai
Naslov rada: NR	Ekspresija estrogenog receptora β u prekanceroznim lezijama i adenokarcinomu prostate
Jezik publikacije: JP	srpski/ latinica
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	8 poglavlja, 147 stranica, 41 slika, 15 grafikona, 26 tabela i 101 referenca
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Patologija, Histologija

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Neoplazme prostate; Adenokarcinom; Prekancerozna stanja; Estrogeni receptor beta; Dijagnoza
UDK	616.65-006.5-091.8
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Adenokarcinom prostate (PCa) je najčešći karcinom u muškaraca. Intraepitelne prostatične neoplazme visokog gradusa (HGPIIN) su lezije koje prethode nastanku invazivnog karcinoma i podrazumevaju kompletno odsustvo bazalnih ćelija i invaziju strome malignim acinusima. Estrogeni receptor β (ERβ) se nalazi u jedrima bazalnih i sekretornih ćelija acinusa i delimično u stromalnim ćelijama.</p> <p>Cilj istraživanja je da prikaže i lokalizuje ERβ u različitim morfološkim lezijama prostate: hiperplaziji (BHP), PINu i u PCa sa različitim Gleason scorom. Pretpostavlja se da prekancerozne lezije u svojim različitim fazama evolucije ne koreliraju u potpunosti sa ekspresijom ERβ. LGPIN pokazuje ekspresiju, dok u HGPIINu nema ekspresije. Takođe je pretpostavka da ekspresija ERβ postoji u većine srednje diferentovanih PCa, te da se ekspresija posmatranog receptora gubi sa porastom Gleason scora.</p> <p>Ispitivano je pet grupa bolesnika: kontrolna grupa sa BHP i četiri eksperimentalne grupe (PIN i 3 različite grupe PCa). Studija je sprovedena na muškarcima različite starosti u periodu 2010–2012. Nijedan pacijent nije prethodno primio hormonsku terapiju. Sekstant biopsije prostate su bojene na ERβ (Novocastra). Lokalizacija i intenzitet ERβ ekspresije prikazani su kroz skor: 0 = nula; 1 = < 1%; 2 = 1–10%; 3 = 11–33%; 4 = 34–66%; 5 = > 66%. Pozitivni fibroblasti i endotelne ćelije su korišćene za poređenje.</p>

	<p>Smanjena ekspresija ERβ primećena je kod malignih i premalignih lezija prostate naspram BHP.</p> <p>Ekspresija ERβ u epitelnim ćelijama acinusa bila je najslabija u dobro diferentovanim PCa. Kod BHP i dobro diferentovanih PCa bila je veća ekspresija ERβ u bazalnim ćelijama nego u sekretornim. Loše diferentovani PCa prikazali su smanjenje ekspresije ERβ u bazalnim ćelijama.</p> <p>Ukupna ćelijska ekspresija ERβ predstavlja složen i ponekad moguće paradoksalan nalaz, na osnovu čega primarni PCa zadržava ekspresiju ovog receptora, ali ipak značajno nižu u poređenju sa benignim epitelom i premalignim lezijama. Ovaj nalaz podupire stanovište o antiproliferativnoj ulozi ERβ u tkivu prostate.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	15.09.2014.
Datum odbrane: DOz	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: Nada Vučković, redovni profesor, Katedra za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Dušan Lalošević, redovni profesor, Katedra za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Milica Matavulj, redovni profesor, Katedra za fiziologiju, genetiku i histologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>član: Tatjana Čebović, redovni profesor, Katedra za medicinsku biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,</p> <p>član: Vuk Sekulić, vanredni profesor, Katedra za hirurgiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.</p>

University of Novi Sad
 CIMSI
 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, Medical faculty
Author: AU	Aleksandra Fejsa Levakov
Mentor: MN	Prof. dr Matilda Djolai
Title: TI	The expression of estrogen receptor beta in precancerous prostate lesions and adenocarcinoma
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	english / serbian
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Ph.D Thesis contents: chapters: 8; pages: 147; pictures 41; graphs: 15; tables: 26; literature 101
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pathology, Histology

Subject, Key words SKW	Prostatic Neoplasms; Adenocarcinoma; Precancerous Conditions; Estrogen Receptor beta; Diagnosis
UC	616.65-006.5-091.8
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Adenocarcinoma of the prostate (PCa) is the most common cancer in men. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) are lesions that precede to invasive carcinomas and include complete absence of basal cells and stromal invasion by malignant acini. Estrogen receptor β (ERβ) is located in the nuclei of basal and secretory cells and partly in stromal ones.</p> <p>The aim of the research is to describe and localize ERβ in different morphological lesions: prostate hyperplasia (BPH), PIN and PCa with different Gleason score. It is assumed that pre-cancerous lesions in different stages of their evolution not correlate completely with the expression ERβ. LGPIN shows expression, while there is no expression in HGPIN. It is also an assumption that the expression ERβ exists in most medium-differentiated PCa, and that the expression of this receptor loses with increasing of Gleason score.</p> <p>Five groups of patient were investigated: control group with BPH and four experimental groups (PIN and 3 different groups of PCa). The study was conducted on men of different ages in the period 2010-2012. None of the patients received prior hormonal therapy.</p>

	<p>Sextant prostate biopsy were stained on ERβ (Novocastra). ERβ expression is shown through the score: 0 = zero; 1 = <1%; 2 = 1-10%; 3 = 11-33%; 4 = 34-66%; 5 => 66%. Positive fibroblasts and endothelial cells were used for comparison.</p> <p>Reduced expression was observed in malignant and premalignant lesions of the prostate versus BPH. ERβ expression in the epithelial cells of acini was the weakest in well-differentiated PCa. In BPH and well differentiated PCa was greater expression in the basal cells than in secretory ones. Poorly differentiated PCa showed a decreased ERβ expression in basal cells.</p> <p>Total cellular expression of ERβ is a complex and sometimes paradoxical finding on the basis of which the primary PCa retains expression of this receptor, but significantly lower compared to benign epithelium and premalignant lesions. This finding supports the antiproliferative role of ERβ in prostate tissue.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	15.09.2014.
Defended: DE	

Thesis Defend Board:
DB

president: Nada Vučković, Full professor,
Department of Pathology, Faculty of Medicine,
University of Novi Sad

member: Dušan Lalošević, Full professor,
Department of Histology and Embryology,
Faculty of Medicine, University of Novi Sad

member: Milica Matavulj, Full professor,
Department of Physiology, Genetics and
Histology, Faculty of Science, University of Novi
Sad

member: Tatjana Čebović, Full professor,
Department of Biochemistry, Faculty of
Medicine, University of Novi Sad

member: Vuk Sekulić, Associate Professor,
Department of Surgery, Faculty of Medicine,
University of Novi Sad

Disertacija je izrađena u Centru za patologiju i histologiju, Kliničkog Centra Vojvodine, u Novom Sadu.

Mentor rada: Prof dr Matilda Djolai

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorki Prof dr Matildi Djolai, na korisnim sugestijama i pokazanom strpljenju.

Zahvaljujem se Prof dr Pavlu Budakovu na nesebičnoj pomoći pri prvim koracima kako u radu, tako i specijalizaciji.

Zahvaljujem se upravnici Dr Mihaeli Mocko Kaćanski na materijalnoj i moralnoj podršci u sprovođenju ovog istraživanja.

Zahvaljujem se šefu katedre Prof dr Dušanu Laloševiću na srdačnoj saradnji pri izradi ove disertacije.

Zahvaljujem se Prof dr Nadi Vučković na svesrdnom podsticaju u izradi disertacije, ali i u celokupnom mom dosadašnjem radu.

Zahvaljujem se gospodinu Zdenku Tojčiću i firmi Galen Fokus na donaciji antitela.

Takođe se zahvaljujem svim zaposlenima Centra za patologiju i histologiju, kao i kolegama Kliničkog Centra Vojvodine, koji su doprineli izradi ovog rada.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i roditeljima, kojima i posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	5
1.1. Estrogeni receptori.....	5
1.1.1. Biološka uloga estrogenih receptora.....	5
1.1.2. Struktura estrogenih receptora.....	6
1.1.3. Mehanizam delovanja estrogenih receptora.....	8
1.1.4. Geni odgovorni za sintezu estrogenih receptora.....	9
1.1.5. Ekspresija estrogenih receptora u prostati.....	10
1.1.6. Estrogeni i androgeni receptori u morfogenezi prostate.....	13
1.1.7. Uloga estrogenih receptora u tumorogenezi.....	17
1.1.8. Estrogen receptor β u patologiji prostate.....	20
1.2. Anatomija prostate.....	25
1.3. Razvoj prostate.....	27
1.4. Histologija prostate.....	28
1.5. Uticaj hormona na rast prostate.....	33
1.6. Fiziologija i funkcija.....	33
1.7. Patološke promene prostate i njihova distribucija.....	34
1.7.1. Benigna hiperplazija prostate (BHP).....	34
1.7.2. Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN).....	39
1.7.2.1. PIN kao predznak maligniteta u iglenoj biopsiji prostate.....	42
1.7.2.2. Karakteristike PIN ćelija.....	44
1.7.2.3. Neoplastična progresija.....	46
1.7.2.4. Diferencijalna dijagnoza HGPINa.....	47
1.7.3. Intraduktalni kribriformni karcinom IDCP.....	48
1.7.4. Maligna intraduktalna proliferacija HGPINa.....	49
1.8. Dijagnostički kriterijumi adenokarcinoma prostate.....	49
1.9. Minimalni adenokarcinom u iglenoj biopsiji.....	50
1.10. Klinička interpretacija imunohistohemijskog bojenja u iglenoj biopsiji.....	53
1.10.1. Anticitokeratini	53
1.10.2. Anti-p63.....	54

1.10.3. Anti- α -methylacyl coenzym A racemase (P504)	54
1.10.4. Basal cell cocktail (34 β E12+p63).....	54
1.11. Klinička interpretacija adenokarcinoma u iglenoj biopsiji.....	55
1.12. Kvantifikacija karcinoma.....	56
1.13. Lokalizacija karcinoma.....	57
1.14. Adenokarcinom prostate (PCa).....	57
1.14.1.1. Gleason gradus i Gleason score.....	62
1.14.1.2. Gleason gradus 1.....	63
1.14.1.3. Gleason gradus 2.....	64
1.14.1.4. Gleason gradus 3.....	65
1.14.1.5. Gleason gradus 4.....	66
1.14.1.6. Gleason gradus 5.....	66
1.14.2. Invazija i metastaziranje.....	69
1.14.3. Klinička slika.....	69
1.15. Sekstant biopsija.....	70
1.16. Severno američki Whitmore-Jewett stadijumi.....	71
1.17. pTNM stadijumi.....	71
1.18. Mehanizmi hemoprevencije.....	72
1.19. Antagonisti estrogena mogu sprečiti nastanak adenokarcinoma prostate.....	74
1.20. Lečenje.....	75
1.20.1. Operativno lečenje.....	76
1.20.2. Zračenje.....	76
1.20.3. Hormonska terapija.....	76
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	80
3. HIPOTEZA.....	80
4. MATERIJAL I METODE.....	81
4.1. Metod rada.....	83
4.2. Histološka analiza uzorka.....	85
5. REZULTATI I ANALIZA.....	89
5.1. Starost ispitanika.....	89

5.2. Dužina bioptičkog isečka i poređenje sa vrednostima Gleason scora.....	91
5.3. Procena vrednosti Gleason scora i odnos prema starosti ispitanika.....	94
5.4. Procena vrednosti PSA u ispitivanim grupama i poređenje sa starosti ispitanika i vrednostima Gleason scora.....	96
5.5. Distribucija promena u odnosu na strane u posmatranim grupama	100
5.6. Ocena pozitivnosti ćelija na ERβ.....	101
5.6.1. Procenat obojenosti ERβ u stromalnim ćelijama.....	101
5.6.2. Procenat obojenosti ERβ u bazalnim ćelijama.....	103
5.6.3. Procenat obojenosti ERβ u sekretornim ćelijama.....	106
5.7. Odnos procenta ERβ pozitivnih ćelija prema Gleason scoru i vrednostima PSA.....	109
5.7.1. Odnos obojenosti stromalnih ćelija prema Gleason scoru i PSA.....	109
5.7.2. Odnos obojenosti bazalnih ćelija prema Gleason scoru i PSA	110
5.7.3. Odnos obojenosti sekretornih ćelija prema Gleason scoru i PSA.....	111
5.8. Analiza podgrupe sa Gleason scorom 7.....	113
5.9. Premaligne lezije prostate uz komparaciju sa starosti pacijenata i vrednostima PSA.....	118
5.9.1. Vrednosti PSA u ispitivanim podgrupama premalignih lezija.....	118
5.9.2. Ocena ERβ pozitivnih ćelija u podgrupama EP grupe.....	120
6. DISKUSIJA.....	123
6.1. Analiza ekspresije ERβ.....	124
6.2. Uticaj različitih faktora na ekspresiju ERβ u primarnim i metastatskim tumorima.....	130
6.3. Analiza ispitivanog uzorka.....	132
6.4. Analiza ostalih parametara (starost, Gleason score, PSA, dužina isečka)..	133
7. ZAKLJUČCI.....	135
8. LITERATURA.....	137
9. LISTA SKRAĆENICA.....	145

1. UVOD

1.1. Estrogeni receptori - ER

Estrogeni su steroidni hormoni koji imaju važan uticaj na rast, diferencijaciju i funkciju mnogih ciljnih tkiva, uključujući ženski i muški reproduktivni sistem (1-10).

Efekti estrogena u oba pola, su posredovani ligandom aktiviranim faktorom transkripcije estrogenim receptorom- ER (1,2,3,6,9,11,12). Estrogeni se sintetišu u ovarijumima i u perifernim tkivima. Najpotentnija forma estrogena je 17β -estradiol (E2), a postoje još i estriol (E3) i estron (E1), koji su ligandi sa visokim afinitetom za ER, ali deluju kao slabiji agonisti. Metaboliti estriol i estron mogu imati tkivno specifične uloge (8).

Hormoni nesmetano prolaze kroz ćeliju, a u ciljnim ćelijama se vezuju za intranuklearne proteine nazvane ER. Ovi receptori određuju ekspresiju specifičnih target gena, vezivanjem za target sekvence zvane 'elementi za odgovor', koje se nalaze u promotor regionu tog gena (2,4,8,9). Ulaskom u ćeliju E2 izaziva ligandom uslovljenu povećanu aktivnost dva različita promotor regiona (9).

U ljudskom genomu postoje dva nezavisna gena za ER (8,9).

1.1.1. Biološka uloga estrogenih receptora

Biološka aktivnost estrogena je uslovljena vezivanjem za jedan od dva specifična receptora $ER\alpha$ ili $ER\beta$, koji pripadaju superfamiliji jedarnih receptora, a u kojoj se transkripcija reguliše ligandima (4,5,6,8,9,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20). Vezivanje liganda izaziva konformacijske promene receptora koje dovode do dimerizacije, interakcije protein-DNK, angažovanja koregulatora i drugih faktora transkripcije i konačno formiranja preinicijacionog kompleksa (9). ER regulišu ekspresiju gena vezivanjem za istorodne elemente odgovora ili preko interakcije protein-protein sa drugim faktorima transkripcije (9,17).

ER β deluje kao dominantni regulator dejstva estrogena, koji u koekspresiji sa ER α dovodi do smanjene transkripcije uslovljene ER α (9,21). Antagonistički efekti ER α i ER β mogu biti rezultat razlika u njihovim transaktivacionim regionima (9).

Delecijom i inaktivacijom ER α u 'knock out' (α ERKO) miševa i dalje je postojalo specifično vezivanje estrogena u nekim tkivima. α ERKO miševi su razvili teške abnormalnosti reproduktivnih organa, ali delecija nije uticala na stabilnost kostiju i kardiovaskularni sistem. Ovo je ukazivalo na postojanje drugog receptora za estrogen (1,2,6,8). Deset godina nakon otkrića ER α , 1996-te u prostati pacova je pronađen drugi subtip - ER β (7,12,17) te su postavljena pitanja o fiziološkoj ulozi ova dva receptora (1,3,8). Ova dva različita estrogena receptora imaju jedinstvene i ponekad suprotne uloge. (5,7,8,9,11,12,15,18,22,23,24). Njihova najvažnija uloga je u morfogenezi (8).

Inaktivacijom oba ER u 'knock out' (ER $\alpha\beta$ KO) miševa pokazalo se da je život moguć, ali sa velikim oštećenjima: reproduktivne funkcije, imunog, skeletnog, kardiovaskularnog i centralnog nervnog sistema. Sveukupni proliferativni odgovor je rezultat ravnoteže između ER α i ER β (8,18).

1.1.2. Struktura estrogenih receptora

ER α u punoj dužini ima 595 aminokiselina i molekulsku masu od oko 66 kDa. Postoje brojne izoforme ER β sa produženim NH₂-terminalnim domenom ili različitim C-terminalnim domenom (6,9,12,13,16).

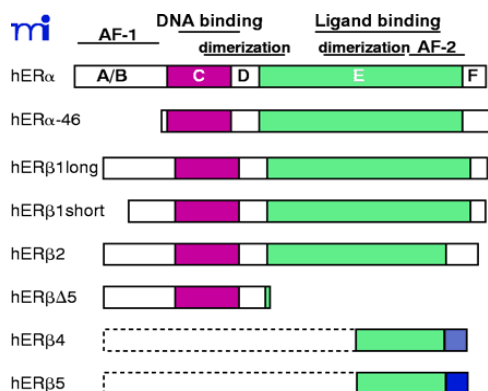
Originalni oblik ER β je izgrađen od 485 aminokiselina: ER β 1 short (485aa), ali kloniranjem dodatnog NH₂-terminalnog domena proširuje se na 530 aminokiselina - ER β 1 long izoformu (koju nalazimo kod čoveka) i 59,2 kDa. Iako postoje mišljenja da su obe forme funkcionalno ekvivalentne, njihove različite uloge, usled različitih NH₂-terminalnih domena tek treba istražiti (8,9,12,17).

ER β od 485 aminokiselina ima molekulsku masu 54,2 kDa (6).

ER β 2 od 495 aminokiselina ima molekulsku masu 55,5 kDa (17).

ER i ostali steroidni receptori su podeljeni na nekoliko funkcionalnih domena (slika 1):

- NH₂-terminalni domen (**AB**-domen) je varijabilan kako u sekvencama kao i u dužini, obično ima transaktivacionu funkciju za aktivaciju target gena.
- DNK-vezujući domen ili **C**-domen, služi za vezivanje specifične DNK i dimerizaciju receptora.
- Zglobni odn. **D**-domen omogućuje fleksibilnost prema DNK preko
- Ligand-vezujućeg **E**-domena koji je dosta velik. COOH-terminalni domen je multifunkcionalan, služi za dimerizaciju.
- C-terminalni ili **F**-domen učestvuje u transaktivacionom kapacitetu receptora, stabilnosti i angažovanju koaktivatora (2,4,6,8,9,12,25).



Slika 1: Šematsko prikazani hERα i hERβ i njihove posebne izoforme (9)

ERα i ERβ imaju strukturne i funkcionalne oblasti tipične za članove familije nuklearnih receptora, uključujući: oblast za povezivanje DNK, dimerizaciju, vezivanje za ligande i aktivaciju transkripcije (9,10). Oba receptora vezuju odgovarajuće estrogene elemente sa sličnom specifičnošću i afinitetom (7,9,12). Ligand-vezujuće oblasti su očuvane i oba receptora pokazuju slične afinitete za endogeni estrogen 17β-estradiol (E2) (8,9,10,17,26), kao i za fitoestrogene i selektivne estrogene receptor modulator (SERMs) (4). Fitoestrogeni imaju veći afinitet za ERβ od ERα (5,10,12). Estrogeni receptori pokazuju različit odgovor na sintetičke antagoniste estrogena: tamoxifen i raloxifen. Ovi ligandi su parcijalni agonisti za ERα, ali deluju kao čisti antagonisti za

ER β . Razlika u strukturi NH₂-terminalnog domena je moguće objašnjenje za različite odgovore na brojne ligande (9,12).

Međutim, ovi ER imaju jasno različite fizičke karakteristike, različitu biološku ulogu, različite ligande i kao najvažnije različitu tkivnu distribuciju (1,4,5,6,7,8,9,13,15,16,23,24,27). Razlikuju se i po koaktivatorima i korepresorima (regulatornim proteinima) koji modifikuju transkripciju, homodimerizaciju i heterodimerizaciju ovih receptora (4,8,9,10,12). Prekomerna ekspresija kofaktora moguće doprinosi nastanku estrogen zavisne maligne transformacije (9). ER α i ER β imaju suprotna dejstva u regulaciji nekih promotora i elemenata specifičnog odgovora. Funkcionalni antagonizam ER α i ER β se ogleda u direktnoj represiji ER β nekih ER α uslovljenih efekata uključujući redukciju masti i ćelijsku proliferaciju u uterusu i prostati. ER β umanjuje aktivnost ER α (9,10,18,21). Iako estradiol deluje na oba receptora, ER α stimuliše transkripciju i ćelijsku proliferaciju, dok ER β koči aktivnost ER α i suprimira proliferaciju epitela prostate (10).

ER α ima 3 različita promotora sa različitom tkivnom distribucijom. ER β takođe ima brojne promotore. Estrogeni, kao kontaminacija iz okoline, se takođe vezuju za ER. Iako oba receptora imaju relativno nizak afinitet, ER β vezuje za sebe dva ksenoestrogena: methoxychlor i bisphenol-A, sa znatno većim afinitetom nego ER α (1,2,5,6). Osim navedenih ksenoestrogena, ER pokazuju afinitet za policiklične aromatične ugljovodonike, ftalate, pesticide i fitoestrogene. Estrogena kontaminacija iz okoline utiče na endokrinu signalizaciju i dovodi do endokrinih poremećaja (oštećenje reproduktivne funkcije, karcinom dojke i endometrijuma). Dijeta bogata fitoestrogenima iz soje (genistein) i žitarica je udružena sa smanjenim rizikom od hormonski izazvanih karcinoma (8,12,21,22,24,28).

1.1.3. Mehanizam delovanja estrogenih receptora

ER se nalazi na jedarnoj membrani podeljen u višeproteinski inhibitorni kompleks. ER-i u inaktivnom obliku postoje kao monomeri vezani za 'heat shock' proteine. Nakon vezivanja hormona, dešavaju se konformacijske promene ER, transformišući ga u aktivni oblik koji stvara homodimere, pokazuje povećanu

fosforilaciju i vezuje se za promotore target gena. Aktivacijom se formiraju homodimeri ($ER\alpha/ER\alpha$; $ER\beta/ER\beta$) ili heterodimere ($ER\alpha/ER\beta$) koji daju različite transkriptivne profile u prisustvu liganda (7,9,10,12,13,24). Kompleks ligand-receptor reaguje sa transkriptivnim aparatom, preko koregulatornih proteina za ostvarivanje transkripcije target gena.

Postoje brojni dokazi da ER-i mogu biti aktivirani nezavisno od prisustva liganda, preko intracelularnog 'sekundarnog glasnika' i signalnih puteva (faktori rasta, protein kinaze). Faktori rasta aktiviraju kinaze i fosfataze i povećavaju fluks jona kroz membrane, te aktiviraju ER-e ili pridružene koaktivatore u nedostatku liganda. Aktivacija fosforilacijom se naziva unakrsna i omogućava indukciju ER-target gena u odsustvu steroidnog liganda (8,12). Na ovaj način faktori rasta učestvuju u hormon nezavisnom rastu nekih tumora (8,25).

Neki oblici $ER\beta$ su otkriveni u različitim ćelijama čoveka, ali i u maligno transformisanim ćelijama. Koekspresija ovih izoformi sa $ER\alpha$ inhibira estrogenom-posredovanu aktivnost gena, tako da ovi oblici mogu delovati kao inhibitori ER in vivo. Pretpostavka je da izoforme $ER\beta 1$ i $ER\beta 2$ mogu značajno menjati aktivnost estrogena, kao što $ER\beta 2$ inhibira transkriptivnu aktivnost uslovljenu kompleksom raloxifen- $ER\alpha$. Promotor region $ER\beta 2$ je podložan metilaciji DNK, što se viđa u mnogim ćelijskim linijama karcinoma i uzorcima iz karcinomskih tkiva (9).

Lečenje estrogenom smanjuje broj $ER\beta$ imunoreaktivnih ćelija, dok se njihov broj povećava u $\alpha ERKO$ miševa. Štaviše, dugotrajno izlaganje primarnih endotelnih ćelija dejstvu estrogena povećava ekspresiju $ER\alpha$ i smanjuje broj $ER\beta$ (9).

Značajan broj receptora je smešten na ćelijskoj membrani, ukazujući da su i oni proizvod istih gena kao i receptori jedarne membrane (9).

1.1.4. Geni odgovorni za sintezu estrogenih receptora

Estrogeni receptori su proizvodi različitih gena na različitim hromozomima (8,9,12). Gen za $ER\alpha$ je lokalizovan na 6q25.1 hromozomu (9) i znatno je veći od gena

za ER β . Gen za ER α je veliki gen, koji se sa translacijom eksona proteže preko 140 kb (1,2,3). Primarna ekspresija ER α je u materici, jetri, bubrezima i srcu (9).

Humani ER β je u 89% građe identičan pacovskom ER β , u 88% mišijem ER β , a u 47% humanom ER α (1,2,4,5,8,9,16,29). Gen za ER β je slabije opisan i veličine je oko 40 kb. Humani ER β gen se nalazi na dužem kraku 14. hromozoma, u regionu 22-24 (1,2,3,8,17).

Najveća ekspresija ER β je prisutna u bubregu, timusu i tankom crevu, zatim u plućima, slezini, hipofizi, leukocitima, koštanoj srži, debelom crevu, materici i mlečnoj žlezdi (1,2,3,5,8,9,11,12,17). Estrogeni imaju veliki uticaj na imuni sistem (5,12,30). U trudnoći suprimiranjem imunog sistema, dolazi do smanjenja slezine i timusa. Većina autoimunih bolesti je češća kod žena (30). Brojna tkiva u kojima je nađena visoka ekspresija ER β su u vezi sa imunim sistemom. Jaka ekspresija ER β je prisutna u testisu i ovarijumu (granuloza i teka ćelije) (1,2,3,4,5,6,7,8,9,16,17,31).

Što se prostate tiče, slabiji signal ER β je viđen u epitelu i sekretornim alveolama, dok u stromi nije registrovan (1,2,3,9,17,31). U testisu, ER β je nađen u primarnim spermatocitama i ranim spermatidama (5,17). Brojni istraživači su analizom isečaka tumora prostate našli veće vrednosti ER β od ER α (1,2,3).

Lokalizacija ER β na 14q22-24 je u blizini gena zaslužnog za nastanak Alzheimer-ove bolesti. Ovaj region je takođe odgovoran za nastanak leiomioma uterusa i renalnih neoplazmi (1,2,5).

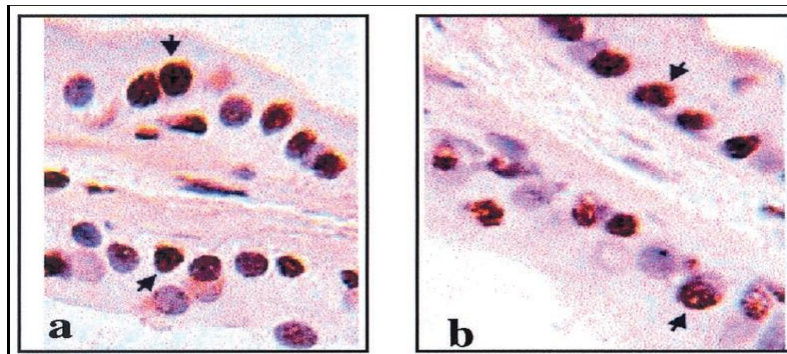
Gen za androgeni receptor-AR je lokalizovan na Xq11-12 hromozomu, sadrži 917 aminokiselina i molekularnu masu od 110 kDa (25,32). Marcelli navodi da AR gen ima dva mikrosatelita: poly-Q i poli-G (ponovljenih na eksonu 1). Proširenje poly-Q segmenta ima inhibitorni efekat na transkripcijsku aktivnost AR.

1.1.5. Ekspresija estrogenih receptora u prostati

ER α je prisutan pre svega u stromi prostate (10,12,21,23,26,33,34,35), dok se sporadično vidi u bazalnim ćelijama (15,24,27,36).

Ekspresija ER β je zabeležena u normalnoj prostati-NP, benignoj hiperplaziji prostate-BHP i adenokarcinomu prostate-PCa. Neke studije su pokazale smanjenje njegove ekspresije u PCa, ali značaj ovog nalaza još uvek nije jasan, kao što ni uloga ER β u patologiji i fiziologiji prostate još uvek nije definisana (2,3,4,5,10,11,12,13,16,21,22,23,27,29,33,35,36,37).

ER β je steroidni receptor lokalizovan u jedru bazalnih ćelija acinusa prostate (3,26,29,36) i manjim delom u stromalnim ćelijama (4,27) (slika 2). Neki od autora nisu našli prisutnost ER β u sekretornim ćelijama (4,27). Drugi autori su našli ekspresiju ER β u sekretornom epitelu prostate (6,10,23,24). ER β je prisutan u sloju bazalnih ćelija, koje su androgen-nezavisne, predstavljaju matične ćelije i učestvuju u proliferaciji. Sa druge strane, sekretorne ćelije sa visokom ekspresijom ER β su diferentovane ćelije, zavisne od androgena, ali bez proliferativnog kapaciteta (24).



Slika 2: Imunohistohemijsko bojenje sa ER β 503 IgY u ventralnoj prostati (22)

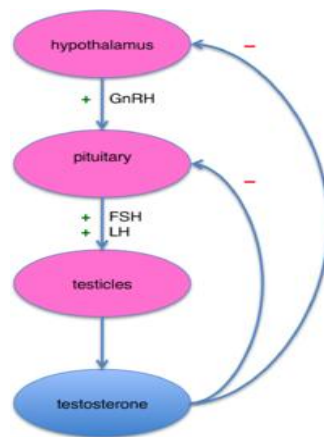
a) miša i b) pacova. Strelica pokazuje pozitivno obojena smeđa jedra. Jedra stromalnih i nekih epitelijalnih ćelija su negativna, plavo obojena. Nema citoplazmatskog bojenja epitelnih ćelija.

AR su različito prisutni u bazalnim, a konstantno izraženi u sekretornim i stromalnim glatkim mišićnim ćelijama (27,34,38).

Zbog lokalizacije ER α u stromi prostate, misli se da je dejstvo estrogena na epitel posredovano stromalnim ER, odnosno parakrinim mehanizmima (10,12,15,21,22,23, 24,26,29,36).

Lokalizacija ER β u epitelu prostate, omogućava direktno dejstvo estrogena na epitelne ćelije (12,31,36). Decenijama je poznato dejstvo estrogena na prostatu, ali nije poznato koji od njih nastaje direktnim vezivanjem za receptore, a koji indirektno, preko hipotalamo-hipofizne osovine dovode do smanjenja gonadotropne sekrecije (GnRH) i smanjene sinteze testikularnog testosterona (11,12,18,27,29,36,37) (slika 3).

Estrogeni dovode do supresije lučenja hipofiznog luteinizirajućeg hormona-LH, koji tada smanjuje lučenje testosterona. Analoz LH-releasing hormona (LHRH) se ponašaju slično, i uzrokuju farmakološku orhiektomiju (39).



Slika 3: Hipotalamo–hipofizno–testikularna osovina (Preuzeto iz Testosterona-ciclo.png; Acracia derivative work: Boghog2 - Testosterona-ciclo.png)

Estrogeni hormoni su uključeni u indukciju i prevenciju PCa (24,28,36,37). Egzogeni estrogen može narušiti hipotalamo-hipofizno-gonadalnu osovinu svojim direktnim dejstvom na ER prostate. Prekomerno izlaganje estrogenima tokom kritičnih stadijuma u razvoju, ili dugotrajnim tretiranjem odraslih životinja sa estrogenima ili androgenima uslovljava neoplaziju prostate (6,40). Ishrana bogata fitoestrogenima, posebno sojom, pokazala je hemopreventivne osobine i nizak rizik za razvoj PCa (8,12,21,22,24,28,41).

Sadašnje studije su pokazale da se 17 β -estradiol (E2) i 3 β Adiol takmiče u vezivanju za ER β a na osnovu njihovog odsustva u prostatama β ERKO miševa. Verovatno je 3 β Adiol endogeni ligand ER β , a njegov biosintetički prekursor sa antiproliferativnom ulogom u prostati je 5 α dihidrotestosteron. Tako je ER β fiziološki

regulator epitelijalnog rasta i diferencijacije u prostati (5,11,12,15,21,23,24,27,37). Interesantna je analogija prethodno opisanog antiproliferativnog dejstva ER β u nerazvijenom uterusu pacova, gde ima suprotno dejstvo od stimulativnog efekta ER α (9,22,23,24)

U eksperimentima gde su se ligandi takmičili za vezivanje sa ER β , najveći afinitet je imao 17 β -estradiol (E2) > diethylstilbestrol (DES) > estriol (E3) > estrone (E1) > 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol (3 β Adiol) >> testosteron = progesteron = corticosteron. Vezivanje ER β za E2, u odsustvu ostalih liganada, je bilo 100% (6).

1.1.6. Estrogeni i androgeni receptori u morfogenezi prostate

ER α nije nađen u morfološki normalnoj prostati tokom fetalnog razvoja. Slaba ekspresija se registruje u fokusima skvamozne metaplazije. Prva jaka ekspresija je nađena u periacinarnoj stromi postnatalne prostate, i može isticati parakrini efekat na dalji razvoj žlezde. U prepubertalnoj prostati ER α se nalazi na nivou stromalnih ćelija, kao i u odraslih (12,13,18,26).

ER β se prvi put umereno registruje u epitelu i stromi urogenitalnog sinusa u 7. nedelji gestacije (12), odn. u epitelu periuretralne regije prostate u 13. nedelji gestacije (13). Receptor se intenzivno registruje u epitelu i stromi između 18. i 23. nedelje, u periodu kada su nivoi estrogena viši od nivoa androgena (12). Solidne epitelne trake razvijaju lumene, što odgovara inicijalnom stadijumu citodiferencijacije matičnih ćelija u dva reda ćelija: bazalne i luminalne (26). Ovaj period gestacije je zapravo period najveće proliferacije i epitela i strome žlezde. Zatim dolazi do smanjene proliferacije ćelija, dok je ekspresija ER β i dalje visoka, i kao takva ostaje i u postnatalnoj prostati. ER β je prisutan u jedrima kako bazalnih, tako i sekretornih ćelija. U 16. mesecu postnatalnog razvoja dolazi do promene u ekspresiji, te bazalne i suprabazalne ćelije i dalje pokazuju ekspresiju ER β , dok se u sekretornim ćelijama ona gubi. U prepubertalnoj prostati ekspresija ER β se nalazi na nivou bazalnih ćelija. Sve govori u prilog da je ER β primarni 'transducer' estrogenog dejstva u fetalnoj prostati čoveka i kao takav, može imati ulogu u regulaciji rasta i diferencijaciji fetalne žlezde (12,13,26).

U 13. nedelji gestacije androgeni iz fetalnog testisa dostižu najviši nivo, koji nakon 18. nedelje naglo pada i ostaje nizak do puberteta. U 11. nedelji gestacije u fetalnoj prostati su nađeni AR u jedrima stromalnih ćelija, oko prostatične uretre. Ekspresija AR u 16. nedelji se vidi u epitelu, ali i u stromi. AR su prisutni samo u sekretornim ćelijama, dok se ne nalaze u bazalnim ćelijama. Od 28-34. nedelje gestacije nalazi se varijabilna slika ekspresije AR. Na rođenju, AR su slabo prisutni u sekretornim ćelijama, bez jasne granice prema bazalnim. Od 5. meseca postnatalno u potpunosti je nestala pozitivnost na nivou bazalnih i luminalnih ćelija, ostaje pozitivna ekspresija AR samo na nivou strome. Ove ćelije imaju parakrini efekat na proliferaciju epitela, izduženost i grananje kanalića i glandularnu diferencijaciju prostate (13,26,42).

Funkcionalna diferencijacija epitela prostate se razvija nakon citodiferencijacije i karakteriše se ekspresijom sekretornih gena u ćelijama. Ovaj proces započinje u ventralnoj prostati i ubrzava se sa porastom testosterona u pubertetu. Sledeći značajan porast epitelnog ER β mRNK, govori da je za funkcionalnu diferencijaciju neophodna potpuna ekspresija ER β . Kastracijom odraslih jedinki beleži se izrazito smanjenje ER β mRNK, koje se popravljva dodavanjem testosterona, ukazujući da je ekspresija ER β uslovljena androgenom regulacijom (26).

Postoji značajna histološka, strukturalna i funkcionalna heterogenost epitela prostate duž razgranatog kanalikularnog sistema, od uretralnog ishodišta do distalnih terminalnih ogranaka. Proliferativna aktivnost se primarno odvija na distalnim krajevima, dok se apoptoza registruje u proksimalnim kanalićima prostate. Ekspresija sekretornih proteina se vidi u epitelu distalnih krajeva i centralnim kanalićima prostate, ali ne i u proksimalnim delovima. Nema gradijenta u ekspresiji AR, ni 5 α -reduktaze duž kanalića, te se ovakva heterogenost epitela, uslovljena androgenom, može tumačiti razlikama u organizaciji strome duž kanalikularnog sistema (26).

16. nedelje gestacije dolazi do porasta nivoa estrogena u fetalnoj prostati (12). Nasuprot androgenima, nivo estrogena raste do porođaja, kada pada zbog gubitka placentalne i maternalne sinteze. Sa rođenjem fokusi metaplazije nestaju usled odsustva cirkulišućih estrogena (12,13).

Razvoj prostate u čoveka je prvo pod glavnim uticajem androgena (13,42), dok je u drugoj polovini gestacije estrogen taj, koji dominira u žlezdi (13,28).

Prisustvo AR pre ER β u epitelnim ćelijama početkom gestacije, kao i predominacija androgenog uticaja može inicirati ekspresiju ER β subtipa. Rano odsustvo ovog receptora u stromi prostate pokazuje da je njegovo primarno dejstvo na epitel (12). Sa porastom estrogena, ćelije epitela i strome pokazuju visok Ki-67. Formiranjem lumena u epitelnim gnezdima, ćelije koje se boje na 'high molecular weight citokeratin'-HMWCK, pozitivne su na ER i negativne na AR, progresivno se smeštaju u bazalnim delovima duktusa i acinusa, analogno njihovoj poziciji u odraslih. One čine glavni proliferativni odeljak. ER β je jako pozitivan u bazalnim i slabo pozitivan u sekretornim ćelijama odraslih. Neke sekretorne ćelije koje još pokazuju pozitivnost na ER β ili Ki67 su nepotpuno diferencirane-intermedijerne ćelije, zadržavaju sposobnost proliferacije tokom života (13,43).

Na osnovu svega iznetog može se pretpostaviti uloga ER β u fetalnom periodu da prvo stimuliše, a zatim ograničava proliferaciju u prostati. Tačni mehanizmi ovakvog delovanja još nisu poznati, ali se pretpostavlja da uloga koaktivatora i korepresora može varirati u različitim periodima razvoja. Takođe je moguća ekspresija različitih varijanti ER β u različitim periodima razvoja, koji dovode do suprotnih efekata na ćelijsku proliferaciju.

Međusobno delovanje androgena i estrogena u fetalnoj prostati dovode do zajedničke ekspresije AR i ER β na nivou strome i sekretornih ćelija (25,38). Sami faktori rasta i njihovi receptori su neophodni za komunikaciju epitela i mezenhima (8,18). Estrogeni povećavaju dejstvo androgena na fetalnu i adultnu prostatu. Njihovo udruženo delovanje utiče na razvoj displazije i karcinoma u odraslih (25,40,43) Mnogi autori su pokazali da su bazalne ćelije, u stvari target ćelije za estrogenom indukovanu skvamoznu metaplaziju u prostati, odn. za dejstvo steroidnih hormona i kao takve imaju sposobnost proliferacije (12,13,43). U razvojnoj prostati mezenhimalne i glatke mišićne ćelije su target ćelije estrogenog dejstva, a stromalni parakrini efekti se ostvaruju na susednom epitelu (25,26).

Skvamozna metaplazija je bila odsutna u prostatama α ERKO tretiranim sintetičkim estrogenom DES-om, ali je nađena u β ERKO i 'wild type' miševa.

Estrogenom uslovljeno dejstvo ER β može biti uključeno u regulaciju proliferacije epitela (5,6,10,12,13,21,23,31,36,40). Buduća ispitivanja treba da odrede da li receptor ograničava ili ubrzava proliferaciju ćelija u razvoju prostate i mehanizme kojima se ovi suprotni efekti mogu izvesti.

Različiti efekti estrogena na prostatu su objedinjeni na sledeći način:

U prostati odraslih životinja, estrogen povećava rast strome i involuciju epitela. Regresivni efekat estrogena nastaje zbog supresije na GnRH u CNSu, koji smanjuje sekreciju gonadotropina hipofize i dovodi do smanjene sinteze testosterona u testisu (18,20,29).

U prostati kastriranih odraslih životinja, estrogen stimuliše rast strome i rast epitela. Ovaj model i nije posebno dobar za procenu dejstva estrogena na epitel i uloge ER β , ne samo zato što epitel regredira nakon kastracije, već dolazi i do pada ER β . Stromalni efekti estrogena se ostvaruju preko ER α (18,21,26).

U nezrelih glodara izlaganje egzogenim estrogenima pre puberteta, dovodi do trajnih promena prostate u smislu neosetljivosti na androgene. Prostata odraslih, izlagana egzogenim estrogenima u neonatalnom periodu je manja, iako je povećan broj stromalnih ćelija. U ovih životinja starenjem se razvija hiperplazija epitela, ili čak i displazija, ako su sa estrogenima davani i androgeni (24,29,37). Davanjem sintetičkog estrogena DESa in utero, u oba pola su se uočile abnormalnosti urogenitalnog trakta. α ERKO miševi su bili otporni na davanje DESa. Ventralna prostata je pokazivala izdužene i proširene, slabo razgranate kanaliće sa oskudnom stromom, što govori o ulozi ER α na rast strome, odn. mezenhima, a ne epitela (8).

Delovanjem estrogena in vitro, u kulturi tkiva se razvija skvamozna metaplazija. Ovaj region nije reprezentativan za celu, već samo za anteriornu prostatu u glodara. Estrogen ima direktno inhibitorno dejstvo na alveolarni epitel prostate (8). Moguće da je ovakav efekat ostvaren preko epitelnog ER β (27,37).

U kulturi karcinomskih ćelija prostate zapaženi su i proliferativni i antiproliferativni efekti, u zavisnosti od različite ćelijske vrste. Ova razlika je rezultat različitih nivoa ER α i ER β u ove dve ćelijske populacije. Estrogen se koristi u lečenju pacijenata sa PCa, a njegova efektivnost je rezultat smanjenja cirkulišućeg testosterona (19,36,37). Primećen je

odgovor u terapiji estrogenom kod kastriranih životinja sa PCa, kao i kod androgen rezistentnih tumora. Pokazalo se da estrogen ima direktan efekat na karcinomske ćelije prostate (37). Paech je našao da E2 inhibiše transkripciju preko ER β , ali je aktivira delovanjem preko ER α .

1.1.7. Uloga estrogenih receptora u tumorogenezi

Biološka funkcija ER se ogleda u zaštitnom dejstvu estrogena na epitel prostate od nepredviđene proliferacije, neoplastične transformacije i oksidativnog oštećenja (3,5,12,21,28,36,37). AR su zaslužni za proliferaciju i sekreciju epitela prostate (18,38), a ER β je faktor endokrine kontrole rasta prostate, suprimira proliferaciju i omogućava diferencijaciju samog epitela (12). Kako su proliferacija i diferencijacija, jedna nasuprot druge, ćelijska homeostaza je rezultat dinamičkog balansa (2,3,4,8,11,15,18,36,44).

Danas postoje 4 modela inaktivisanih (knock out) gena estrogenih receptora: ER β (β ERKO), ER α (α ERKO), ER α + ER β (ER $\alpha\beta$ KO), i aromatase (ArKO) miševa. Poređenjem fenotipa prostata u ovih životinja spoznajemo ulogu estrogena i ER (37) i istraživači su našli da se u β ERKO miševa starenjem razvijaju hiperplastične lezije epitela ventralne prostate (5,11,12,34,36). Da li zbog povećane proliferacije ili smanjene apoptoze, tek epitelne ćelije u β ERKO miševa nikako nisu u G0, već su stalno u ćelijskom ciklusu, što pokazuju i ekspresijom Ki-67. Izgledalo je da ER β zaustavlja ćelijski ciklus. Takođe su u prostati β ERKO miševa našli povećani broj AR (23), koji se nisu mogli oboriti estrogenima, kao u običnih, 'wild type' miševa. AR su izgleda, regulisani preko ER β . 3 β Adiol smanjuje broj AR u 'wild type', ali ne i u β ERKO miševa (37). Regulacija AR može biti način kako ER β ograničava rast i indukuje diferencijaciju fenotipa prostate (3,22,23). Povišeni AR u epitelu i smanjeni u stromi se smatraju mogućim faktorom nastanka PCa, ali precizan odnos između AR, cirkulišućih androgena i karcinoma ostaje i dalje nejasan (22,38,42,45).

DeMarzo je našao da većina PCa pokazuje ekspresiju AR i da je njihova regresija uslovljena oduzimanjem androgena (25,28,34,42,45,46). Na većinu metastatskih PCa se deluje supresijom androgena ili blokadom AR. Vremenom tumori prestanu da odgovaraju

na terapiju, kako postaju androgen nezavisni. I tada zadržavaju funkcionalnu ekspresiju AR, jer su AR krucijalni u opstanku karcinomskih ćelija. U nedostatku klasičnih liganada, nekoliko različitih molekularnih mehanizama omogućava funkciju AR: amplifikacija gena AR, praćena prekomernom ekspresijom receptora povećava osetljivost na niske cirkulišuće koncentracije androgena; mutacija AR dovodi do promene specifičnog liganda sa rezultujućom antiandrogenom aktivacijom; koaktivatori su takođe zaduženi za ligand-nezavisnu aktivaciju receptora (25,46).

Specifična signalna kaskada androgena uključuje: sintezu testosterona u testisu i nadbubregu, perifernu konverziju testosterona u dihidrotestosteron-DHT, transfer DHT do ciljnih tkiva, vezivanje DHT za target receptore sa posledičnom modulacijom genske ekspresije. I testosteron i DHT se vezuju za AR, ali DHT ima veći afinitet (25,35). Ukoliko nije vezan za ligand, AR se nalazi kao inaktivan u citoplazmi (35). DHT se vezuje za AR i formira kompleks koji zatim trpi konformacijsku promenu, premešta se do jedra i vezuje za target gene 'Androgen Response Elements'- ARE. Vezivanjem za koregulatore formira se multiproteinski kompleks koji reguliše transkripciju gena 5 (25,35,47). DHT stimuliše različite populacije ćelija prostate na produkciju PSA, faktora rasta i inhibitornih faktora koji određuju proliferaciju i funkcionisanje ćelija (35). Marcelli navodi da AR gen ima dva mikrosatelita. Pojedini autori su našli da skraćenje poly-Q segmenta smanjuje transkripcijsku aktivnost AR, i povećava rizik za nastanak PCa (25).

Uočava se polimorfizam na N-terminalnom domenu ARa. Produženje glutaninskih sekvenci na N-terminalnom domenu štiti receptor od androgenog uticaja i viđa se u Istočnoj Aziji. Kraće sekvence ovog domena su izložene preteranoj stimulaciji androgenima i nalaze se u Afričkih Amerikanaca, zato oni oboljevaju u proseku 10-tak i više godina ranije od Azijata (25,47). Polimorfizam gena u sintezi i signalnoj transdukciji testosterona su nedavno okarakterisani kao biomarkeri za PCa (geni za sintezu: 17 α -hidroksilaze, 5 α -reduktaze, AR i PSA).

Iako su BHP i PCa različitog celularnog ishodišta, obe lezije su pod endokrinom i moguće genetskom kontrolom.

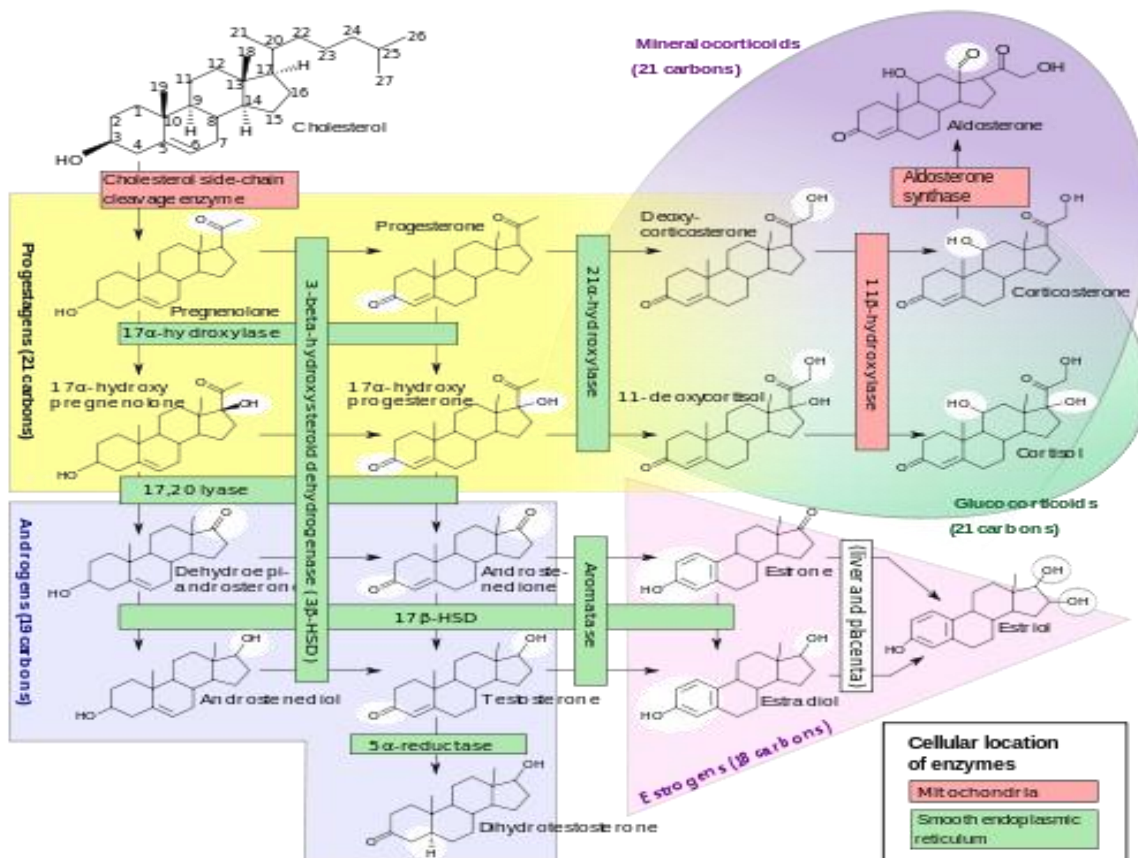
PSA gen je target za AR. Da bi se obavila transkripcija PSA gena, AR mora delovati na AREe u promotor regionu PSA gena (47).

Nedostatak inhibitora ćelijskog ciklusa p27, je udružen sa agresivnim ponašanjem brojnih tumora (4,43).

Glutathion-peroxidaza (GSH-PO) je glavni antioksidativni enzim prostate i njegovo smanjenje je povezano sa nastankom hiperplazije prostate.

Glutathion S-transferaza (GST) učestvuje u celularnoj detoksikaciji, sprečava karcinogenezu inaktivacijom reaktivnih elektrofila i konjugacijom za redukovani glutathion. Citoplazma bazalnih ćelija normalnih duktusa i acinusa se boji imunohistohemijski na GST. Tokom procesa karcinogeneze dolazi do hipermetilacije gena za kodiranje GSTa, te se gubi bojenje u 'high-grade' prostate intraepithelial neoplasia- HGPIN lezijama (45).

Mc Pherson se pita da li je estradiol jedini fiziološki ligand ER β u prostati?. Estradiol-17 β (E2) je najmoćniji estrogen koji se koristi kao ligand u studijama ER (8,22,37). Specifični efekti estrogena u tkivu zavise od nivoa estrogena i količine ER. U nekim drugim tkivima estradiol nije glavni estrogen. Konverzijom testosterona pomoću aromataze u prostati, nastaje 3 β Adiol (12,33) (slika 4). Nivo 3 β Adiola u prostati je 100 puta veći od nivoa E2 (20). Kako je afinitet 3 β Adiola za ER α 10 puta manji od E2, njegova koncentracija u prostati ga čini verovatnijim endogenim ligandom za ER. 3 β Adiol se vezuje za ER α i sa još većim afinitetom za ER β , ali se ne vezuje za AR (6,22,33,37).



Slika 4: Steroidogeneza u čoveka, testosteron je prikazan na dnu (Preuzeto iz Häggström M. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. Wiver J Med 2014; 1 (1).)

1.1.8. Estrogen receptor β u patologiji prostate

Različite studije su pokazale ekspresiju ER β u BHP i PCa (6,16,23). Generalno nije nađena korelacija između ekspresije ER β u ovim lezijama, ali je u PCa nađena manja ekspresija, dok je u metastazama prisutno ponovno javljanje ER β (4,21,23,27,31,36).

Izražena ekspresija ER β se nalazi u bazalnim ćelijama NP (4,12,15,26,27), a ova subpopulacija ćelija ima različite biološke osobine od sekretornih epitelnih ćelija, naročito u sposobnosti da proliferišu (43,48), sintetišu steroide, kao i u ključnoj ulozi u karcinogenezi prostate.

Kako imunohistohemijske studije koriste samo jedno ER β antitelo, nije moguće precizirati koja se izoforma ispoljila. Postoje najmanje 4 izmešane izoforme ER β u prostati (485aa, 495 aa, 503aa i 530aa). Ove izoforme imaju različite kapacitete za vezivanje estrogena i različito utiču na funkciju ER α i ER β u 'wild type' miševa (22,24) Postojanje izoformi ER β značajno komplikuje razumevanje uloge ER β u humanoj prostati.

Mehanizam dejstva estrogena u prostati je komplikovan i do kraja nejasan (19). Brojni podaci ukazuju na antiproliferativno dejstvo ER β u epitelnim ćelijama i sugerišu da selektivni ligandi ER β mogu biti korisni u prevenciji ili lečenju PCa (3,4,5,13,15,22,23,28,35).

Pozitivna ekspresija ER β je nađena u 90% BHP, 47% u PINu, a svega 17,2% u PCa. ER β je jako prisutan u BHP, a zatim se uočava progresivni gubitak njegove ekspresije u hiperplastičnom epitelu, i u još većem stepenu u invazivnom karcinomu. Ekspresija ER β je obrnuto proporcionalna stadijumu i gradusu (3,4,12,21,23,24,31,44). Pasquali je pokazao da gubitak ER β u sadejstvu sa nepoznatim molekularnim dešavanjima može ubrzati ćelijsku proliferaciju i moguće karcinogenezu (5,36). Interesantno je da nešto malo slučajeva nema promene, ili pokazuje porast ekspresije ER β u tumoru, u odnosu na NP.

Ekspresija ER β u 'low-grade' PINu je mogući odgovor na proliferativne stimulse u ranim fazama displazije, a nedostaje u HGPINu, što možda doprinosi inicijalnoj fazi kancerogeneze (4,23,27). Prisutnost ER β u sekretornim ćelijama kod 'low-grade' displazija može predstavljati prolazni i neuspešni pokušaj zaustavljanja rasta ovih ćelija. Nestajanje ER β pozitivnih bazalnih ćelija u 'high-grade' displazijama može značiti kontinuirani gubitak inhibicije proliferacije ovih prekursornih lezija (23,27,31)

Mehanizam inaktivacije ER β u PCa je i dalje nepoznat (3,4,13,23). ER β se nalaze u većini srednje diferentovanih PCa i jako su zastupljeni u androgen nezavisnim, metastatskim tumorima (4,24). Ovaj nalaz je takođe kontradiktoran, da li je ER β pozitivan ili negativan nalaz? Da li je njegov gubitak udružen sa tumorogenezom (23) i/ili tumorska progresija ili ekspresija ER β u uznapredovalim PCa jeste transdukcioni signal koji pomaže agresivnost tumora. Brojni geni bazalnih ćelija zapravo nisu zavisni

od androgena i ponovno se ispoljavaju u uznapredovalim androgen-nezavisnim tumorima. I ER β se slično ponaša, te se nalaz pozitivnih tumorskih ćelija na ER β u metastatskih androgen-nezavisnih tumora može koristiti u potencijalnim terapijskim metodama. Ovi podaci postavljaju više pitanja nego što daju odgovora (4,8).

Leav je upotrebom poliklonalnog antitela za registrovanje posttranskripciono modifikovanog oblika dugačke izoforme ER β izgubio pozitivnost na nivou HGPINa i PCa u tranzicionalnoj zoni, da bi se ponovo pojavila u Gleason gradusu 3 periferne zone i metastatskim promenama, pa opet značajno smanjila u gradusu 4 i 5. Fixemer je koristio monoklonalno antitelo, registrovao ER β u sekretornim ćelijama i pokazao prisutnost receptora u primarnih i metastatskih tumora i delimični nedostatak u HGPINu i androgen nezavisnim stadijumima bolesti.

U primarnim tumorima prostate, ekspresija ER α u epitelu značajno korelira sa Gleason gradusom-GG. U svim displazijama ER α je bio odsutan. Dobro i srednje diferentovani PCa retko pokazuju ekspresiju ER α . Loše diferentovani tumori pokazuju pozitivnost ER α u oko polovine slučajeva. Najizraženija ekspresija ER α je registrovana u recidivima nakon hormonske terapije i u metastazama limfnih čvorova i kosne srži. Progresivno kasno pojavljivanje ER α u PCa se odvija paralelno sa procesom dediferencijacije, metastaziranja i neosetljivosti na androgene (12,24,27,29). Tumorske ćelije sa ER α su potencijalno osetljive na estrogen i mogu preživeti u odsustvu androgena, koristeći estrogen za svoj opstanak (27,29).

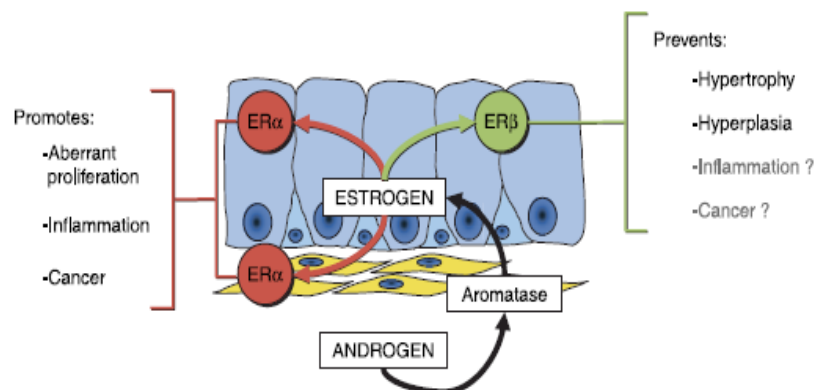
Royuela je našao pozitivnost epitela na ER β u NP oko 13%, u BHP 30%, dok se u PCa većina ćelija bojila na ER β (16). ER β se nisu nalazili u stromi NP i BHP, dok je u PCa bilo 12% pozitivnih ćelija u stromi prostate.

U 'low' i 'moderate-grade' PINu, ER β je lokalizovan u jedrima bazalnih i displastičnih sekretornih ćelija. ER β se gubi i nestaje u displastičnim sekretornim ćelijama 'high grade' PINa, a manje je prisutan na nivou bazalnih ćelija. AR su izrazito prisutni u većini displastičnih ćelija (27).

Leav i Bonkoff su našli prisustvo ER α u stromi PCa u oko 7% slučajeva. Prelaz iz pozitivne u negativnu ekspresiju ER β na nivou bazalnih ćelija su uočili u gradusu 3 PCa

(87%) a prema lošije diferenciranom stupnju 4/5 (20%), dok su AR bili prisutni u većini karcinomskih ćelija (27,39).

Nalaz sva tri receptora na nivou strome govori o transdukciji steroidnih signala parakrinim mehanizmima u epitelne ćelije. ER β deluje kao transdominantni inhibitor transkripcije ER α i dovodi do smanjenja sveukupne ćelijske osetljivosti na estradiol. Zajedno prisutni ER β i ER α u stromalnim ćelijama mogu imati ključnu ulogu u regulaciji njihovih parakrinih signala u epitelne ćelije. Estrogeni dejstvom preko ER β smeštenih u bazalnim ćelijama, mogu direktno uticati na sam njihov rast. Lokalizacija, odn. gubitak ER β koji vidamo u neoplastičkoj progresiji može predstavljati oštećenje funkcije receptora (27) (slika 5).



Slika 5: Lokalni mehanizmi estrogene signalizacije u prostati (18)

Testosteron se lokalno metaboliše u estrogen pomoću aromataze i deluje preko ER α ili ER β . Štetni efekti preko ER α u stromi i epitelu podrazumevaju aberantnu proliferaciju, inflamaciju i karcinom. Nasuprot tome, estrogen je takođe sposoban da korisno deluje preko ER β u epitelu, koji učestvuje u prevenciji hiperplazije i hipertrofije, ima anti-proliferativnu i anti-kancerogenu ulogu.

Kontroverzni su rezultati u ekspresiji ER na nivou epitela prostate.

Metastaze PCa u limfne čvorove i udaljene organe (kosti, pluća, jetru) su pozitivne na ER β (12), a njihova ekspresija je moguće indukovana lokalnom

mikrookolinom u ovim tkivima. Takođe se uočava pozitivna ekspresija AR i negativna na ER α (27).

Lau je našao prisutnost ER β u ćelijskim linijama karcinoma prostate: LNCaP, PC-3 i DU-145, različite aktivnosti ER i progesteronskih receptora-PR (15), dok je Bonkhoff našao slabiju ekspresiju ER α u dobro diferentovanih tumora i jaku ekspresiju u HGPINu, u loše diferentovanih PCa (29), kao i u metastazama (24). Drugi autori su našli suprotan nalaz, te je i ekspresija ER α ispala kontroverzna.

Hipermetilacijom DNK se uspavljaju ER α geni u karcinomskim ćelijama, moguće i u normalnom epitelu. Demetilacioni agensi su doveli do reekspresije ER α u karcinomskim ćelijskim linijama (15,36). Danas nema podataka o metilaciji ER β gena i njihovoj mogućoj ulozi u gubitku ekspresije ER β u karcinomskim ćelijama prostate.

U karcinomskim ćelijskim linijama sa oba ER subtipa, i estrogeni i antagonisti estrogena su efikasni inhibitori rasta. ER β snažnije reguliše rast ćelija u karcinomu prostate, nego ER α (31). Glavna uloga ER β je u regulisanju antiestrogene inhibicije rasta (15,21,23).

Cheng je našla da ćelije koje pokazuju ekspresiju ER β podležu apoptozi (31), što može doprineti smanjenoj proliferaciji (34). Ona je u ćelijskim linijama karcinoma prostate povratila ekspresiju ER β , pomoću adenovirusa, i našla je značajno smanjenje invazije tumorskih ćelija od 60%. Smanjenje ekspresije ER β je udruženo sa većim Gleason gradusom tumora i sa većim metastatskim potencijalom tumora. U β ERKO miševa većina epitelnih ćelija prostate pokazuje proliferaciju. U više od 80% ovih životinja se razvije hiperplazija prostate, ukazujući da gubitak ER β vodi u nekontrolisanu ćelijsku proliferaciju. ER β može indukovati ekspresiju p21 i p27. Štaviše inhibicija rasta rezultuje zastojem u G2 fazi ćelijskog ciklusa.

ER α smanjuje invaziju i proliferaciju posredovanu ligandom, dok ER β sprečava invaziju i proliferaciju nezavisno od prisustva liganda. ER β inhibira ekspresiju interleukina IL-8, koji pojačava invaziju, tako da deo dejstva ER β na supresiju invazije se može pripisati IL-8. Mogućnost postojanja endogenog liganda ER β je predložio Weihua,

jer metabolit testosterona 3β Adiol može biti potencijalni ligand ER β . Moguće je da ćelije PCa samostalno sintetišu steroide, koji deluju kao prirodni aktivatori ER β . ER β bez prisutnog liganda može preneti signale faktora rasta, te može angažovati koaktivatore. Ekspresija ER β u karcinomskim ćelijama prostate dovodi do inhibicije proliferacije i invazije, te povećanja apoptoze. Sve govori o gubitku ekspresije ER β u tkivu koje podleže displastičnoj transformaciji i o njegovoj ulozi 'čuvara'.

ER β promotor je metilisan u oko 80% karcinomskih ćelija, što objašnjava gubitak ER β u tih ćelija (uspavljaju se geni) (31).

1.2. Anatomija prostate

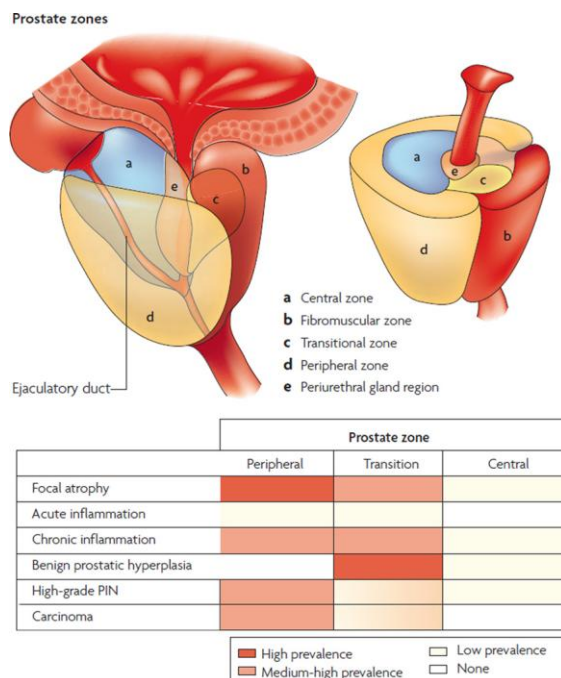
Prostata je žlezda pridodata muškom polnom sistemu. Prostata je mišićno-žlezdani organ, koji svoj alkalni sekret izliva u prostatični deo uretre pomoću dva veća i mnogo manjih izvodnih kanala (50).

Piramidalnog je oblika, slična kestenu i smeštena je na mišićnoj fasciji karlice, retroperitonealno. Sastoji se od: baze i apeksa, prednje i zadnje površine, kao i dve inferolateralne površine. Baza se nalazi gore i u kontinuitetu je sa vratom mokraćne bešike. Na bazi se nalaze tri otvora za: uretru i duktuse ejakulatoriuse (50). Apeks je donji, suženi deo obuhvaćen spoljašnjim sfinkterom, formirajući dijafragmu urogenitalis. Vezivo na periferiji prostate gradi 'pravu' kapsulu, dok sa spoljašnje strane karlična fascija formira 'lažnu' kapsulu (50,51,52). Od prostatične kapsule polaze nepotpune pregrade koje dele organ na slabo definisane lobuluse.

Tradicionalni koncept jasno odvojenih režnjeva je zamenjen sa 5 histološki različitih zona (slika 6):

- **Anteriorna** zona odgovara prednjem režnju i sačinjena je od vezivno-mišićne strome i nešto malo žlezda
- **Periferna** zona odgovara bočnim i zadnjem režnju i čini oko 70% žlezdane komponente prostate. Sastoji se od rastresite strome i glavnih žlezda, čiji se izvodni kanali otvaraju u distalnom delu prostatične uretre. Mezodermalnog je

- porekla i ishodište je najvećeg broja PCa i HGPINa (40,51,52,53,54,55,56). Ova zona je takođe podložna upali (51,57,58).
- **Centralna** zona odgovara srednjem režnju, čini oko 25% žlezdanog parenhima. Okružuje duktuse ejakulatoriuse, a fibroznim pregradama je odvojena od periferne zone. Izvodni kanali centralne zone su znatno veći i otvaraju se u srednjem delu prostatične uretre. U poređenju sa ostalim zonama, ćelije centralne zone imaju drugačiji morfološki izgled (izraženiju bazofilnu citoplazmu i veća jedra smeštena na različitim visinama). Verovatno nastaje iz Wolffovih kanalića i otporna je na upalu i razvoj karcinoma. Samo 1-5% PCa nastaje u ovoj zoni (52,57,58).
 - **Periuretralne** žlezde se nalaze u uskom pojasu oko uretre. Stromalna komponenta ove zone može proliferisati u kasnijem stadijumu BHP. Zajedno sa žlezdanim nodusima tranzicionalne zone, ovakav rast uzrokuje kompresiju uretre i retenciju urina (56,57,58).
 - **Tranzicionalna** zona sa oko 5-10% parenhima, leži ispred centralne zone, okružujući prostatičnu uretru proksimalno od veromontauma. Sastoji se od dva mala lobusa sa žlezdama koje se pružaju bočno oko distalnog kraja unutrašnjeg uretralnog sfinktera, čiji se kanali otvaraju u proksimalnoj uretri. Endodermalnog je porekla i predstavlja ishodište većine BHP, atipične adenomatozne hiperplazije (AAH) i samo oko 20% PCa (35,52,53,54,55,57,58).



Slika 6: Zonalna predispozicija bolesti prostate (54)

Kod novorođenčeta prostata je izgrađena iz prostih kanalića, zrakasto raspoređenih oko uretre, sa obilnom vezivno-mišićnom stromom. Kasnije su tubuloalveolarne žlezde grupisane unutar strome, koja je u kontinuitetu sa vezivnom kapsulom na površini. Ceo žlezdano-kanalikularni sistem je obložen pseudostratifikovanim cilindričnim epitelom, izgrađenim od bazalnih i cilindričnih ćelija. Sličan epitel oblaže izvodne kanaliće, celom dužinom do uretre, gde se nalazi urotel (51,52,57).

Vezivnomišićna stroma sadrži glatke mišićne ćelije, fibroците, kolagena i elastična vlakna kružno raspoređena oko acinusa i duktusa, kao i ekstracelularni matriks (35,51,57). Stroma obezbeđuje strukturu i biohemijsku potporu, održavajući mikrookolinu optimalnom za funkcionisanje epitelnih ćelija (25,35).

1.3. Razvoj prostate

Prostata se razvija oko 10. nedelje intrauterinog života i ima dvojako poreklo: žlezdana komponenta nastaje od niza solidnih traka iz endoderma pelvične uretre tj. iz

srednje trećine urogenitalnog sinusa, a glatkomišićna stroma nastaje od okolnog mezoderma (52,59). Epitelni pupoljci se granaju posteriorno i lateralno od distalne uretre u okolni kondenzovani mezenhim (52). Od epitelnih evaginacija, tokom trećeg meseca gestacije, nastaje pet nezavisnih grupa tubula, koje konačno formiraju žlezdanu prostatu.

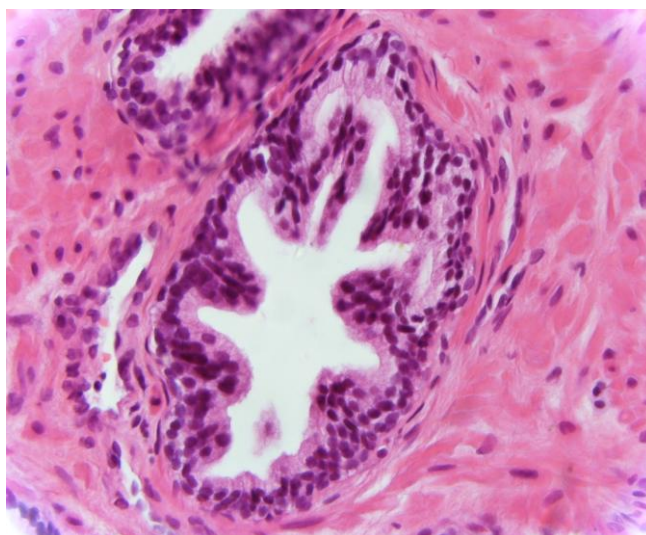
Na rođenju, prostata je manja od 1cm. U ovom periodu kanalići i acinusi su obloženi višerednim epitelom sa nagomilanim jedrima. Umnožavanje stromalnih ćelija ima induktivni uticaj na grananje kanalikularnog sistema. Do puberteta prostata nije izložena značajnijem dejstvu hormona i raste sporo. U pubertetu, pod uticajem testosterona, prostata naglo raste i dostiže težinu od oko 20 gr (50,51,52,56). Tek u pubertetu prostata počinje da stvara sekret (59). Rast prostate se beleži do treće dekade, da bi u 45. godini bila 4,5 x 4 x 3 cm. Nakon 50. godine dolazi do njene atrofije ili češće do uvećanja u vidu benigne nodularne hiperplazije (BHP) (52,57). Do 80. godine polovina prostatičnih kanalića je obliterisala (55,57).

1.4. Histologija prostate

Prostatu gradi 30-50 tubuloalveolarnih žlezda raspoređenih u tri koncentrična sloja: unutrašnji-mukozni sloj, središnji-submukozni sloj i periferni sloj, koji čine glavne prostatične žlezde. Žlezde mukoznog sloja ubacuju sekret direktno u uretru, druga dva sloja imaju kanaliće koji se otvaraju u prostatične sinuse, na zadnjem zidu uretre (58).

Žlezdani i duktalni epitel prostate je dvoredan, sa nizom bazalnih i luminalnih ćelija. Bazalne ćelije su često spljoštene i izdužene, ili zaokrugljene i trouglaste. Naležu na bazalnu membranu u paralelnom rasporedu, i često su perpendikularno postavljene u odnosu na luminalne ćelije. Bazalne ćelije imaju oskudnu citoplazmu, jedra su im mala, tamna, homogena i bez vidljivih jedaraca. Luminalne ili sekretorne ćelije su kubične do cilindrične sa jedrima smeštenim u bazalnom ili središnjem delu ćelije. Citoplazma ovih ćelija je svetla, a jedra su okrugla ili ovalna, prosvetljenog izgleda (35,43,51,52,56,58,60,61) (slika 7). Na bazalnu membranu naležu i retke, pojedinačne neuroendokrine ćelije, koje imaju bočne dendritske produžetke i suženi apikalni produžetak, kojim dostižu do lumena (35,51,52,61). Bazalne ćelije pokazuju ekspresiju p63, CK5 i CK14; relativno nisku ekspresiju AR i Bcl-2, a nemaju ekspresiju PSA ni

prostatične kisele fosfataze (PAP) (51,52,61). U normalnim uslovima bazalne ćelije nemaju fenotip mioepitelnih ćelija i nisu pozitivne na S100, ni na 'smooth muscle antigen' (SMA). Izgleda da one predstavljaju multipotentu populaciju iz koje nastaju sve epitelne linije prisutne u normalnoj, hiperplastičnoj i neoplastičnoj prostati (35,51,52). Luminalne sekretorne ćelije pokazuju ekspresiju PSA, PAP, AR, CK8 i CK18, E-cadherina, a ne pokazuju ekspresiju CK5 i CK14, kao ni Bcl-2 (43,51,52,62). Neuroendokrine ćelije imaju parakrinu ulogu i odgovaraju na nervnu stimulaciju. Pokazuju ekspresiju sinaptofizina, hromogranina i neuron-specifične enolaze (NSE) (51,52,62).

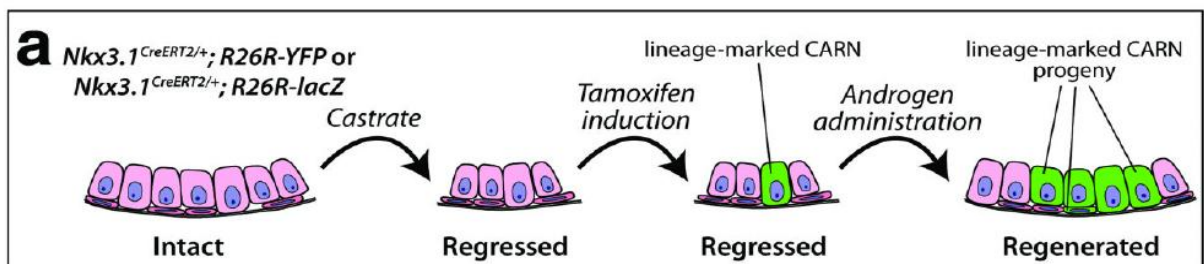


Slika 7: Acinus prostate (HE, x400)

Progresivna obliteracija acinusa se dešava sa godinama, usled atrofije žlezdanih struktura. Preostali acinusi su smanjeni i obloženi kubičnim ili spljoštenim epitelom, koji je izgubio sekretornu aktivnost. U žlezdama obloženim atrofičnim epitelom se fokalno uočavaju područja hiperplastičnog epitela (57). Prostatične žlezde, naročito u starijih, često sadrže corpora amylacea, koja su različitog oblika, a veličine do 2 mm. Na preseku imaju izgled koncentričnih lamelarnih telašaca i veruje se da nastaju precipitacijom sekreta oko ćelijskih fragmenata. Delom mogu biti kalcifikovani (51,54,58). Periferni nervi su važni u propagaciji adenokarcinoma. Limfni vodovi prostate se dreniraju u pelvične limfne čvorove i zatim u retroperitonealni duktus (51).

Normalan izgled i funkcija epitela su uslovljeni prisustvom testosterona. Nakon kastracije dolazi do programirane ćelijske smrti u 90% epitelnih ćelija prostate (25,35,43,62). Preostale epitelne ćelije ne zahtevaju androgene za opstanak, te se smatraju androgen nezavisnim ćelijama. Međutim, nakon aplikacije egzogenog androgena u ovih kastriranih životinja, neke od preživelih ćelija su ipak androgen osetljive, i njihovom proliferacijom se nakon samo 2 nedelje prostata regeneriše do normalne veličine i morfologije (25,35,62) Istraživači su nakon serijske regresije od 15 puta, razvili regeneraciju epitela, što govori u prilog dugoročne populacije androgen rezistentnih matičnih ćelija.

Sporo proliferišuće, androgen-nezavisne, rezervne matične ćelije su ishodište druge populacije brže proliferišućih ćelija nezavisnih od androgena, ali koje proliferišu u prisustvu androgena. Iako se ove prolazno-proliferišuće ćelije mogu aktivno deliti, njihova sposobnost samoobnavljanja u poređenju sa rezervnim matičnim ćelijama je izrazito mala. Pretpostavka je da se i iz ovih prolazno-proliferišućih ćelija povećava broj sekretornih ćelija, a ne samo iz matičnih (35,62). Delovanjem androgena na prolazno-proliferišuće ćelije, nastaju intermedijerne ćelije, sa jako ograničenim proliferativnim potencijalom, koje se diferenciraju u androgen-zavisne sekretorne ćelije. U epitelu prostate postoji topografska hijerarhija matičnih ćelija, prolazno-proliferišućih i potpuno diferentovanih, postmitotskih sekretornih ćelija (35,43,62). (slika 8)



Slika 8: Bipotentnost i samoobnavljanje CARNs in vivo (62)

PCa ima izrazito luminalni fenotip, a odsustvo bazalnih ćelija je od dijagnostičkog značaja, sugerišući da adenokarcinom nastaje iz luminalnih ćelija, ili da onkogeno transformacija bazalnih ćelija rezultuje ubrzanom diferencijacijom u luminalne ćelije.

Kastracijom se gubi se ekspresija Nkx3.1 gena, da bi se readministracijom androgena, koji indukuje regeneraciju ponovo uspostavila. Međutim, nije u potpunosti izgubljena ekspresija Nkx3.1 u regresivnoj prostati, već je prisutna u retkim epitelnim ćelijama nazvanim **CAstration-Resistant Nkx3.1-expressing cells**. **CARNs** čine 0,7% sveukupnog epitela u kastriranih jedinki i ove ćelije su često u grupama. CARNs su isključivo luminalne ćelije, nikada ne pokazuju p63 (marker bazalnih ćelija), ili sinaptofizin (marker neuroendokrinih ćelija). One pokazuju ekspresiju CK18 i AR, bez ekspresije Ki-67. Predstavljaju 'potencijalne' matične ćelije, koje odgovaraju prolazno-proliferišućim ćelijama, a koje stiču osobine matičnih ćelija tokom regeneracije.

U procesu regeneracije, njihov broj se uveća 9 puta, što govori o njihovom proliferativnom potencijalu. Kako su sve CARNs ćelije u regresivnoj prostati bile isključivo luminalne, ali su tokom regeneracije mogle dati i bazalne i luminalne ćelije, zaključak je da CARNs populacija sadrži dvostruki progenitorni potencijal. Pod određenim okolnostima, 24% CARNs ćelija se deli, u procesu samoobnavljanja. Epitelne matične ćelije imaju neograničenu sposobnost regeneracije. Nkx3.1 gen je neophodan za održavanje matičnih ćelija prostate tokom serijskih regresija i regeneracija (62).

CARNs ćelije mogu predstavljati target ćelije onkogene transformacije u karcinomu prostate. Nakon regeneracije pod uticajem androgena, uočen je ubrzani razvoj HGPINa i PCa, sa povećanom proliferacijom, ali i gubitkom bazalnih ćelija. CARNs ćelije mogu biti ishodište PCa, a takav karcinom ima luminalni fenotip. U kontekstu ranije opisanih bazalnih ćelija, identifikacija CARNs kao luminalnih matičnih ćelija, govori u prilog postojanja posebnih, nepodudarajućih matičnih ćelija u epitelu prostate.

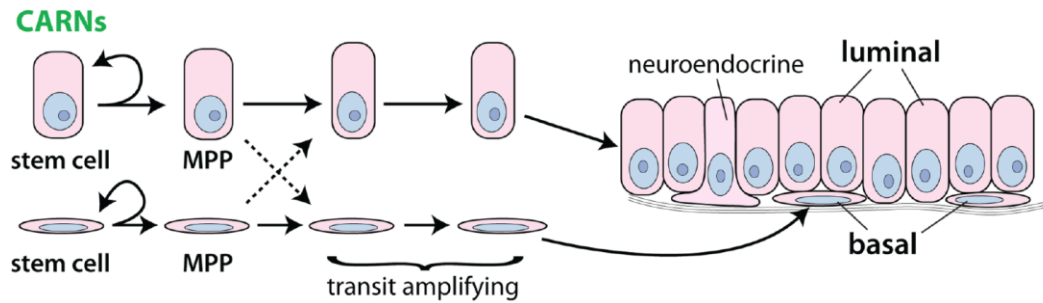
Inaktivacija Nkx3.1 gena može dovesti do povećane diferencijacije CARNs ćelija i uvećanja populacije prolazno-proliferišućih ćelija (62).

Predložena su dva modela rodoslova:

- **A** Bazalne i luminalne ćelije poseduju nezavisne progenitorne ćelije koje imaju osobine matičnih ćelija. (slika 9) Nezavisne matične ćelije mogu diferencirati u bazalne i luminalne epitelne ćelije preko multipotentne progenitorne ćelije (MPP) i prolazno-proliferišućih progenitornih ćelija, s nekim bipotentnim ćelijskim

vrstama (isprekidane strelice). U ovom modelu, CARNs bi odgovarale luminalnim matičnim ćelijama.

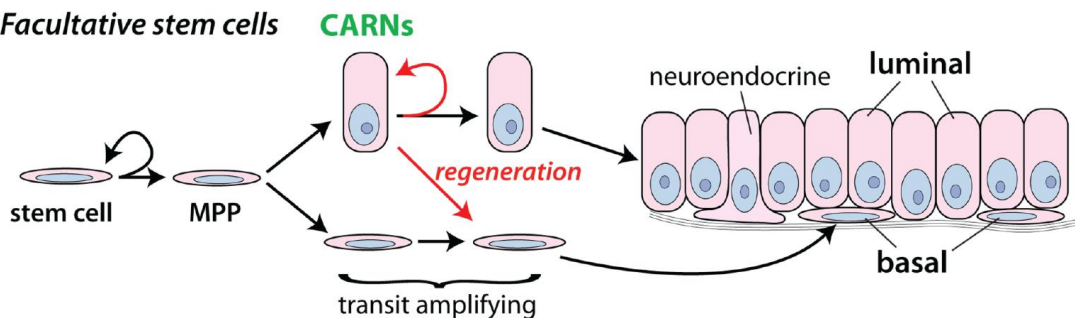
a *Independent lineages*



Slika 9: Moguće relacije između loza u epitelu prostate – nezavisne ćelijske loze (62)

- **B** CARNs predstavljaju fakultativne ili 'potencijalne' matične ćelije, koje odgovaraju prolazno-proliferišućim ćelijama, a koje stiču osobine matičnih ćelija tokom procesa regeneracije. U ovom modelu, fakultativne matične ćelije koje učestvuju u regeneraciji prostate, su nezavisne od matičnih ćelija za organogenezu i mogu biti prisutne u prostatama odraslih. (slika 10) Multipotentne progenitorne ćelije se diferenciraju u prolazno-proliferišuće ćelije, uključujući i CARNs, koje se tokom regeneracije (crvene strelice), ponašaju kao fakultativne ili 'potencijalne' matične ćelije (62).

b *Facultative stem cells*



Slika 10: Moguće relacije između loza u epitelu prostate– fakultativne matične ćelije (62)

1.5. Uticaj hormona na rast prostate

Normalan rast i razvoj prostate su pod uticajem testikularnih androgena. Testosteron koji luče Leydigove ćelije se pretvara u 5α -dihydrotestosteron (DHT) pomoću 5α -reduktaze, enzima koji se primarno nalazi u jedrima stromalnih i bazalnih ćelija prostate (3,4,13,23,25,35,41,47,57). DHT je najsnažniji androgen koji kontroliše normalan rast prostate, ali i proliferativne poremećaje, pre svega BHP i PCa (3,4,13,23,25,35,41,57).

U 13. nedelji gestacije talas androgena iz fetalnog testisa utiče na razvoj prostate. U tom momentu nivo DHT u fetalnoj prostati je viši nego tokom ostalog perioda gestacije. Zatim, u 18. nedelji naglo pada nivo androgena i ostaje nizak do puberteta (vrednosti kao u odrasle žene) (12,13).

Porast nivoa estrogena u maternalnoj cirkulaciji se registruje u 8. nedelji gestacije, a u fetalnoj prostati je zabeležen u 16. nedelji. Nasuprot androgenima, nivo estrogena raste do porođaja, i pada na rođenju zbog gubitka placentalne i maternalne sinteze (12,13).

Razvoj prostate je prvo pod glavnim uticajem androgena, dok je u drugoj polovini gestacije estrogen taj koji predominira u žlezdi (13,42,56). Sredinom gestacije pojavljuju se lumeni unutar epitelnih gnezda. U sekretornim ćelijama se javljaju AR, i ne boje se više na HMWCK. Čak i AR pozitivne sekretorne ćelije nisu potpuno diferentovane ćelije, kao u odraslih (13).

1.6. Fiziologija i funkcija

Biološka uloga prostate je akumulacija i oslobađanje sekreta (52). Epitel prostate produkuje enzime: PSA, PAP, fibrinolizin, limunsku kiselinu, pepsinogen i formira semenu tečnost (51,52,58). Očuvano, ali i maligno tkivo prostate sadrži markere: PSA i PAP (39,51,55,61,63).

- PSA je lokalizovan u epitelu normalnih acinusa i duktusa prostate. Ultrastrukturno PSA je lokalizovan u endoplazmatskom retikulumu i žlezdanom lumenu (51,58).

- Žlezdane komponente BHP su jako pozitivne na PSA, ali je stroma negativna. Svi maligniteti prostate su pozitivni na PSA, bez obzira na stepen diferencijacije (58,63).

PSA se koristi u dokazivanju prostatičnog porekla metastatskih tumora koji zahvataju kosnu srž ili limfne čvorove (51,55,58,61,63). PSA i PAP su generalno, najbolji markeri za prostatu, ali nisu apsolutno specifični i mogu bojiti benigna (pljuvačne žlezde) ali i maligna ne-prostatična tkiva (karcinom dojke) (51,60).

Normalne vrednosti PSA se kreću od 0,10-2,6 ng/ml (63). PSA se ne nalazi u serumu kako zdravih, tako ni bolesnih žena. Cirkulišući PSA se proizvodi u jetri, a ne u prostati. U zdravih muškaraca se PSA samo oslobađa u sekretu prostate (58). Značajno veće vrednosti se viđaju u hipeplastičnim i neoplastičnim lezijama prostate (56,58,61). U PCa dodatni PSA je proizvod malignog epitela prostate i oslobađa se u cirkulaciju. Povišeni nivoi PSA i PAP u cirkulaciji se koriste kao markeri prisustva i progresije bolesti (51,56,58).

PIN praktično ne utiče na serumsku koncentraciju PSA (46,51,55). Dobro diferentovani tumori proizvode manju količinu PSA nego srednje i loše diferentovani tumori. Međutim, u nekih najlošije diferentovanih tumora serumski PSA je neproporcionalno nizak (46,51).

1.7. Patološke promene prostate i njihova distribucija

1.7.1. Benigna hiperplazija prostate

BHP je čest poremećaj koji se klinički karakteriše: uvećanjem prostate, opstrukcijom protoka urina i proliferacijom žlezdanih struktura i strome (39,51,52,54,57,61). U epidemiološkom smislu, BHP se najčešće viđa u zapadnoj Evropi i Sjedinjenim američkim državama, a najređe na Orijentu. Prevalenca je veća kod crnaca nego kod belaca. Oko 75% muškaraca starosti 60-80 godina ima određeni stepen BHP, dok se retko javlja u mlađih od 40 godina (3,34,39,57,61). Sa starenjem je povećana klinička incidenca BHP (35,39,51,55,57).

Pretpostavlja se da je interakcija strome i epitela odgovorna za nastanak hiperplastičnih nodulosa, iako nije jasno da li stroma indukuje proliferaciju epitela ili obrnuto. Nalazimo hiperplaziju strome sa jedne i epitelijalne nodule sa druge strane, a veza između ova dva oblika ostaje nejasna (52,57).

Moguće je da BHP je u vezi sa pomeranjem ravnoteže između androgena i estrogena u krvi (25,34,35,39,51,61,64). Opšte prihvaćena teorija patogeneze BHP je u delovanju DHT, androgena koji kontroliše normalan rast prostate, ali i proliferativne poremećaje: hiperplaziju i PCa (3,25,34,35,39,42,51,57,61). DHT se sintetisuje u stromalnim ćelijama konverzijom iz cirkulišućeg testosterona u prisustvu 5 α -reduktaze. Jednom sintetisan, DHT deluje kao autokrini agens na stromalne ćelije i kao parakrini hormon na žlezdani epitel, dovodeći do njegove proliferacije (25,34,35,39,58,61). Samo mali procenat DHTa se proizvede u bazalnim ćelijama. Iako je DHT u maloj koncentraciji prisutan u serumu, njegova koncentracija u tkivu prostate je 5 puta veća od koncentracije testosterona. Prostata je glavni izvor cirkulišućeg DHTa. Prolaktin iz hipofize deluje na receptore u epitelu prostate i povećava proizvodnju androgena (25,34). Androgeni podstiču sintezu DNK, deobu ćelija, i imaju ulogu u održavanju normalne građe i funkcije prostate (35,41,42).

Zajedno sa androgenima, u prostati deluju i estrogeni. Konverzija testosterona procesom enzimatske aromatizacije u estrogen se odvija u: masnom tkivu, jetri i u prostati. Za razliku od testosterona, čiji nivo opada sa godinama, cirkulišući estrogeni ne dele istu sudbinu. U starijih, odnos slobodnog estradiola/slobodnog testosterona dostiže 40%, te predstavlja mogući uzrok nastanka BHP. Estrogeni stimulišu rast strome prostate, dok epitelna komponenta regredira. Ovim se objašnjavaju različiti rezultati estrogene substitucije u BHP (bolesti strome) i PCa (bolesti epitela). ER su retki u prostati, ali imaju ulogu u rastu matičnih ćelija i sekreciji ekstracelularnog matriksa (25,34).

Većina serumskog testosterona je vezana za proteine plazme, dok je 2% ukupnog testosterona slobodno. Samo slobodna forma testosterona se može metabolisati u prostati u DHT ili estrogen. Davanjem testosterona se smanjuje nivo globulina, dok estrogen stimuliše njegovu produkciju, pa se povećanim vezivanjem steroida za globuline zapravo smanjuje količina slobodnog testosterona koji može delovati na periferiji (25).

U pacijenata sa BHP, odnos cirkulišućeg testosterona i DHT može biti abnormalno nizak. Blokiranjem 5α -reduktaze i kontrolisanjem sinteze DHTa iz testosterona se utiče na smanjenje veličine prostate u obolelih od BHP (25,34,35,57,61). Pored smanjenog katabolizma DHTa i poremećaja ravnoteže između odumiranja i umnožavanja epitelnih i stromalnih ćelija (34,35), Rosai još navodi značaj intermedijernih bazalnih ćelija u patogenezi nastanka BHP (34,35).

Brojni faktori rasta su pokazivali mitogenu aktivnost na epitelne i stromalne ćelije prostate. 'Insulin-like growth faktor' (IGF) indukuje proliferaciju i diferencijaciju stromalnih i epitelnih ćelija i dovodi do BHP, takođe reguliše i apoptozu karcinomskih ćelija (34,35,41). Mirone još navodi da su epidermalni faktor rasta (EGF) i transformišući faktor rasta (TGF- α) poreklom iz prostate i da predstavljaju snažne mitogene bazalnih ćelija. Verovatnije je da održavaju integritet ćelija u prostati odraslih, nego da stimulišu proliferaciju samih ćelija. TGF- β inhibiše proliferaciju, omogućava apoptozu i reguliše homeostazu epitela pomažući diferencijaciju bazalnih ćelija u luminalne. Osim toga, TGF- β potstiče i diferencijaciju stromalnih ćelija u glatke mišićne ćelije i njihovu agregaciju u mišićne nodule. I androgeni i estrogenei potpomažu ekspresiju TGF- β koji utiče na stvaranje mišićnih nodula u BHP (35). Fibroblastni faktor rasta (FGF), i brojni drugi faktori rasta su pokazivali mitogenu aktivnost na epitelne i stromalne ćelije (35).

Mikrovaskulatura je zavisna od androgena. Oslobođanje FGF i 'vascular endothelial growth faktor' (VEGF) iz endotelnih ćelija prostate su pod uticajem androgena. Dalja stimulacija angiogeneze se odvija inflamatornim mehanizmima. Nezavisno od prisustva mikroorganizama, tkivo prostate je infiltrirano limfocitima i makrofagima koji su odgovorni za ćelijski posredovanu imunu reakciju sa oslobođanjem specifičnih citokina: IL-1, 'tumor necrosis factor' (TNF- α), faktora rasta i hemotaktičnih faktora. Inflamatorna kaskada indukuje produkciju kolagena, ubrzavajući stromalnu i epitelnu proliferaciju i angiogenezu preko otpuštenog VEGF iz mast ćelija i makrofaga.

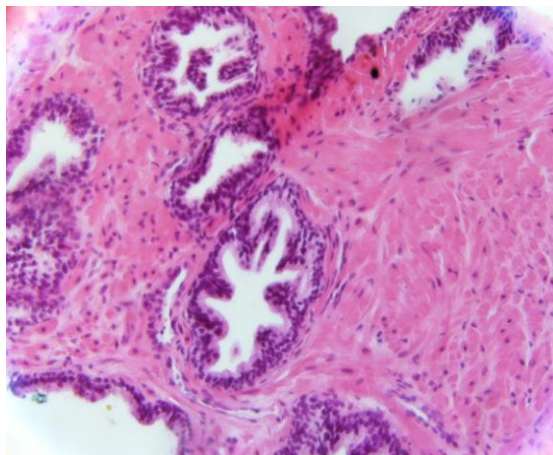
Pored povećane proliferacije, razvoju BHP doprinosi i smanjenje programirane smrti ćelije. Apoptoza je određena fragmentacijom DNK, pod uticajem TGF- β . Normalno tkivo prostate ima epitelno-stromalni odnos ćelija 1:2, koji se konstantno

održava homeostazom između proliferacije i apoptoze unutar oba kompartmenta. Kod hiperplastičnih lezija dolazi do smanjenja apoptoze uglavnom u stromi, te je epitelno-stromalni odnos 0:7. Redukcija apoptoze je verovatno izazvana prekomernom ekspresijom bcl-2, koji je važan antiapoptotični faktor. U slučaju oduzimanja androgena, involucija prostate se pre objašnjava povećanom apoptozom, nego smanjenom proliferacijom (35).

Najčešći tipovi uvećanja prostate su bilobarna i trilobarna hiperplazija (55,61). Kao što je rečeno, prostata je funkcionalno podeljena na dve nezavisne strukture: periuretralno žlezdano tkivo koje učestvuje u nastanku BHP (51,58,61) i pravo prostatično tkivo koje je ishodište PCa. Bujanjem hiperplastičnih nodulusa pritisnut je centralno smešten lumen uretre, a tkivo prostate je periferno potisnuto u vidu tanke fibroglandularne strukture. Između nodulusa i ostatka prostatičnog tkiva se vidi jasno definisana pseudokapsula izgrađena od fibroziranog veziva. Još uvek nije jasno da li inicijalne hiperplastične promene počinju kao fibrozni nodulusi u stromi periuretralnog tkiva ili kao epitelna hiperplazija, ali se zna da sve vrste BHP započinju proksimalno od veromontauma (39,52,55,57,58).

Prostate sa znacima benigne hiperplazije mogu težiti 50-100g, pa i više. Na poprečnom preseku se vide sivkasto-žućkasti čvorovi, zrnastog izgleda, koji se ispupčuju sa rezne površine (39,51,61). U većim nodulusima se mogu videti područja krvarenja i infarkcije. U dilatiranim i hiperplastičnim acinusima se mogu naći sitni kamenčići (57,61).

Histološki, BHP pokazuje proliferaciju epitelnih ćelija acinusa i duktusa, proliferaciju glatkih mišićnih ćelija i stromalnih fibroblasta u različitoj proporciji (34,35,39,51,57,61). Hiperplastični acinusi su dilatirani i razbacani unutar stromalnih nodulusa prostate. Karakteristična je papilarna hiperplazija dvoredoprizmatičnog epitela sa svetlom citoplazmom i pravilnim jedrima, centralno smeštenim u ćeliji, bez vidljivih jedaraca (39,51,61). (slika 11)



Slika 11. Benigna hiperplazija prostate (HE, x200)

Hiperplastični nodulusi često sadrže intraglandularno i periglandularno smešten infiltrat limfocita, plazma ćelija i makrofaga, a u acinusima su prisutna corpora amylacea (35,57). U 20% slučajeva su nalaze infarkti sa skvamoznom metaplazijom epitela kanalića u okolini. Periferno smeštene nezahvaćene žlezde su često atrofične i komprimovane usled rasta nodula. U 10% hirurških uzoraka sa preoperativnom dijagnozom BHP se nađe okultni adenokarcinom (39,57,61).

Patolozi često na benignim iglenim biopsijama prostate odgovaraju BHP, iako nema histološkog nalaza specifičnog za hiperplaziju. Ponekad se stromalni nodul tranzicionalne zone može naći u iglenoj biopsiji, dok je glandularna hiperplazija veoma komplikovana za dijagnostiku u iglenoj biopsiji. Tako da BHP ne treba dijagnostikovati ukoliko nije prisutan stromalni nodul (65).

Ostale patološke promene prostate benignog karaktera su još i: atrofija, hiperplazija bazalnih ćelija (BCH), svetloćelijska kribriformna hiperplazija (CCCH) i sklerozirajuća adenoza (SA).

Od premalighnih lezija prostate se nalaze: atipija, atipična adenomatozna hiperplazija- AAH (adenoza), atipična proliferacija žlezda suspektnih na maligno-ASAP i prostatična intraepitelna neopalzija.

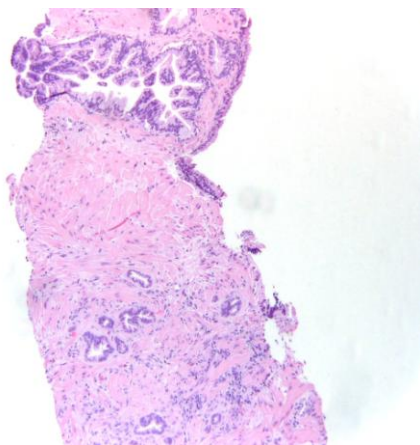
1.7.2. Prostatična intraepitelna neoplazija

PIN predstavlja premaligni deo spektra morfoloških promena koji uključuje proliferaciju atipičnih ćelija unutar morfološki očuvanih kanala, kanalića i acinusa prostate (40,46,48,51,55,61,65,66,67). Sastoji se od displastičnih ćelija sa luminalnim fenotipom, koje pokazuju ekspresiju androgenih receptora i PSA (45,53). PIN predstavlja progresivne abnormalnosti fenotipa koje se nalaze između normalnog epitela prostate i karcinoma, a koji ukazuje na poremećaj diferencijacije ćelija, gubitak kontrolne regulacije i uznapredovali stadijum karcinogeneze (40,46,48,53,67).

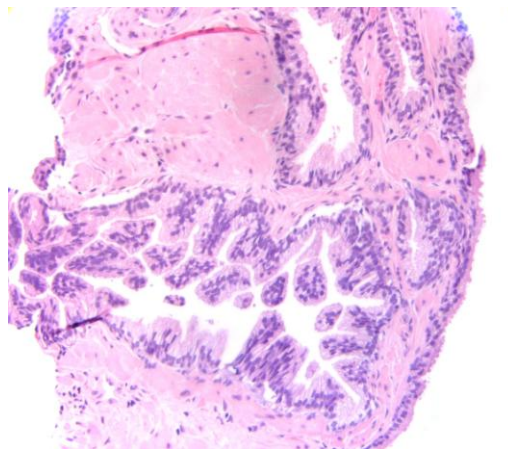
Acinusi su srednje veliki sa zaobljenim ivicama, prisutna je izražena stratifikacija jedara, kao i nejasne ćelijske granice, te zbog toga imaju hiperhromatični izgled (55,65). U identifikaciji PINa je posebno korisno prisustvo parcijalno zahvaćenih acinusa (55,56).

Bostwick i Brawer su 1987. uveli termin PIN. Konsenzus konferencijom iz 1989. godine u Merilendu je dogovoreno da se koriste dva gradusa PINa: 'low-grade' i 'high-grade' (40,45,51,53,55,61,65,66,67,68).

LGPIN se karakteriše nagomilanim i stratifikovanim luminalnim ćelijama, koje pokazuju varijacije u veličini jedara, i sa često prisutnim, ali ne prominentnim jedarcima. Jedra su lako uvećana (53,55) i hiperhromatična (45,65,66,67). Sloj bazalnih ćelija je očuvan (45,57,65,67). Postoje teškoće u razlikovanju ovih lezija od reaktivne atipije (55). (slika 12 i 13)

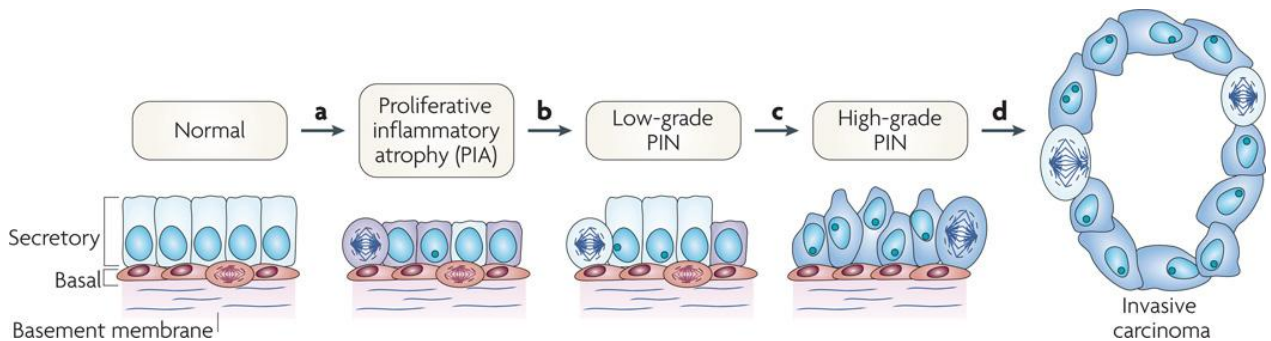


Slika 12. Atrofija prostate + LGPIN(HE, x100)



Slika 13. LGPIN (HE, x200)

LGPIN se javlja u trećoj dekadi života (40,55,67). Veruje se da LGPIN ima drugačiji klinički tok od HGPINa. U većini slučajeva ne progredira u karcinom i 'follow-up' je isti kao i u pacijenata bez LGPINa (45). Mnogi patolozi ga ni ne navode u nalazu (40,45,66,67), ili bar ne kao izolovanu dijagnozu (68), mada pojedini rade suprotno (Montironi) (53).

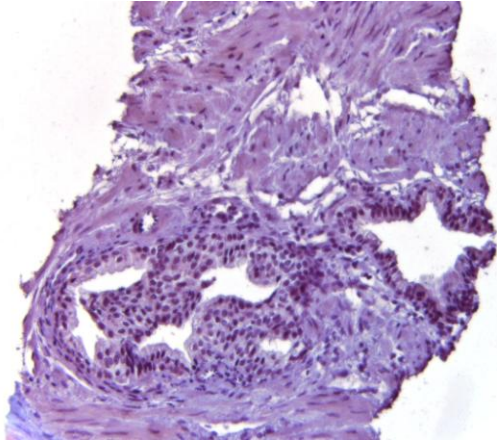


Slika 14: Celularni i molekularni model rane progresije neoplazije u prostati (54)

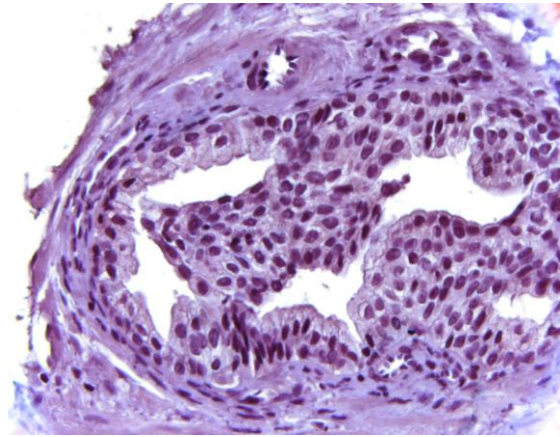
Druga grupa su **HGPIN** lezije koje se karakterišu neoplastičnom transformacijom sekretornog epitela koji oblaže duktuse i acinuse. Proces je ograničen na nivou epitela i zato se zove intraepitelna displazija. Arhitektonika kanala i acinusa prostate je očuvana, a obloženi su proliferisanim atipičnim ćelijama, sa uvećanim jedrima i izraženijim, ekscentrično postavljenim jedarcima (40,46,55,57,65,66) sa povećanom količinom i nepravilnim rasporedom hromatina (45,53,61,65,67). Varijacije jedara su manje izražene zbog znatnog uvećanja samih jedara, tako da izgledaju relativno uniformna. Izražena, često multipla jedarca su prisutna u HGPINu (55,65,66,67). Morfološke, histoheimijske, imunohistoheimijske, molekularne i genetske osobine ovih atipičnih ćelija su slične sa karcinomskim ćelijama prostate (45,46,53,55,65,66,67) (slika 14).

Nagomilavanje i stratifikacija ćelija su izraženije, dok je sloj bazalnih ćelija znatno redukovan (45,53,55,61,65,66,67,69). (slika 15 i 16) U zahvaćenim žlezdama, atipične ćelije se ređaju tako da lezija ima: resičasti (97%), papilarni, kribriformni ili pločasti izgled (40,45,51,55,57,61,65,66,67). Većina uzoraka sadrži lezije različitog izgleda (40,66,67). HGPIN je u najvećem broju slučajeva prekursor PCa i često je

multifokalan (29,40,46,51,55,61,68,69,70). Rani invazivni karcinom nastaje direktnim probojem zida žlezde i razaranjem bazalnog sloja (40,46,53,55,65).



Slika 15. HGPIN (ER β , x200)



Slika 16. HGPIN (ER β , x400)

Displastične ćelije u HGPIN lezijama pokazuju fenotip luminalnih ćelija (prebacivanje proliferativne aktivnosti sa bazalnih na sekretorne ćelije) (40,67), ekspresiju AR i ekspresiju PSA, i većina njih se boji na 'Anti- α -methylacyl coenzym A racemase' (AMACR) (67). PIN lezije podležu regresivnim promenama u uslovima sniženih nivoa androgena. Dva glavna efekta ablacije androgena su smanjena proliferacija i podstaknuta apoptoza (40,45,53,55). Za razliku od njih, bazalne ćelije nemaju AR i nisu zavisne od nivoa androgena u krvi (53,55).

Većina fokusa HGPINa je smeštena u perifernoj ili ne-tranzicionalnoj zoni, gde se najčešće nalazi i PCa (40,46,53,67), retko u tranzicionalnoj zoni i izuzetno retko u centralnoj zoni (45,61,65). U PIN lezijama može postojati neuroendokrina diferencijacija koja sadrži ćelije sa velikim eozinofilnim citoplazmatskim granulama, koje podstiču lokalni rast i moguće anti-apoptotsku aktivnost epitela (45).

HGPIN se širi kanalikularno, bez nepravilnosti van svojih granica, na nekoliko načina koji podsećaju na karcinom (55,65):

1. U prvom slučaju neoplastične ćelije zamenjuju normalni sekretorni epitel, ali su očuvani bazalni sloj i bazalna membrana. Fokusi HGPINa imaju kribriformni,

- skoro solidni izgled, tako da se na svetlosnom mikroskopu ne mogu razlikovati od intraduktalno proširenog karcinoma-IDCP (55).
2. U drugom slučaju dolazi do direktne invazije kroz zidove kanalića i acinusa sa razaranjem bazalne membrane i sloja bazalnih ćelija (55).
 3. U trećem, najređem slučaju, neoplastične ćelije invadiraju između sloja bazalnih i sekretornih ćelija i daju padžetoidni izgled (40,55,66).

1.7.2.1. PIN kao predznak maligniteta u iglenoj biopsiji prostate

HGPIN se nalazi u 2-16% iglenih biopsija prostate (45,46,53,55,65,67,71), u proseku 9% (40,61,69). Parsons navodi i do 24%. Ova incidenca zavisi od posmatrane i skriniране populacije (uzrasta, rase i geografskog regiona). U uzorcima transureteralne resekcije prostate-TURP je veća verovatnoća pronalaska HGPINa i iznosi 2,8-33% slučajeva (40,45,67).

HGPIN je značajan predznak u postojanju PCa i njegov nalaz upozorava na traženje invazivnog karcinoma (40,46,55,61,65,68,71). HGPIN, godine pacijenta, nivo serumskog PSA i nalaz 'digital rectal examination'- DRE visoko predviđaju postojanje PCa, a najveći rizik predstavlja HGPIN (15 puta veći rizik). Zbog često prisutnog nalaza PCa u rebiopsiji (32-50% pacijenata ima PCa unutar sledeće 1-3 godine) važno je sprovesti učestalo praćenje pacijenata sa HGPINom (40,45,46,55,67,69,71). Hemoprevencija HGPINa podrazumeva inhibiciju androgenom indukovanih dejstava na rast prostate. Lečenjem se smanjuje umnoženost sekretornog epitela, ali je određeni stepen stratifikacije i dalje prisutan.

Različiti autori navode različitu udruženost HGPINa i PCa u ponovljenoj biopsiji (23-79%) dok je taj procenat manji u poređenju sa ASAP lezijama (21-51%) (65,67,69,72). Na obdukciji pacijenata sa PCa, Mc Neal i Bostwick su našli PIN u 82% slučajeva, a u pacijenata istog uzrasta sa BHP su našli HGPIN u samo 43% slučajeva (48,53,67,73).

Iako većina patologa uviđa povezanost HGPINa i PCa, ne slažu se da je svaka HGPIN lezija uvod u maligno. Nedavne studije su pokazale da je rizik za PCa veći ukoliko je na inicijalnoj biopsiji HGPIN prisutan multifokalno i bilateralno (67,70).

Fletcher je u 71% dijagnostikovanih PCa našao 10-20 i više fokusa HGPINa. Takođe navodi da je jedini histološki predznak rizika oboljevanja od PCa broj isečaka sa HGPINom, tako da 1 ili 2 isečka sa HGPINom daju rizik od 30%, 3 isečka daju rizik od 40%, a preko 3 isečka rizik raste na 75% (45,51,65).

U ponovljenoj biopsiji, kod HGPINa, u 28% pacijenata se nađe invazivni karcinom (69), u 35% HGPIN, dok u 38% nema znakova bolesti. Ukoliko se karcinom ne nađe u dve 'follow-up' biopsije, verovatno se neće ni naći (51,65). HGPIN prethodi nastanku PCa za oko 10 godina i paralelno sa porastom incidence karcinoma raste i incidenca HGPINa (40,45,55,67).

Nađeno je da 9% muškaraca u drugoj dekadi života ima HGPIN, 22% u trećoj dekadi i do 40% u četvrtoj dekadi. Prevalenca HGPINa u muškaraca od 80 godina iznosi 70% (40,55,67). Proširenost HGPINa i ASAPa raste sa godinama života (40,55,67).

Prisustvo HGPINa i ASAPa može progredirati u invazivni karcinom, ili godinama miruje u većine pacijenata, dok u određenom broju pacijenata ove promene mogu regredirati. HGPIN i ASAP lezije ne utiču na nivo PSA u krvi (40,55,67). U pacijenata sa jednom dijagnostikovanim PCa, nalaz HGPINa i ASAPa je nebitan (66).

Mnogi autori navode povezanost HGPINa i PCa (40,45,46,51,53,55,67):

- Ćelijska proliferacija i programirana smrt (apoptoza) su izraženiji u HGPIN i PCa nego u normalnom epitelu prostate (NP).
- HGPIN i PCa su fenotipski i morfometrijski slični.
- HGPIN i PCa imaju zajednička genetska oštećenja (autozomno dominantno i X-vezano nasleđe): translokacija na 7q22-q31, dodatak na 7p, 7q, 8q, Xq i delecija na 8p, 10q, 13q, 16q i 18q. Inaktivacija tumor supresorskih gena i prekomerna ekspresija onkogeni u ovim regionima može inicirati i progredirati u procesu neoplazije. Bolest progredira kao rezultat akumulacije klonalnih genetskih promena.
- Oštećen sloj bazalnih ćelija u HGPINu, dok u PCa sloj bazalnih ćelija nedostaje.
- Neovaskularizacija je izraženija u PINu i PCa nego u NP.

1.7.2.2.

Karakteristike PIN ćelija

Sekretorne ćelije u PINu pokazuju rasvetljenje citoplazme (55), uvećane i spojene vakuole i rupturu ćelijske membrane (45,53). Jedra pokazuju kondenzaciju hromatina, tako da liče na jedra apoptotičnih ćelija. Jedno od glavnih obeležja HGPINa su uvećana jedra, veći broj jedaraca, koja su izražena i veća od 1 μ m, ovičena sa perinukleolarnim haloom (45,55,65,69).

U lečenih pacijenata jedarca su smanjena i neupadljiva. Kanalići i lumeni žlezda su ispunjeni makrofazima, odljuštenim sekretornim ćelijama sa degenerativnim promenama, kao i apoptotičnim ćelijama. Bazalne ćelije se lako raspoznaju u većini slučajeva. Usled nedostatka AR bazalne ćelije ne podležu regresivnim promenama kod oduzimanja androgena (13,40,45,53,55). Nakon kompletnog ukidanja androgena morfološke promene su izraženije nego nakon hormonalne monoterapije (analog LHRH). U pacijenata kojima je preoperativno smanjen nivo androgena, HGPIN je nađen u znatno manjem broju uzoraka dobijenih prostatektomijom. Sve ovo ukazuje da je displastični epitel prostate hormon zavistan (40,45,53,55). Oduzimanje androgena smanjuje proliferaciju, indukuje atrofiju epitela, rasvetljava jedra, povećava apoptozu epitelnih ćelija i dovodi do eksfolijacije ćelija u lumene acinusa, te modifikuje odn. smanjuje stepen vaskularizacije (40,53,55,67).

Za identifikaciju intaktnog i kontinuiranog niza bazalnih ćelija se koriste monoklonalna antitela na visoko molekularne keratine (HMWCK) (65,66). Karcinomske ćelije su izgubile receptore za ova antitela. Narušenost bazalnog sloja ćelija se vidi u 56% pacijenata sa HGPINom (66).

Prisustvo kolagenaze IV je udruženo sa degradacijom bazalne membrane i invazijom neoplastičnih ćelija u stromu žlezde.

Mitoze su retke kako u benignom, tako i u malignom epitelu prostate, ali su brojnije prelaskom benigne lezije u HGPIN, odnosno u malignu leziju (65,66). U HGPINu je najveći broj mitoz prisutan u bazalnom sloju, zatim u srednjem i najmanji u superficijalnom sloju.

Broj apoptotičnih telašaca raste od BHP prema PINu, odnosno PCa. Najveći broj apoptotičnih telašaca se nalazi u bazalnom sloju ili na periferiji malignih žlezda, prema stromi (66). Kako u NP bazalne ćelije čine glavni proliferativni odeljak, u PINu dolazi do promene kompartmenta za proliferaciju, tako da je značajno povećan odnos proliferišućih sekretornih ćelija prema proliferišućim bazalnim ćelijama (43,67).

Citoplazmatska ekspresija bcl-2, onkogen koji inhibira apoptozu je 100% prisutna u PINu i 62% u PCa, a manja je u benignom i hiperplastičnom epitelu. Povećana ekspresija bcl-2 omogućuje ćelijama sa genetskim abnormalnostima da izbegnu mehanizam apoptoze i transformišu se u neoplastične ćelije (40,46,51,55,66,67). Ekspresija bcl-2 je povećana u recidivu PCa (51).

Montironi i saradnici su postavili dve sledstvene faze u razvoju intraepitelne neoplazije: hiperplastični epitel i LGPIN se karakterišu duplikacijom DNK bez jedarne deobe, što rezultuje euploidijom; a druga faza se vidi u HGPINu i PCa, gde vanredno nastaju aneuploidne ćelije (40). Incidenca aneuploidije u HGPINu je 50-70% (51,67). Fletcher tvrdi da tumori sa Gleason scorom 2-5 predstavljaju diploidne tumore; sa scorom 6-8 imaju i diploidan i aneuploidan izgled; dok su score 9-10 generalno aneuploidni. Rosai tvrdi da su LGPIN diploidnog sadržaja DNK, a HGPIN aneuploidne lezije (51).

HGPIN i PCa imaju sledeća molekularna oštećenja: gubitak heterozigota na 8p, 10q i 16q (67). Inflammatory reaktivna atipija benignog epitela najčešće liči na HGPIN i zato je potreban veliki oprez u dijagnostici PINa, a u prisustvu izražene akutne ili hronične upale (40,45,55,66). Enzimski oštećena mesta su navodni preneoplastični markeri, međutim najveći broj lezija sa molekularnim oštećenjima pokazuju minimalne ili nikakve morfološke promene (45).

Citološke promene nakon zračne terapije, nalikuju na HGPIN i ne mogu se međusobno razlikovati (nagomilavanje i preklapanje jedara, stratifikacija, hiperhromazija, izražena jedarca, prisutan ali fragmentiran bazalni sloj ćelija, resičast ili mikropapilarni izgled) (40,45,55,66,67). Efikasnost zračne terapije se ogleda u eradikaciji karcinoma i prekanceroznih lezija (40,45). Postojanje rezidualnog ili rekurentnog karcinoma pogoršava prognozu. Ostaje pitanje da li je rekurentni karcinom rezultat nekompletno uklonjenog tumora ili nastaje progresijom iz nekompletno uklonjenog

HGPINa? Ako je zračenje nedovoljno u eradikaciji HGPINa, hemoprevencija može dodatno smanjiti rizik rekurencije karcinoma (40).

HGPIN je udružen sa progresivnim oštećenjima fenotipa i genotipa, ukazujući na oštećenje diferencijacije ćelija i kontrolne regulacije sa uznapredovalim stadijumom karcinogeneze. Progresivno se gube markeri sekretorne diferencijacije: PSA, PAP, ekspresija AR i p27 Kip1. Dok su drugi markeri povećani: bcl-2 onkoprotein, EGF, kolagenaza IV, telomeraza, TGF- α , apoptozna telašca, mitotske figure, ekspresija PCNA, Ki-67 i p53, aneuploidija, genetske abnormalnosti, gustina mikrovaskularizacije (40,51,67).

ER α je prisutan do 28% u PINu, dok je ER β odsutan (40). Imunohistohemijskim bojenjem na Ki-67 dobijena je pozitivnost od 0,6% u atrofičnim žlezdama prostate; 3,2-4% u BHP; 6-9,5% u LGPINu i 7,9-13% u HGPINu, dok je u PCa taj broj išao do 16,3% (66).

HGPIN je skoro uvek praćen proliferacijom kapilara unutar strome. Kapilarni krvni sudovi su kraći, široko zjape, izuvijanih obrisa i obloženi su umnoženim endotelnim ćelijama. Gustina mikrovaskularizacije je negde između benignog epitela i karcinoma. Hemoprevencijom se efektivno suzbija angiogeneza (40,55,66).

Ni HGPIN, ni ASAP ne utiču na produkciju PSA, niti se mogu otkriti imaging metodama (transrektalnim ultrazvukom) (40,45,66,67).

1.7.2.3. Neoplastična progresija

Progresija ćelijskog ciklusa je kontrolisana aktiviranim 'cyclin' kompleksom. Inhibitor ovog kompleksa je p27 Kip1, koji blokira ćelijski ciklus. Smatra se da predstavlja prepreku za ulazak ćelije u S (sintetsku) fazu i može označiti izlazak iz ćelijskog ciklusa. Eksperimenti su pokazali da je visok nivo p27 prisutan u mirujućim ćelijama, ali delovanjem mitogena njegov nivo opada i ostaje nizak u proliferišućim ćelijama (51,67). Nestankom mitogena ponovo se javlja visoka ekspresija p27. Smanjenje p27 se nalazi u većini PCa, i u pozitivnoj je korelaciji sa Gleason gradusom. Smanjenjem nivoa p27, uklanja se blokada ćelijskog ciklusa i omogućava se brzi ulazak ćelija u proliferativnu fazu ciklusa pod odgovarajućom stimulacijom. DeMarzo pretpostavlja da

se kritično oštećenje regulatornog mehanizma p27 dešava rano u procesu karcinogeneze (43).

1.7.2.4. Diferencijalna dijagnoza HGPINa

Diferencijalne dijagnoze prekanceroznih lezija prostate, odnosno HGPINa su (40,45,52,55,65,66,67):

- lobularna atrofija
- postatrofična hiperplazija (PAH)
- hiperplazija bazalnih ćelija sa ili bez atipije
- clear cell kribriformna hiperplazija
- postiradijaciona metaplazija
- infarkcija prostate
- prostatitis, naročito akutni
- inflamatorna atipija benignog epitela
- kribriformni adenokarcinom
- duktalni (endometrioidni) karcinom je adenokarcinom velikih duktusa
- urotelni karcinom (TCC) koji zahvata prostatične kanaliće i acinuse
- vezikule seminalis i duktusi ejakulatoriusi (sadrže lipofuscinski pigment)

Mnoge od ovih promena pokazuju arhitekturnu i citološku atipiju, uključujući uvećana jedarca i male, često kauterizovane i uvrnute uzorke (40).

HGPIN se razlikuje od metaplazije centralne zone po tome što se metaplazija nalazi oko većih kanalića, blizu uretre, sa većom količinom strome, stratifikovani epitel pokazuje uniformna okrugla ili ovalna jedra, bez atipije i intraglandularne proliferate sa centralnom fibrovaskularnom peteljkom (65).

HGPIN se razlikuje od urotelnog karcinoma (TCC) i kribriformnog adenokarcinoma, gde se ovi drugi ne boje sa PSA, niti sa AMACR. TCC pokazuje izraženi pleomorfizam jedara, hiperhromaziju i brojne mitoze (45,65,67). HGPIN sa srednjom do jakom ekspresijom AMACRa ukazuje na blizinu PCa (67).

Intraduktalni kribriformni izgled pokazuju: HGPIN, kribriformni adenokarcinom, duktalni (endometrioidni) karcinom i intraduktalni Ca in situ. Generalno duktalni endometrioidni karcinom ima kubične do cilindrične ćelije sa vidljivom atipijom, dok su ćelije kribriformnog adenokarcinoma okruglaste sa izraženom atipijom. Duktalni endometrioidni karcinom sadrži prave papile sa fibrovaskularnom peteljkom, česte nekroze i nuklearnu atipiju, kao i česte mitoze (45,65). Komedo nekroza isključuje HGPIN (65).

Floridna intraduktalna proliferacija koja dovodi do jake proširenosti zahvaćenog kanalića ili acinusa sa gubitkom bazalnih ćelija, ukazuje na duktalni endometrioidni karcinom. 'Carcinoma in situ' podrazumeva zahvatanje kanalića ili acinusa kribriformnim karcinomom i obično se nalazi unutar tumora. Intraduktalni karcinom, po Fletcheru je pre evolutivni stadijum PCa, nego njegov prekursor.

1.7.3. Intraduktalni kribriformni karcinom (IDCP)

Gleason gradus 3, predstavlja karcinom koji raste unutar prethodno postojećih kanalića i acinusa, sa očuvanim razgranatim izgledom. Delom prisutne bazalne ćelije se mogu dokazati imunohistohemijski. Početna lezija se može brzo proširiti kroz segment ishodišnog kanala, i zahvata lumen kanalića oko uretre, u kontinuitetu do acinusa u samoj kapsuli. Intraduktalni karcinom obično nastaje unutar dijagnostikovanog invazivnog duktalnog, to jest endometrioidnog karcinoma (45,53,65).

Nakon displazije epitela, sledi nagomilavanje u izdužene pseudopapile unutar lumena, koje se zatim fuzionišu u trabekule od kubičnih ćelija i dele žlezdane lumene na brojne pravilne okruglaste prostore- klasični kribriformni izgled (20%) ili pukotinaste nepravilne prostore- neklasični izgled (80%). Međutim, nedostaje "fenomen sazrevanja" kada u HGPINu perimenter ćelije imaju jasne karakteristike displastičnih ćelija, dok prema centru jedra postaju manja, a jedarca manje upadljiva. Mitoze, pleomorfizam i komedo nekroza su često karakteristika acinarnog kribriformnog karcinoma.

1.7.4. Maligna intraduktalna proliferacija HGPINa

Ostali citološki oblici maligne intraduktalne proliferacije HGPINa su: komedo, solidni i papilarni oblik (45,53,65,67). Ovi oblici su udruženi sa klinički agresivnim formama PCa, predominantno nastaju u periuretralnim primarnim duktusima prostate (45,53).

Rani invazivni karcinom nastaje probijem bazalne membrane acinusa sa HGPINom, gubitkom bazalnih ćelija i invazijom u okolnu stromu (55,67). Nalaz IDCP u iglenoj biopsiji upućuje na ponavljanje biopsije i neku od definitivnih terapija (67).

Kribriformni oblik Gleason gradus 3 karcinoma je izgrađen od pojedinačnih žlezda, odvojenih stromom, dok su lumeni ispunjeni masom ćelija, izbušenih sa sitnijim lumenima. Kribriformni izgled karcinoma je identičan jednoj varijanti Gleason gradusa 4, koji se razlikuje samo po velikim plažama sa invazijom na rubovima (45). Incidenca IDCP po Mc Nealu i Rubinu je 30-35% (45).

Pojedini fokusi HGPINa su pre posledica razvoja karcinoma, nego prekursora lezija. Intraduktalni karcinom možda i nije preinvazivno stanje neoplazme, već kasni događaj u tumorskoj progresiji. Savremeni molekularni dokazi govore o sličnim genetskim oštećenjima IDCPa i Gleason scora 5 (45).

PCa ima sporu progresiju, u poređenju sa drugim karcinomima (39,61,67). U zavisnosti od Gleason gradusa, tumor se udvostruči za 6 meseci do 5 godina. Merenjem PSA se može oceniti rast tumora. Konstantan linearni rast za udvostručenje lokalizovanog karcinoma je oko 2,4 godine, dok je u metastatski proširenih karcinoma taj rast oko 1,8 godina. Visoki Gleason gradus (4-5) je udružen sa još kraćim vremenom za udvostručenje tumora (66).

1.8. Dijagnostički kriterijumi adenokarcinoma prostate

Kriterijumi za dijagnozu PCa se mogu sistematizovati u tri nivoa:

1. **arhitekturni**- mikroglandularna proliferacija sa žlezdama obloženim jednim slojem ćelija; angularne žlezde nasumično raspoređene između većih očuvanih žlezda, okruženih dezmodoplastičnom stromom; 'back-to-back' raspored koji je

jasno odvojen od okolnih benignih žlezda. Prisustvo intraprostatske perineuralne invazije je dijagnostički i prognostički marker. Glomeruloidni rast i kolageni čvorići su takođe arhitekturni kriterijumi maligniteta.

2. **celularni-** veličina i abnormalnost jedara (nukleomegalija, hiperhromazija, mitoze). Velika jedarca su važan kriterijum, dok njihov broj i raspored imaju ograničenu primenu.
3. **luminalni-** mucinozna sekrecija i/ili kristaloidi u lumenima žlezda su manje značajni kriterijumi.

I bez prisustva nekih od važnih kriterijuma kao što su: perineuralna invazija, velika jedarca i glomeruloidni rast; dijagnoza se može postaviti na minimalnom broju žlezda (tri ili više) (46,60,65,74).

1.9. Minimalni adenokarcinom u iglenoj biopsiji

Minimalni adenokarcinom u iglenoj biopsiji je tumor manji od 1mm. Druga definicija je da minimalni adenokarcinom zahvata manje od 5% jednog iglenog isečka (60,65,75,76,77). Minimalni adenokarcinom najčešće podrazumeva prisustvo nekoliko sitnih malignih žlezda smeštenih između većih, složenijih i svetlijih, benignih žlezda. Druga najčešća slika infiltracije lokalizovanog karcinoma je nasumičan (razbacan) rast u stromi, bez prisustva susednih benignih žlezda. Najređi oblik rasta, koji prati uobičajenu sliku su: nizovi ćelija, pojedinačne ćelije i kribriformne žlezde. Za postavljanje dijagnoze PCa mnogi autori zahtevaju bar 3 dijagnostičke žlezde (46,60,74).

Na malom i velikom uvećanju se analiziraju rezovi iglene biopsije bojeni hematoksilinom i eozinom, da bi se utvrdila arhitektura i citološki izgled benignih žlezda, koje se porede sa atipičnim žlezdama.

Major kriterijumi:

- arhitekturni: proliferacija malih žlezda sa znacima infiltracije ili kribriformne žlezde, prevelike i nepravilne da bi se dijagnostikovale kao HGPIN
- jedan sloj ćelija (potpuno odsustvo bazalnih ćelija)

- nuklearna atipija (uvećana jedra i prominentna jedarca $>1\mu\text{m}$, boje višnje)

Minor kriterijumi:

- intraluminalni plavičasti mucin
- ružičasti amorfni sekret
- mitoze
- intraluminalni kristaloidi
- HGPIN u okolini
- amfofilna citoplazma
- hiperhromazija jedara

(60,46,55,61,65,75,78)

Važno je odmah napomenuti da nijedan kriterijum izolovano posmatran, čak ni major kriterijum nije dovoljan za dijagnostiku maligniteta (55,60,61).

Za skrining PCa u TURP se koriste: 'too small', 'too crowded', 'too clear glands'; dok je za potvrdu karcinoma neophodno: uvećanje jedara, uvećanje jedaraca i odsustvo bazalnih ćelija (45,65).

Prvi **major** kriterijum je infiltrativni rast sitnih malignih žlezda 'back-to-back' koje se šire između većih, složenijih i često bleđih žlezda benignog izgleda, čak i onda kada žlezde izgledaju uronjene unutar same strome. Epitelno/stromalni odnos se najbolje vidi na malom uvećanju. Drugi najčešći izgled je nepravilno razbacane žlezde sa nasumičnim smeštajem u stromi, bez mogućnosti poređenja sa benignim žlezdama. Najređi izgled su nizovi ćelija, pojedinačne ćelije i kribriformne žlezde, što se viđa u manje diferentovanim tumorima (55,60,65,75). U najmanjem broju slučajeva se ne registruje invazivni rast, ali se na malom uvećanju vide gusto poređane blede, sitne žlezde. Ovo se nalazi u dobro diferentovanih tumora sa Gleason scorom 2-4, što čini oko 15% svih minimalnih karcinoma u iglenoj biopsiji. Veliki broj ovih slučajeva su podgradirani tumori koji se nalaze na nivou cele žlezde. Nedavno je predloženo da se dobro diferentovani tumori sa Gleason scorom 2-4 ne dijagnostikuju na iglenoj biopsiji (46,60,75).

Odsustvo bazalnih ćelija u atipičnim žlezdama je drugi **major** kriterijum. Bazalne ćelije mogu poprimiti različit izgled u jasno benignim žlezdama, a od suštinskog je

značaja njihov nedostatak u malignim žlezdama. Tanki, dobro fiksirani i kvalitetno obojeni HE rezovi su ključni u proceni prisustva jednog sloja ćelija u malignim žlezdama. Izazov za patologa predstavlja razlikovanje periglandularnih stromalnih fibroblasta od bazalnih ćelija. U slučaju kvečovanih isečaka sa PCa, imunohistohemijsko bojenje specifično za bazalni sloj ćelija može olakšati dijagnostiku. Bazalne ćelije mogu potpuno nedostajati u razbacanim sitnim benignim žlezdama, a naročito u atrofičnim žlezdama, dok je diskontinuirani sloj bazalnih ćelija karakterističan za AAH. Odsustvo bazalnog sloja je ključni nalaz u ASAPu, ali izolovano posmatran, nije dovoljan dijagnostički kriterijum za PCa (60,75).

Nuklearna atipija u vidu uvećanih jedara i izraženih jedaraca je treći **major** kriterijum. Greške u nedijagnostikovanju uvećanih jedara nastaju usled loše fiksacije, prebojavanja ili debelih rezova (52,75,78). U skoro svih slučajeva minimalnog adenokarcinoma je nađena nukleomegalija, dok se makronukleolusi nalaze u oko 64-94% (60,78). Međutim neki karcinomi prostate ne sadrže makronukleoluse. Kada su makronukleolusi odsutni, definitivna dijagnoza se postavlja na osnovu izražene nukleomegalije, sa ili bez jedarne hiperhromazije (60,78). Helpap tvrdi da je prisustvo multiplih jedaraca nalaz specifičan za karcinom (78).

Minor kriterijumi se koriste u manjem broju slučajeva, sa izuzetkom intraluminalnog amorfnog ružičastog sekreta. Ovi minor dijagnostički kriterijumi nisu patognomonični za PCa, ali su korisni u brznoj dijagnostici izmenjenih žlezda. Sa mogućim izuzetkom HGPINa, nijedan od navedenih minor kriterijuma, sam po sebi nije dovoljno alarmantan za ponavljanje biopsije (60,78). Intraluminalni plavičasti mucin se viđa i u mucinoznoj metaplaziji, dok se kristaloide mogu naći i u benignim žlezdama (60).

Varma je našao sledeću učestalost promena u malignih u odnosu na benigne lezije: prominentna jedarca 94% versus 25%, multipla jedarca u 64% versus 0, marginalizaciju jedaraca 88% versus 7%, kristaloide u 40% versus 9%, intraluminalni plavičasti mucin 52% versus 0, intraluminalni amorfnii eozinofilni materijal u 87% versus 2%, glomerulacije u 15% versus 0, kolageni mikronoduli u 2% versus 0, perineuralnu invaziju u 22% versus 0, infiltraciju masnog tkiva u 1 slučaju karcinoma (0,7%). Retrakcione pukotine u više od polovime žlezdane cirkumferencije su bile prisutne u 39% versus 7% (78).

Nakon dijagnostike major i minor kriterijuma, patolog traži znake perineuralne invazije, kolagene mikronodule i glomeruloidne intraglandularne proliferate, koji su specifična dijagnostička slika za PCa (54,55,61,65,75,78), ali se retko nalaze u minimalnom adenokarcinomu (60).

Diferencijalna dijagnoza PCa u iglenoj biopsiji može biti: AAH i atrofija, ali i ASAP i HGPIN (46,60,75,78) sklerozirajuća adenoza- SA, BCH i CCCH (52,65).

Fokusi postatrofične hiperplazije sa nagomilanim acinusima i parcijalnom atrofijom se greškom mogu zameniti za minimalni karcinom. Isto tako moramo biti svesni postojanja PCa sa atrofijom i smanjenom količinom citoplazme. Tada je od presudnog značaja procena prisustva bazalnih ćelija (60,65). Ukoliko se konstatuje prisustvo bazalnih ćelija unutar kribriiformne proliferacije neoplastičnih ćelija, savetuje se oprez i dijagnoza HGPINa. Ukoliko postoji nešto više atipičnih sitnih acinusa odvojenih znatnom količinom strome od HGPINa, a u žlezdama su odsutne bazalne ćelije, treba razmotriti dijagnozu PCa (60,65). U današnje vreme potvrda dijagnoze minimalnog adenokarcinoma se vrši imunohistohemijским bojenjem za bazalne ćelije (34βE12) i AMACR.

1.10. Klinička interpretacija imunohistohemijškog bojenja u iglenoj biopsiji

1.10.1. Anticitokeratini

Citokeratini CK5 i CK14 su lokalizovani u bazalnim ćelijama, dok ih nema u sekretornom epitelu i stromalnim ćelijama prostate. Najčešće se identifikuju monoklonalnim antitelom 34βE12, koje se vezuje za ove citokeratine. Odsustvo bazalnih ćelija u atipičnim žlezdama je važan kriterijum histološke dijagnoze PCa. Pozitivno bojenje citokeratina ukazuje na odsustvo maligniteta (40,46,51,55,60,65,68,75).

1.10.2. Anti-p63

P63 je tumor supresor gen lokalizovan u bazalnom epitelu, BHP, atrofiji i HGPINu. Veruje se da predstavlja nuklearni marker matičnih ćelija i transkriptivni faktor neophodan za razvoj prostate. U 90% slučajeva PCa ne sadrži p63. Pozitivno bojenje p63 ukazuje na odsustvo maligniteta (40,51,65,68).

1.10.3. Anti- α -methylacyl coenzym A racemase (P504)

Pozitivno citoplazmatsko bojenje na AMACR ukazuje na prisustvo maligniteta (40,51,68,69). AMACR je selektivan i veoma senzitivn parametar za PCa. 80% PCa se boji na AMACR. U 21% slučajeva se boje i benigne žlezde prostate i atrofične promene. Većina HGPINova je pozitivna (64%), kao i manji broj AAH (46,51,65,75). Helpap je našao da lezije HGPINa neposredno uz PCa pokazuju pozitivnost, dok HGPIN udaljen od PCa pokazuje negativno ili slabo bojenje na AMACR (69).

1.10.4. Basal cell cocktail (34 β E12+p63)

34 β E12 se vezuje za citokeratine bazalnih ćelija. p63 je lokalizovan u bazalnim epitelnim ćelijama NP, BHP, atrofiji prostate i HGPINu. Ekspresija p63 se vidi na nivou jedara bazalnih ćelija, dok 34 β E12 boji njihovu citoplazmu. Upotreba ovih antitela se koristi u diferencijaciji atipičnih lezija (AAH, PAH, HGPIN) sa sporadično prisutnim bazalnim ćelijama i PCa, gde bazalne ćelije nedostaju. p63 pokazuje veću senzitivnost i manju varijabilnost od 34 β E12 u detekciji bazalnih ćelija (68,79).

Benigne žlezde prostate su okružene kontinuiranim slojem bazalnih ćelija koje pokazuju pozitivnost bojenjem sa 34 β E12. U hroničnom prostatitisu, ovaj sloj može biti diskontinuiran, a u žlezdama sa PINom bazalne ćelije progresivno nedostaju, kako raste gradus displazije. Tako npr. 50% HGPINa ima deficit bazalnih ćelija u jednoj trećini žlezdane cirkumferencije (55). Karcinomske ćelije su izgubile receptore za ova antitela. Narušenost sloja bazalnih ćelija se vidi u 56% pacijenata sa HGPINom (66).

Međutim, nemaju ni sve benigne žlezde uvek bazalne ćelije, tako u atrofiji, BCH i AAH postoje žlezde koje se ne boje ovim antitelom. Ovakav vid imunohistohemijskog bojenja se bazira na negativnom rezultatu, kao dokazom za dijagnozu maligniteta. Mnogi faktori mogu doprineti neuspehu bojenja i lažno negativnom nalazu, tako da nedostatak dokaza nije dokaz nedostatka. 34βE12 se koristi u proceni fokusa atipičnih žlezda i diferencijalnoj dijagnozi koja uključuje: AAH (adenozu), PIN, BCH i atrofiju. Takođe se može koristiti u razlikovanju kribriformnog HGPINa od kribriformnog invazivnog karcinoma.

U svim iglenim biopsijama prostate imunohistohemijsko bojenje potvrđuje dijagnozu u 58% slučajeva, je suspektno u 18%, postavlja dijagnozu u 14%, nema značaj u 8% i menja odabranu dijagnozu u 2% slučajeva. Poseban značaj ovog bojenja se ogleda u analizi radijacijom indukovane atipije u pacijenata sa PCa lečenih zračnom terapijom. Reaktivne bazalne ćelije mogu promeniti citološki izgled jedara, te imitirati karcinomske ćelije. Minimalni rezidualni karcinom nakon hormonalne terapije može takođe predstavljati dijagnostički izazov, ali pozitivno imunohistohemijsko bojenje na PSA i negativno na 34βE12 može biti od velike koristi (60). Bojenje 34βE12 može biti od velike pomoći u atipičnim mikroacinusima i sitnim bioptičkim fragmentima (55).

1.11. Klinička interpretacija adenokarcinoma u iglenoj biopsiji

Gleason gradus i Gleason score se koriste u određivanju patohistološkog izgleda i predstavljaju pokazatelje agresivnosti tumora. Thorson je našao da je minimalni karcinom u iglenoj biopsiji u 78% slučajeva bio srednje diferentovan (GS 5-6), u 18% slučajeva dobro diferentovan (GS 2-4) i loše diferentovan (GS 7-10) u 4% slučajeva (60).

Varma je našao sledeću učestalost u iglenoj biopsiji: Gleason score 6 je prisutan u 48%; score 7 je prisutan u 32,7%; score 8 je prisutan u 8,7%; score 9 u 8%; score 5 u 1,3%, a score 10 i score 4 su prisutni u 0,7%.

Poređenjem Gleason scora u iglenoj biopsiji sa nalazom u celoj prostati, nađena je podudarnost u 43% slučajeva, dok je odstupanje od ± 1 nađeno u 77%. Rubin je našao podudarnost u 57% slučajeva, dok je odstupanje od ± 1 našao u 92%. Podgradiranje tumora u iglenoj biopsiji je nađeno u 42% slučajeva, dok je prekomerno gradiranje

nađeno u 15%. Rubin je još našao da većina minimalnih karcinoma ima Gleason score 6, koji u oko 6% slučajeva budu podgradirani, a u 32% prekomerno gradirani (57).

Algaba je našao podudarnost u 34,5% slučajeva, dok je odstupanje od ± 1 nađeno u 74,8% (74). Podgradiranje tumora u iglenoj biopsiji je nađeno u 49,6% slučajeva, dok je prekomerno gradiranje nađeno u 15,8%.

Minimalni tumor u iglenoj biopsiji često ne predviđa stadijum tumora, te u nalazu treba navesti da je Gleason score određen na minimalnom fokusu karcinoma (77). Brojni autori navode da određivanje Gleason scora u iglenoj biopsiji obično dovodi do podgradiranja, i da na radikalnoj prostatektomiji nije ekvivalentan nalaz (46,60,68), pa se određivanje Gleason scora od 4 i manje ne preporučuje u iglenoj biopsiji, već je ograničeno na TURP i RP (76,80,81).

Visoki Gleason score u iglenoj biopsiji predviđa visoki Gleason score u uzorcima dobijenim prostatektomijom, dok niski Gleason score u iglenoj biopsiji ne predviđa pouzdano i niski Gleason score u definitivnom uzorku (68,74). Zbog mogućeg podgradiranja savetuje se da se prognostička ograničenja Gleason scora iz iglene biopsije razmotre sa dodatnim kliničkim parametrima: PSA, stadijumom bolesti i kvantifikacijom karcinoma. Gleason gradus se zajedno sa serumskim PSA i kliničkim stadijumom bolesti, unosi u Partinove tablice i Kattanove nomograme, koji imaju prognostičku vrednost.

1.12. Kvantifikacija karcinoma

U bioptiranom materijalu sledeći podaci su poređani po redosledu važnosti: Gleason score, procentualna zahvaćenost isečka karcinomom, prisustvo perineuralne i limfovaskularne invazije, broj isečaka zahvaćenih karcinomom, dužina zahvaćenog isečka i ekstraprostatično prisustvo karcinoma u masnom tkivu ili u vezikulama seminalis (46,51,68,75,76,82). Histološki gradus i proširenost tumora u iglenoj biopsiji određuju prognozu i terapijsku grupu pacijenta (51,60,68,77). Cheng i saradnici su našli da je broj pozitivnih isečaka u korelaciji sa volumenom tumora i sa proširenosti bolesti (83).

1.13. Lokalizacija karcinoma

Preporučuje se precizno obeležavanje svih isečaka na inicijalnoj biopsiji (baza, sredina, apex) kao i strane, kako bi se usmerilo eventualno ponavljanje biopsije, ili stekle korisne informacije za dalje lečenje (operacija neurovaskularne peteljke ipsilateralno).

1.14. Adenokarcinom prostate (PCa)

Adenokarcinom prostate je najčešći maligni tumor muškaraca u USA i drugi je po smrtnosti, posle karcinoma bronha (10,11,31,32,34,39,41,42,51,54,55,57,58,61,65).

98% svih primarnih tumora prostate čini PCa (54,57,61,65), od kog najčešće oboljevaju stariji muškarci, a incidenca raste posle 50. godine života (32,34,39,41,42,47,57,58,61).

PCa čini 19% svih karcinoma dijagnostikovanih u razvijenim zemljama i 5,3% svih karcinoma u zemljama u razvoju (21,32,75). Najviše obolelih ima u USA, Australiji i Skandinaviji, a najmanje u Meksiku i Grčkoj i Istočnoj Aziji (21,32,34,39,41,42,57,65). Najveća incidenca je u američkih crnaca (32,34,39,41,42,51,57,65).

U manje od 10% slučajeva bolest je familijarnog tipa sa 2-3 puta povećanim rizikom za oboljevanje kod srodnika prvog stepena (10,32,34,39,41,42,51,61). Do danas su identifikovana dva gena udružena se naslednim oblikom karcinoma prostate: RNase L i MSR1 (32,41,42,46).

Međutim, velika većina obolelih je bez pozitivne porodične anamneze. Imigracione studije su pokazale da faktori okoline imaju veliki značaj (10,32,34,39,41,54,57,65).

Postoje neke naznake da ishrana bogata zasićenim životinjskim mastima i crvenim mesom doprinosi razvoju ovog oboljenja (32,34,40,41,46,51,54,57,58).

De Marco smatra da PIA može predstavljati regeneratorni epitel kao odgovor na oštećenja iz okoline, može prethoditi razvoju PINa i ranom karcinomu. Ove lezije mogu nastati na inflamatornoj osnovi i izlaganjem prehrambenim toksinima, kao na primer karcinogenima u ugljenisanom mesu (32,41,54,57).

Od infektivnih agenasa na prvom mestu su polno prenosive bolesti (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, zatim *Papilloma virus* i *Herpes simplex virus*). Pacijenti sa polno prenosivom infekcijom (STI) su imali u više od 40% povišen nivo PSA, za razliku od pacijenata bez STI, koji su u samo 2% imali povišen PSA.

Povišen serumski nivo PSA je rezultat oštećenja epitelne ćelije (54). Oštećenje epitelnih ćelija nastaje usled hemijske i fizičke traume (refluks urina i kalkulusi prostate), zatim hormonalnog disbalansa i same ishrane. Nadalje svi oni vode u prestanak imune tolerancije i razvoju autoimune reakcije u prostati. Kristali mokraćne kiseline aktiviraju primarno makrofage, koji produkcijom citokina privlače ostale inflamatorne ćelije. Pokazalo se da mastociti oslobađanjem TNF α i različitih proteaza mogu imati značajnu ulogu u tumorogenezi.

Hronična upala koju izazivaju infektivni agensi ili faktori okoline (ishrana) su u oko 20% slučajeva uzrok svih karcinoma u odraslih. Velika većina upalnih lezija prostate je udružena sa atrofičnim epitelom ili fokalnom epitelnom atrofijom. Područja fokalne epitelne atrofije su često udružena sa starenjem i zauzimaju veliki deo periferne zone, a kako epitelne ćelije pokazuju znatnu proliferaciju, nazvani su PIA. Ukoliko nedostaje izraženi inflamatorni infiltrat promena se zove proliferativna atrofija PA (46,54). HGPIN i intraduktalni karcinom se razvijaju direktno iz atrofičnog epitela (54,84).

Povišen nivo estrogena je udružen sa razvojem adenokarcinoma prostate (3,4,8,11,13,22,23,29,37,46,54). Estrogeni utiču na rast i razvoj prostate indirektno preko hipotalamo-hipofizno-gonadalne osovine kroz sekreciju prolaktina; i direkto preko ER α smeštenih u stromi i ER β prisutnih u epitelu (25,34,54). Estrogeni dovode do razvojnih defekata i na taj način obeležavaju lobus u kojem će se razviti inflamacija, hiperplazija, displazija ili PIN (34,54). Hronična inflamacija u prostati odraslog se može odraziti kao autoimuna reakcija, delom zahvaljujući dejstvu estrogena (12,18,54). Oštećenje epitela ili strome prostate može razviti specifičnu reakciju T limfocita. Kontinuirana izloženost štetnom agensu dovodi do razvoja hronične upale i karcinoma. U većine prostata odraslih pacijenata se nalazi povišen inflamatorni infiltrat, od čega su oko 75% T limfociti, 15% B limfociti i brojni makrofagi. T ly u epitelu NP nisu aktivirani, već su aktivirani u BHP i PCa, gde produkuju velike količine IL17 (54).

ER β je sposoban da indukuje gene za kodiranje hemoprotektivnih detoksikacionih enzima (kinin reduktaza, glutation S transferaza) i može imati zaštitnu ulogu na epitel prostate od genomskog oštećenja izazvanog inflamatornim ćelijama i karcinogenima (12).

PCa je obično heterogen i multifokalan sa različitim kliničkim i morfološkim manifestacijama (39,46,51,53).

Neki autori veruju da su 'stem' ćelije sa bazalnim fenotipom, ili proliferišuće ćelije, zapravo meta u prostatičnoj karcinogenezi. Izražena heterogenost je karakteristična kako za HGPIN, tako i za PCa. Brojni fokusi HGPINa nastaju nezavisno unutar jedne prostate, kao što i brojni fokusi karcinoma takođe nastaju nezavisno, što dodatno potvrđuje ovu hipotezu (46,53,55). Jasne genetske sličnosti između HGPINa i PCa sugerišu da evolucija i klonalna ekspanzija PINa ili drugih prekursornih lezija može objasniti multifokalnu etiologiju karcinoma (53,55). Teorija 'multistep' transformacije – je model karcinogeneze u prostati koji podrazumeva morfološki kontinuum transformacije PINa u PCa (40,48,55,61,66).

Uzrok nastanka PCa je nepoznat, a u centru istraživanja su endokrini uticaji (11,39,41,55,57,61). Povišeni nivoi serumskih androgena nisu trajno registrovani u obolelih od PCa (42,57). U urinu je registrovan povišen odnos estrona prema testosteronu (57). Produženom administracijom testosterona razvijao se karcinom prostate u eksperimentalnih životinja (34,57). Značajan broj kliničkih, patoloških i histoloških podataka govori u prilog androgene zavisnosti karcinoma prostate (39,41,55).

Zaštitnu ulogu u prostati ima ishrana bogata vitaminima E i D, karotenoidima i selenom, koji predstavljaju moćne antioksidante, što sve govori o oksidativnom stresu kao uzroku oštećenja DNK u procesu karcinogeneze (32,41,46). Mogući uzroci oksidativnog stresa su: endogeni metaboliti, inflamacija, ishrana i cirkulišući faktori rasta (41,46). Antikancerogeni koji se navode u Azijskoj ishrani su: fitoestrogeni, flavonoidi, karotenoidi i lignini (21,41). Ishrana bogata polinezasićenim mastima i biljnim vlaknima smanjuje nivo serumskog testosterona (34).

IGF-I indukuje proliferaciju stromalnih i epitelnih ćelija reguliše diferencijaciju i apoptozu karcinomskih ćelija (34,35,41). Ovaj faktor se sintetiše u jetri kao odgovor na signalizaciju hormona rasta. Androgeni deluju na produkciju IGF-II, koji uslovljava

proliferaciju stromalnih i epitelnih ćelija i samim tim dovodi do razvoja BHP (35). Konzumacijom velikih količina masnoća povećava se produkcija insulina i sledstveno je povećanje IGF, te može predstavljati faktor rizika za PCa (41). Marcelli smatra da je ukupni unos kalorija, verovatnije nego unos masti zapravo odrednica rasta PCa, odn. tumorske angiogeneze (34).

Histogeneza PCa je jasnija od samog uzroka. Savremene studije postavljaju fokuse intraduktalnog displastičnog epitela, nazvane HGPIIN kao premalignu promenu, koja vodi razvoju PCa (40,43,46,57,67). Već je spomenuto da lezije HGPIINa prethode pojavi invazivnog karcinoma za period od oko 10-tak godina, i njihova se težina povećava sa godinama pacijenta (40,57,67). Morfološki dokazi koji povezuju HGPIIN sa invazivnim karcinomom prostate su: periferna lokalizacija obe lezije, citološka sličnost HGPIINa sa invazivnim karcinomom i topografska bliskost obe histološke promene. Lezije PINa se češće nalaze u prostatama koje imaju žarišta karcinoma, nego u onih bez tumora (40,57,61). HGPIIN služi kao važan marker u iglenoj biopsiji prostate, jer se u 'follow-up' biopsijama nakon nekoliko nedelja ili meseci pronade karcinom (40,46,57). PIN se zajedno sa PCa javlja u oko 80% muškaraca starosti 50-70 godina, s time da je srednji uzrast za PIN 65 godina, a za PCa 70 godina (3,51,58).

Patogeneza PCa proizilazi iz nasledne komponentne i faktora okoline (46,54,61). Guerini navodi hereditarni tip PCa, u kome dolazi do alteracije gena zaduženih za kodiranje 3 β -hydroxysteroid dehidrogenaze (33).

5 α -reduktaza je enzim zadužen za konverziju testosterona u DHT, a nalazi se u stromi i epitelu: epididimisa, testisa i prostate (25,35). Schatzl navodi da se gen za 5 α -reduktazu (tip II) nalazi na kratkom kraku 2. hromozoma (25,47). Mutacije ovog gena izazivaju muški pseudohermafroditizam, gde je odraslih jedinki prostata je nerazvijena. Iako u pubertetu dolazi do porasta serumskog testosterona, nivo DHT ostaje nizak. Nedavno su otkrivena dva polimorfna oblika gena za 5 α -reduktazu: V89L koji je udružen sa smanjenom aktivnosti 5 α -reduktaze i smanjenjem serumskog testosterona, a nema uticaj na veličinu i histologiju prostate, ni na serumski PSA; i A49T koji ukazuje na povećanu aktivnost 5 α -reduktaze, uvećanu prostatu, smanjen odnos stroma/epitel i povišen serumski PSA. Ovi podaci su moguće objašnjenje zašto finasteridi imaju veći

uticaj u uvećanim prostatama i utiču na produženu involuciju epitela prostate. Finasteridi blokiraju enzim 5α -reduktazu i pretvaranje testosterona u DHT, smanjuju veličinu prostate i olakšavaju mokrenje (25,47). Polimorfizam A49T može biti genetski marker za osetljivost na terapiju finasteridima, jedino što je prisutan u svega 5% austrijske populacije muškaraca (47).

Epidemiološke studije su pokazale povezanost incidence i smrtnosti od PCa i konzumiranja crvenog mesa i životinjske masnoće (heterociklični amini dovode do mutacije DNK) (32,41,54,57). Ova oštećenja vode do oštećenja same epitelne ćelije, te može doći do gubitka tolerancije na normalne antigene prostate i produženu autoimunu reakciju. Kao rezultat oštećenja epitelnih ćelija nastaje regenerativna lezija poznata kao PIA ili PA. Kako su ove lezije često prisutne, samo mali deo njih progredira u PIN ili PCa, i mogu biti od kliničkog značaja i predmet dodatnih istraživanja.

PCa se razvija akumulacijom somatskih gena i epigenetskih promena koji inaktiviraju tumor-supresor gene i aktiviraju onkogene. Ovi tumor-supresor geni su visoko eksprimirani u epitelu normalne prostate, a često smanjeni i odsutni u PINu i PCa. Postoje dokazi o genetskoj nestabilnosti koja olakšava tumorsku progresiju (54). Tannenbaum navodi da je učestalost numeričkih hromozomskih anomalija prisutna u 50% PIN lezija i u 51% PCa, čime objašnjava njihovu sličnu patogenezu (55).

Makroskopska dijagnoza PCa može biti teška, pa i nemoguća, te je neophodan mikroskopski pregled. Spoljašnja površina prostate je glatka, sjajna, čvornatog izgleda. U 70% slučajeva PCa nastaje u perifernoj zoni (39,51,54,56,57,58,61) multicentričnog je rasta i detektuje se pomoću DRE. Tumor je izrazito tvrd zahvaljujući umnoženom vezivnom tkivu (51,54,56,57,58,61). Na poprečnom preseku se uočava nepravilna lobulacija sa jednim ili više nejasno ograničenih područja lako izdignutih od okoline, sivo-beličaste ili žućkaste boje, homogenog izgleda, smeštenim subkapsularno. Porastom tumora uočavaju se i fokusi hemoragičnog i nekrotičnog izgleda (39,51,55,57).

Definicija histološke slike PCa je potpuno odsustvo bazalnih ćelija i lokalna invazija strome od strane malignih acinusa (46). Invazija strome je karakteristika skoro svih karcinoma u ljudi (85).

1.14.1. Gleason gradus i Gleason score

Gleason gradus je verovatno najstariji i najrasprostranjeniji gradus sistem za ocenjivanje karcinoma uopšte. Histološki gradus karcinoma prostate je zlatni standard dijagnostike i glavni pokazatelj u predviđanju kliničkog toka bolesti. Opisan od strane Donalda F. Gleasona 1966.god., Gleason gradus se bazira na pet arhitektonskih slika malignih žlezdanih struktura i njihove infiltracije (51,57,58,61,65,76,80,81). (slika 18)

Određivanje histološkog gradusa vrši se interpretacijom histoloških rezova bojenih standardnom metodom na svetlosnom mikroskopu, pod uvećanjem 100-400. Kako mnogi tumori pokazuju histološku heterogenost, Gleason je uveo Gleason score-GS (51,61,65,76,81,86). Registrovanje najčešćeg i sledećeg, manje zastupljenog histološkog izgleda, predstavlja Gleason score tumora, odn. zbir dva gradusa. U jednoj studiji Ruijter je pokazao da se prosečno 2,5 različitih gradusa nalazi u tumoru, na nivou cele žlezde, a u 16% slučajeva je prisutan samo jedan gradus. Samo u 28% slučajeva je našao jedan tumor u radikalnoj prostatektomiji, dok su tumori veći od 1-2 cm³ imali više od 2 gradusa. Svaki treći gradus ako je 'high-grade' treba spomenuti u patohistološkom nalazu, zbog značajnog uticaja na prognozu (51,86,87). Ekstrakapsularna invazija se videla u relativno malih tumora sa niskim histološkim gradusom, što je ukazivalo na topografsku povezanost sa kapsulom (86).

Najbolje diferentovani tumori imaju Gleason score 2 (1+1), dok najlošije diferentovani tumori imaju Gleason score 10 (5+5) (51,55,57,58,76). I u drugim malignitetima, najlošiji gradus određuje ishod bolesti.

Modifikacija Gleason grading sistema iz 2005. godine podrazumeva da se u iglenoj biopsiji praktično ne daje Gleason score 2-4. U svakodnevnoj praksi Gleason gradus se kreće od 3, naviše i zapravo predstavlja načešći gradus (80,81,87). Zatim, grupe loše formiranih žlezda sa jedva raspoznatljivim lumenima, iz Gleason gradusa 3, se sada ocenjuju kao gradus 4. Većina kribriformnih karcinoma se ocenjuje kao Gleason gradus 4 ili ukoliko sadrže komedo nekrozu kao Gleason gradus 5.

Udeo gradusa 4 u Gleason scoru 7 (3+4 versus 4+3) je od velikog prognostičkog značaja.

Posebni GS se daje za svaki pojedinačni isečak, a ocenjivanje ukupnog Gleason gradusa je opcionalno. Najveći gradus tumora određuje tok lečenja, bez obzira na procenat zahvatanja. Ukoliko se ukupni score izjednači sa najlošijim pojedinačnim nalazom, pokazuje najbolju korelaciju, a mogućnost prekomernog gradiranja na prostatektomiji je neznatna.

Prisustvo trećeg 'high-gradusa' treba spomenuti u nalazu i modifikovati scoring sistem. Ukoliko je kao treći prisutan gradus 5, onda se sabiraju primarni gradus i najveći, odn. 5.

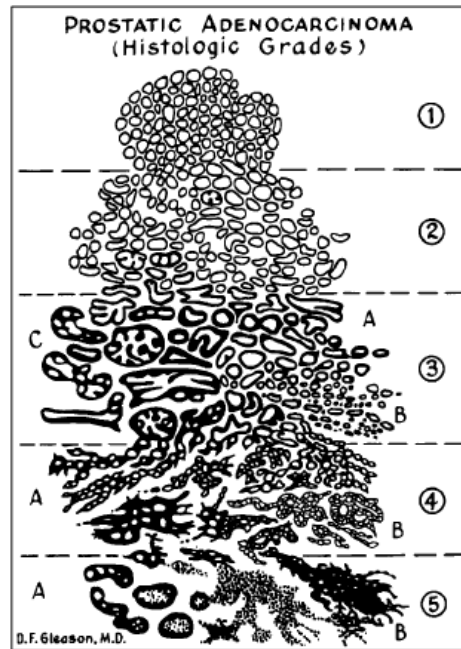
Intraduktalni karcinom prostate se nekada klasifikovao kao HGPIN ili kao Gleason gradus 3, no međutim on predstavlja agresivnu formu sa lošijom prognozom. Delimično su prisutne očuvane bazalne ćelije. Kada se IDCP ne nalazi uz invazivnu komponentu u bioptičkom materijalu, teško ga je razlikovati od HGPINa, ali to treba navesti u nalazu. Ukoliko se nalazi uz gradus 4 ili 5, dijagnoza IDCP je od akademskog značaja (80,87).

Poznato je da multifokalni tumori pokazuju histološku heterogenost i mogu imati različite Gleason graduse u različitim fokusima (61,80,86). Multifokalnost je definisana kao minimalno rastojanje od 4 mm između dva maligna fokusa (86). Dominantni tumor se predstavlja kao 'index tumor' i smatra se biološki najznačajnijim, pored njega se mogu naći 1 ili više satelitskih tumora. Kada su dva tumora kodominantna, ocenjuje se onaj sa težim gradusom, a drugi se opiše u nalazu. Kada je nedominantni tumor sa težim gradusom (18%), opišu se oba tumora, jer nedominantni nodul može uticati na ishod bolesti (80,86).

1.14.1.1. Gleason gradus 1

Gleason gradus 1 je redak nalaz, viđa se u samo 3,5% slučajeva. Često je slučajan nalaz u tranzicionalnoj zoni u TURP kod BHP, ili u perifernoj i intermedijernoj zoni u RP zajedno sa 'high-grade' karcinomom. Tumorsko tkivo je izgrađeno od pojedinačnih, odvojenih, gusto smeštenih i uniformnih acinusa. Žlezde su okrugle do ovalne, srednje veličine i grupisane čine tumorski nodul sa jasno definisanom marginom. Žlezde su raspoređene 'back-to-back' sa minimalnom količinom strome. Ćelije gradusa 1 su

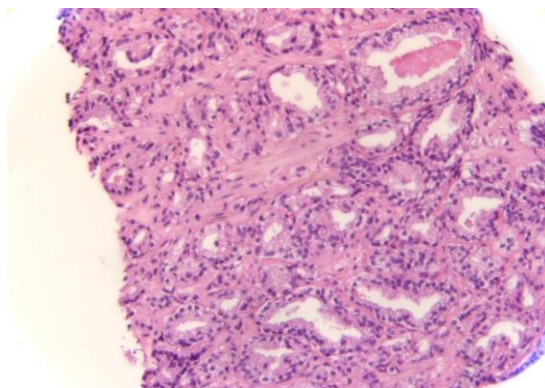
uniformne, veće od ćelija u BHP, poredane u nizu na bazalnoj membrani, jasnih granica sa benignim jedrima (slika 17).



Slika 17: Gleason grades: standard drawing (76)

1.14.1.2. Gleason gradus 2

Tumorski acinusi su manje uniformni i rastresitijeg rasporeda, veća je raznolikost u veličini i obliku žlezda. Grupe žlezda nisu jasno ograničene kao u gradusu 1, prisutna je infiltracija strome na periferiji tumorske mase. Stroma koja razdvaja žlezde, je obilnija, a debljina strome je manja od dijametra same žlezde. Kao i gradus 1, često je slučajan nalaz u tranzicionalnoj zoni u TURP ili u RP zbog 'high-grade' karcinoma. Obično se nalazi udružen sa gradusom 3. Gleason gradus 2 se izuzetno retko određuje u iglenoj biopsiji, da skoro i ne postoji. (slika 17 i 18)



Slika 18: Gleason gradus 2 (HE, x200)

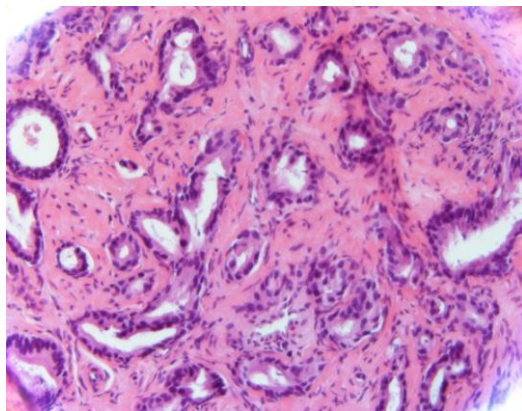
1.14.1.3. Gleason gradus 3

Ovaj gradus je srednje diferentovan, i predstavlja najčešći gradus PCa. Opisani su veoma različiti tumorski acinusi sa uglastim, izduženim i izuvijanim oblicima. Acinusi su još uvek pojedinačni ili odvojeni u grupe sa kribriformnim ili papilarnim izgledom. Tumorske granice su slabo definisane.

Gradus 3A sadrži pojedinačne srednje velike žlezde, nepravilnog oblika (uglaste, kruškolike) i raštrkane, koje pokazuju infiltraciju strome, sa nepravilnim, špicastim produžetcima. Postoji značajno stromalno razdvajanje, u debljini većoj od dijametra žlezde. Žlezde izgledaju tamnije zbog bazofilije citoplazme.

Gradus 3B ima nešto manje žlezde, nepravilnog izgleda koje sadrže žlezdane lumene. Neke od žlezda su izdužene, ređaju se u nizove ili u mala gnezda ćelija sa neupadljivim lumenima.

Gradus 3C čine prošireni kanali sa masama kribriformnog ili papilarnog tumora. Ovaj oblik zapravo predstavlja intraduktalni rast, a same tumorske mase imaju glatke, zaobljene ivice. Kanalići pokazuju prisustvo bazalnih ćelija i predstavljaju 'in situ' širenje duktalnog tipa PCa. Jako podsećaju na kribriformni HGPN. Nekroza nije prisutna u gradusu 3C. Ako je promena difuzna, verovatno je gradus 4. Gleason gradus 3 se najčešće javlja u čistom obliku, pa je i najčešći score $3+3=6$. Gleason scorevi 5-7, koji sadrže gradus 3, su najčešći histološki oblici PCa. (slika 17 i 19)



Slika 19: Gleason gradus 3 (HE, x200)

1.14.1.4. Gleason gradus 4

Gleason gradus 4 je loše diferentovan tumor, izgrađen od grubih infiltrativnih masa malignog epitela, fuzionisanih u lance ili nizove.

Gradus 4A sadrži maligni epitel koji formira strukture mikroacinarnog, kribriformnog i papilarnog izgleda. Granice ovih struktura su slabo definisane, reckastog izgleda sa konfluentnim rastom.

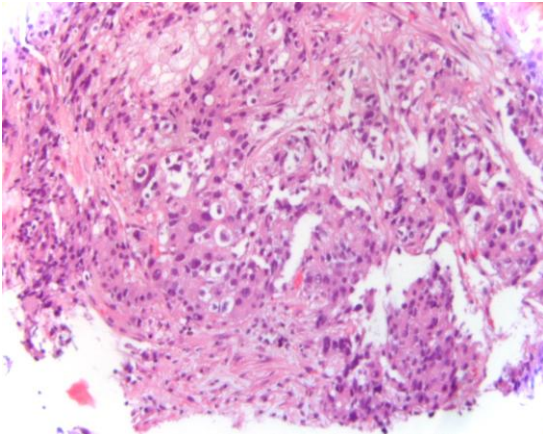
Gradus 4B nalikuje na svetloćelijski karcinom bubrega. Jedra su varljivo mirna, bez uvećanih jedaraca. Visoko infiltrativne, male, fuzionisane želzde su znak loše diferencijacije. Gradus 4 je najčešće udružen sa gradusom 3, u Gleason scoru 7 (slika 17).

1.14.1.5. Gleason gradus 5

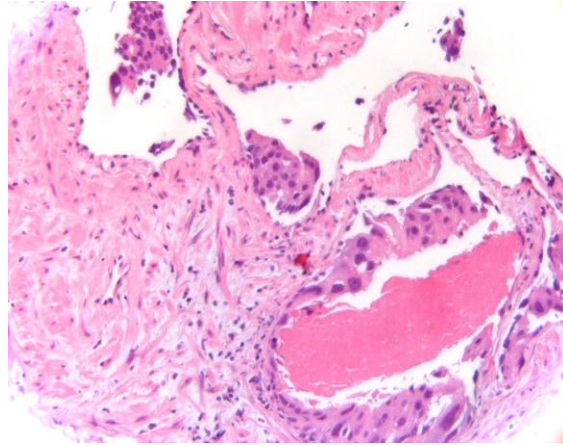
Gleason gradus 5 je najlošije diferentovani oblik PCa (slika 17,20). Gradus 5A podseća na comedo intraduktalni karcinom dojke sa glatkim, oblim masama, trakama i kanalima karcinoma. Tipično je centralno smeštena nekroza, okružena papilarnim, kribriformnim i solidnim karcinomskim masama. (slika 17 i 21) Neki slučajevi zapravo predstavljaju 'in situ' rast duktalnog PCa, jer sadrže prisustne bazalne ćelije.

Gradus 5B je predstavljen solidnim, širokim trakama anaplastičnih ćelija, koje pojedinačno infiltruju stromu. Ovaj oblik je toliko dediferentovan da jedva nekoliko

malih žlezdanih lumena ili 'signet-ring' ćelija, ukazuju na postojanje adenokarcinoma. Gradus 5 se nalazi najčešće zajedno sa gradusom 3, u Gleason scoru 8 (55,61,65,76).



Slika 20. Gleason score 9 (HE, x200)



Slika 21. Gleason score 9, comedo (HE, x200)

Rubin deli adenokarcinome prostate na: dobro diferentovane (Gleason score do 5), srednje diferentovane (Gleason score 6 i 7), i loše diferentovane (Gleason score preko 8). Gleason score 7 ima elemente 'high-grade' karcinoma, klinička agresivnost mu je negde između scora 5-6 i scora 8-10, i ne bi trebao da bude u grupi srednje diferentovanih tumora. DeMarzo deli PCa na: dobro diferentovane (Gleason score 2-4), srednje diferentovane (Gleason score 5-6), srednje do loše diferentovane (Gleason score 7) i loše diferentovane (Gleason score 8-10) (46,61,68,76,78).

Kako Gleason score 2 (1+1) predstavlja samo 0,5% svih PCa, imunohistohemijским analizama je većina ovih lezija svrstana u AAH, koja je lokalizovana u tranzicionalnoj zoni, kao i 'small acinar' karcinom (55,66,68,76,80,87).

Podudarnost Gleason scora u iglenoj biopsiji sa celom prostatom, je nađena od strane mnogih autora u 34-57%, dok je odstupanje od ± 1 nađeno u 75-92%. Podgradiranje tumora u iglenoj biopsiji je nađeno u 42-50%, dok je prekomerno gradiranje nađeno u 5-16%. Određivanje Gleason scora u iglenoj biopsiji obično dovodi do podgradiranja, i na radikalnoj prostatektomiji nije ekvivalentan nalaz (46,51,60,68,80), pa se određivanje Gleason scora od 4 i manje ne preporučuje u iglenoj biopsiji, već je ograničeno na TURP i RP (76,80,81,88).

Greške u sistemu gradacije u iglenoj biopsiji su: teškoće u određivanju infiltrativnog rasta, greške u tkivnom uzorku (mala količina tkiva dobijena iglenom biopsijom i heterogenost gradusa u tumoru, te multifokalnost), isključenost tkivnog uzorka, iskustvo patologa i različiti posmatrači (52,76,80,86).

Histološki gradus treba odrediti u svakom uzorku tkiva prostate koje sadrži nelečeni adenokarcinom. U pacijenata nakon hormonske terapije ne treba postavljati histološki gradus. Gleason grading sistem treba primenjivati na svim uzorcima prostate, uključujući i iglenu biopsiju u kojoj postoji minimalni karcinom, manji od 1mm (76).

'Low grade' Gleason score je postepeno nestajao 90tih godina i današnji radovi retko daju dijagnozu Gleason score 2, tako da statistički ne mogu da se obrade i ne mogu se izračunati krive preživljavanja. Sumnja se da ovakav 'malignitet' može progredirati, metastazirati ili dovesti do smrtnog ishoda. AFIP navodi da je komplikovano razlikovati Gleason gradus 1 i Gleason gradus 2, kao i da nema praktični značaj (81). U svakodnevnoj praksi Gleason score se kreće od 6 do 10, pa je nepotrebno preobilan, zbunjuje i pacijenta i kliničara, te je predloženo odbacivanje 'low score' lezija (80,81).

Renshaw je revidirao iglene biopsije dijagnostikovane od strane opštih patologa i našao podudarnost sa originalnim nalazima u 59% slučajeva. Distribucija je bila sledeća: 1% svih tumora je predstavljao Gleason score 4; 5% svih tumora je imalo score 5; 39% svih tumora je imalo score 6; 43% svih tumora je imalo score 7; 5% svih tumora je imalo score 8; 6% svih tumora je imalo score 9 i 1% svih tumora je imalo Gleason score 10 (89).

Varma je našao sledeću učestalost u iglenoj biopsiji: srednje diferentovani tumori (Gleason score 5-6) su prisutni u 49,3%; srednje do loše diferentovani tumori (Gleason score 7) su prisutni u 32,7%; loše diferentovani tumori (Gleason score 8-10) su prisutni u 17,3%; i dobro diferentovani tumori (Gleason score 2-4) su prisutni u 0,7% slučajeva (78).

Kombinacija TNM stadijuma (PSA i DRE) i Gleason score ima veliku prognostičku vrednost, niži score ima bolju prognozu. Za procenu stadijuma i predviđanje ishoda bolesti su napravljene Partinove tablice i Kattanovi nomogrami (39,46,51,57,58,61,68,76,77,80). Gleason gradus utiče na odluku o načinu lečenja, npr. score 6 je za praćenje i radioterapiju, 7 za spoljašnju radioterapiju, brahiterapiju ili

radikalnu prostatektomiju, dok se u 8-10 daje adjuvantna hormonska terapija ili radioterapija (46,58,80).

1.14.2. Invazija i metastaziranje

Subkapsularna lokalizacija tumora u 90% slučajeva dovodi do invazije same kapsule (39,51,57,61). Uobičajena je perineuralna tumorska invazija u samoj prostati i u susednim tkivima. Vezikule seminalis su skoro uvek infiltrirane direktnim širenjem PCa (39,51,57,61). Mokraćna bešika je ređe zahvaćena. Najranije metastaze uključuju: limfne čvorove obturatorne jame, ilijačne i periaortne limfne čvorove. Metastaze u pluća su rezultat limfogenog odn. venskog širenja. Koštane metastaze su najčešće u kičmene pršljenove, rebra i karlicu i obično su osteoplastičnog tipa (39,51,57,61). Takođe mogu biti zahvaćeni bubreg i nadbubreg (40,51,65) ali i dura (90).

Rosai navodi da postoji 10% verovatnoće invazije kapsule u tumoru zapremine 0,5 ml, 10% verovatnoće invazije vezikula seminalis u tumoru zapremine 4 ml i 10% verovatnoće postojanja metastaza u tumoru zapremine 5 ml (51).

1.14.3. Klinička slika

Jedna desetina svih PCa se inicijalno otkrije u isečcima tkiva uzetih transuretralnom resekcijom zbog BHP. Široko rasprostranjeni skrining za PCa podrazumeva DRE u kombinaciji sa serumskim PSA. Pacijenti sa visokim serumskim PSA, a sa ili bez pozitivnog DRE se dalje podvrgavaju iglenoj biopsiji prostate (57).

Klinička slika PCa u početku može biti potpuno asimptomatska, da bi se vremenom razvilo učestalo i otežano mokrenje, nokturia, smanjenje mlaza, akutna retencija urina i kao krajnje manifestacije: hematurija, inkontinencija, bol, anemija, slabost i gubitak na težini. U klinički uznapredovalim stadijumima nalazi se čvršći nodul na DRE, induracija i nepravilni oblik prostate (39,55).

Klinički tip tumora izaziva lokalne simptome i znake. Latentni karcinom se nalazi slučajno na obdukciji ili u uzorcima prostatektomije zbog BHP. Okultni karcinomi dovode do udaljenih metastaza, dok primarni tumor ostaje klinički neotkriven (39,51,61).

1.15. Sekstant biopsija

Sekstant biopsija je standardna metoda u histološkoj dijagnostici PCa (51,60,68,75). Kod pacijenata sa povećanim serumskim PSA, transrektalno ili transperinealno operater uzima multiple isečke, a bez narušavanja anatomskih odnosa u eventualnoj sledstvenoj operaciji (55,61).

Kombinacija 6 transperinealnih i 6 transrektalnih biopsija kod istog pacijenta rezultuje otkrivanjem karcinoma u 48,5% slučajeva, a stepen pronalaska karcinoma se povećava za 7% i 8% u odnosu na svaku metodu pojedinačno. Iglenom biopsijom prostate dobija se tkivo iz periferne zone (51,52). Sredina bočno i baza bočno imaju najveću stopu pronalaska karcinoma (91).

Igla za biopsiju kalibra 18-gaugea je dizajnirana da uzorkuje isečke dužine 15 mm, iako prosečna dužina isečka po Ruijteru iznosi samo 9,4 mm. Bostwick navodi da je ukupan uzorak tkiva manji od 50 mm zapravo neadekvatan. Boje se tri serijska reza po cilindru (51,91).

Iglene biopsije prostate su posebno komplikovane za kalupljenje u parafinu, jer su krte i iskrivljene, pa ih treba ispravljati tokom procesiranja. Rezovi su često debeli ili prebojeni sa zatamnjenim jedarnim hromatinom i bez prepoznatljivog jedarceta (52,78,91). Ovakvi problemi su sastavni deo biopsija sa malim fokusom suspektnim na malignitet. Rutinski se posmatra 6 rezova, dok se u oko polovine slučajeva pokazalo korisno dublje sečenje kalupa sa suspektnim malim fokusom (91).

Patohistološki izveštaj opisuje broj pozitivnih isečaka, koji je u korelaciji sa stadijumom bolesti, veličinom tumora, rizikom za pozitivne hirurške margine i progresijom tumora nakon prostatektomije. Široko se koristi metod kvantifikacije karcinoma u iglenoj biopsiji sa mernjem proporcije zahvaćenosti isečka (46).

Standardni biopsijski protokol je podrazumevao 6 sekstant iglenih isečaka, a trenutno je minimalni broj bioptičkih uzoraka 12, što je skoro udvostručilo broj novootkrivenih karcinoma (66,91).

1.16. Severno američki Whitmore-Jewett stadijumi

U stadijumu A (negativan DRE) i B (pozitivan DRE), tumor je ograničen na prostatu. U stadijumu C tumor je proširen izvan kapsule prostate i zahvatio je susedne strukture (vezikule seminalis). Metastaze u limfne čvorove i udaljene organe (kosti, pluća, jetru) su prisutne u stadijumu D. Karcinomatoza sa terminalnom pneumonijom i sepsom je najčešći uzrok smrti.

Serumski PSA se koristi kao pokazatelj prisustva bolesti i kao indikator odgovora na terapiju. Serumski PAP je povišen u slučaju postojanja osteoblastnih metastaza u kostima (39,51,57,61).

1.17. pTNM stadijumi

T1- neočekivani karcinom u uzorcima nakon prostatektomije zbog BHP

T1a- tumor zahvata manje od 5% tkiva dobijenog TURPom

T1b- tumor zahvata više od 5% tkiva dobijenog TURPom

T1c- tumor otkriven iglenom biopsijom usled povišenog PSA

T2- tumor ograničen na prostatu, palpabilan i vidljiv na UZ

T2a- tumor zahvata manje od polovine jednog lobusa

T2b- tumor zahvata više od polovine jednog, ali ne zahvata oba lobusa

T2c- tumor zahvata oba lobusa

T3- tumor se širi van granica prostate

T3a- tumor zahvata periprostatično vezivno tkivo

T3b- tumor zahvata vezikule seminalis

T4- tumor zahvata bešiku, rektum, karlicu

N- zahvaćeni su regionalni limfni čvorovi

M- udaljene metastaze u kostima 90%, plućima 46%, jetri 25%, pleuri 21% i nadbubrežnim žlezdama 13%. Metastaze u kostima kičme se vide i bez metastaza u plućima, i javljaju se kod manjih tumora prostate (4-6 cm). Češće je pogođen lumbalni deo kičme 97%, od cervikalnog 38%, što se tumači širenjem duž spinalnih vena.

Kliničar određuje da li će pacijenta samo zračiti ili će kombinovati sa hormonskom terapijom (92). Sa razvojem opstrukcije, radi se TURP. U slučajevima koji ne reaguju na hormonsko lečenje daje se toksična hemoterapija. Ablacija androgena može biti u vidu blokirajućih agenasa ili orhiektomije (65).

1.18. Mehanizmi hemoprevencije

I estrogeni i antagonisti estrogena deluju kao hemijska kastracija i direktno inhibišu rast karcinomskih ćelija, uvodeći ćeliju u apoptozu ili 'arest' ćelijskog ciklusa (34). Tačan način njihovog delovanja ostaje i dalje nejasan (15). Zbog apoptoze može doći do značajne regresije tumora, koja se mikroskopski ogleda u vakuolizaciji citoplazme, rupturi ćelijske membrane, piknozi i ogoljenim jedrima, ali i pseudomiksomatoznoj transformaciji strome (51).

Estrogen stimuliše ćelijsku proliferaciju preko ER, indukujući lokalnu produkciju stimulatornih faktora rasta: TGF, IGF-I i EGF i inhibicijom lokalne ekspresije inhibitornih faktora rasta kao TGF β .

Selektivni estrogen receptor modulatori (SERM) bi logično smanjili produkciju stimulatornih faktora rasta i povećali produkciju inhibitornog faktora rasta, TGF β . Antiproliferativno dejstvo SERMa uključuje sekvestraciju calmodulina, inhibiciju protein kinaze C i indukciju p21 (inhibitor ćelijskog ciklusa). SERM ima sposobnost da se veže za ER α i ER β u takmičenju sa E2 i drugim estrogenima. Formiranje kompleksa SERM-ER dovodi do inaktivacije estrogenom regulisanih gena, i sledstveno smanjene ćelijske proliferacije (40,93).

SERM se generalno smatraju 'slabim estrogenima', jer poseduju agonističke i antagonističke aktivnosti u zavisnosti od vrste tkiva i podtipa ER sa kojim reaguju. Zajedno sa fitoestrogenima imaju sposobnost da blokiraju karcinogenezu u prostati (10,41,93). Raloxifene je pokazao dozno zavisnu regresiju u ventralnoj prostati pacova.

Sve transgene životinje vremenom razviju PCa. Delovanje SERM preko ER α je nezavisno od androgena. Davanjem testosterona i estradiola 'wild type' miševima, razvije se hiperplazija, PIN i PCa. Davanjem testosterona i estradiola α ERKO miševima, razvija

se hiperplazija prostate, ali ne i HGPIN, niti PCa. Sve govori u prilog da dejstvo estrogena, preko ER α može imati ključnu ulogu u karcinogenezi prostate (10).

Tamoxifen (TAM) je nesteroidni estrogen (mešani agonista/antagonista), otkriven 1980. kao alternativa DESa u lečenju PCa. Bolje se tolerisao, ali je i terapijski odgovor bio slabiji (15).

Hobisch nije našao pozitivnu ekspresiju ER α , ni ER β kako u metastazama, tako ni u ćelijskim linijama karcinoma prostate, već je u nekima našao ekspresiju AR. Aktivnost AR u metastazi PCa je regulisana androgenima, ali i nesteroidnim faktorima.

Hormonska osetljivost karcinoma varira u primarnom tumoru i u metastazama. Analiza steroidnih receptora u tumoru može predvideti učinak endokrine terapije. Mutacije gena za AR u metastatskom karcinomu se smatraju jednim od razloga androgene nezavisnosti tumora (51).

Marcelli navodi različite hipoteze koje objašnjavaju androgenu nezavisnost tumora: 1) amplifikaciju AR gena, koja omogućava rast tumora u prisustvu minimalnih koncentracija AR, 2) mutaciju AR udruženu sa fenotipskim nalazom, 3) poremećaj intraprostatske bioraspodivnosti DHT za aktivaciju AR, 4) androgen-nezavisna aktivacija AR, 5) aktivacija AR alternativnim signalima različitih koaktivatora, 6) prekomerna ekspresija molekula koje omogućuju neosetljivost na androgene- caveolin, 7) nagomilavanje antiapoptičnih molekula nakon androgene ablacije (34).

Raloxifene vezivanjem za ER β uzrokuje povećanu ekspresiju gena, dok vezivanje za ER α rezultuje minimalnom aktivacijom gena (9). Kao antagonista, on se u određenim tkivima suprotstavlja dejstvu estrogena, dok u drugima imitira dejstvo estrogena (agonista) (8). Mehanizmi upravljanja i razvoja rezistencije na antagoniste estrogena su nepoznati. Neočekivana je sposobnost ER da različito odgovara u zavisnosti od određenog liganda, i gde svaki ligand indukuje posebno podešavanje receptora za angažovanje određenih koaktivatora i korepresora u kompleksu receptor-transkriptor (8). Ovi ligandi su parcijalni agonisti za ER α , ali deluju kao čisti antagonisti za ER β (9).

Stečena rezistencija na tamoxifen u lečenju nekih tumora predstavlja velik problem za kliničare. Nedavni podaci govore o uzajamnoj povezanosti između estrogena i faktora rasta: estrogeni regulišu faktore rasta, a faktori rasta fosforilacijom aktiviraju ER, povećavajući njihovu osetljivost na srodne hormone i njihovu eventualnu aktivaciju

nezavisnu od liganda. Prekomerna ekspresija receptora za faktore rasta može predstavljati osnovu tumorske rezistencije na tamoxifen (8).

Sistemska hemoterapija je pokazala minimalnu korist u pacijenata sa metastatskim PCa neosetljivim na dejstvo hormona (51).

Ravnoteža između efekata AR, ER α i ER β je neophodna za zdravlje prostate. Štetni efekti se ostvaruju preko ER α i podrazumevaju neplaniranu proliferaciju, inflamaciju i malignitet, za šta je neophodna racionalna upotreba ER α -antagonista. Korisni efekti, sa druge strane se odvijaju preko ER β kroz prevenciju hiperplazije, inflamacije i karcinogeneze postavljajući racionalnu upotrebu ER β -agonista u lečenju BHP i PCa.

Sama ekspresija ER β varira tokom karcinogeneze u prostati (18).

1.19. Antagonisti estrogena mogu sprečiti nastanak adekokarcinoma prostate

Fitoestrogeni su nesteroidne supstance sa slabom estrogenom aktivnosti. Fitoestrogeni međutim, imaju sličan afinitet za vezivanje sa ER kao tamoksifen ili SERM. Oni suštinski deluju kao parcijalni antagonisti. Postoje dve grupe fitoestrogena: izoflavonoidi i lignansi. Postoji direkna i obrnuta korelacija između serumskih izoflavonoida i incidence PCa. Smatra se da fitoestrogeni snižavaju aktivnost 5 α -reduktaze tako što povećavaju steroid vezujuće globuline, snižavanjem slobodnog testosterona i snižavanjem aktivnosti aromataze p450 (10,41). Takođe je pokazano da fitoestrogeni snižavaju holesterol, sprečavaju kardiovaskularna oboljenja, sprečavaju osteoporozu i zaustavljaju progresiju BHP (10). Prezioso navodi da fitoestrogeni usporavaju progresiju karcinoma prostate preko svojih agonističkih odn. antagonističkih dejstava ili preko brojnih bioloških efekata: njihovog kapaciteta da deluju kao antioksidansi, kao inhibitori tirozin kinaze, zatim kao inhibitori aromataze i kroz biosintezu estrogena (28).

Idealna hemoprevencija ne sme biti toksična niti imati prateće efekte. SERM ne inhibišu aktivnost 5 α -reduktaze. Hronična administracija SERMa ne dovodi do

ginekomastije ili patohistoloških promena Leydigovih odn. Sertoli ćelija. Testisi i nadbubrežne žlezde nisu uvećane. SERM ne utiču na sekreciju prolaktina, LH, FSH. Pokazuju minimalni efekat na reproduktivnu ulogu, a kako androgeni nisu poremećeni, libido i seksualna funkcija su očuvani. Toremifene ne izaziva DNK oštećenja i smanjuje incidencu PCa i redukuje HGPIIN u transgenih životinja (40). Raloxifene indukuje apoptozu u androgen nezavisnim ćelijskim linijama humanog PCa (10,41). Toremifene i Raloxifene ostvaruju svoje dejstvo preko ER i nisu zavisni od androgene stimulacije. SERM pokazuju i sledeća korisna dejstva: sprečavaju osteoporozu, snižavaju lipidni status, smanjuju stopu infarka miokarda i sprečavaju progresiju BHP (10).

SERM inhibišu metastaziranje karcinomskih ćelija, 3β Adiol može imati potencijalno antimetastatsko dejstvo u lečenju androgen nezavisnih PCa. Kompletno uklanjanje androgena kao DHT, nakon hemijske kastracije (34), koja podrazumeva davanje analoga GnRH, takođe uklanja zaštitno dejstvo 3β Adiola protiv migracije ćelija. Dejstvo 3β Adiola će biti sačuvano upotrebom klasičnih antagonista AR (33).

1.20. Lečenje

Lečenje se sprovodi u zavisnosti od stadijuma bolesti, tako se pacijenti sa A i B stadijumom podvrgavaju radikalnoj prostatektomiji ili zračnoj terapiji (39,51,56,57,61). Očekivano preživljavanje je 15 godina. Dok je za pacijente u C stadijumu metoda izbora zračenje, s obzirom da polovina njih ima okultne metastaze u pelvičnim limfnim čvorovima, i moguću dalju sistemsku diseminaciju. Za pacijente u D stadijumu glavni oblik terapije je hormonska, administracija antagonista hipofiznog LH i LHRH. Oba ova hormona deluju na smanjenje produkcije testosterona u testisu i predstavljaju farmakološku odn, hemijsku kastraciju. Cilj androgen ablacione terapije (AAT) je oduzimanje androgena (18,34,39,45,51,57,58,61,94). Međutim, svi pacijenti oduzimanjem androgena razvijaju relaps bolesti, koji je udružen sa progresijom i razvojem androgen nezavisnog stadijuma, a za koji još uvek nema adekvatne terapije (18).

1.20.1. Operativno lečenje

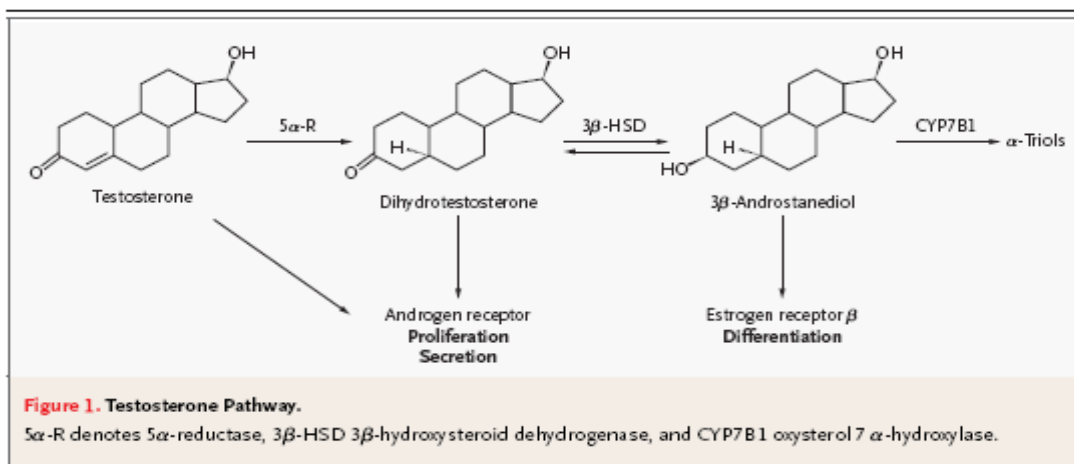
- Minimalno invazivni tretman predstavlja intersticijalna laserska koagulacija- ILC, mikrotalasna hipertermija i transuretralna iglena ablacija- TUNA
- Transuretralna icizija- TUIP
- TURP predstavlja ekstenzivnu resekciju prostate, ujedno je najčešća i najkomplikovanija operacija, primenjuje se u starijih pacijenata sa kontraindikacijama za otvorenu hirurgiju. Ovom metodom se dobija velika količina tkiva, tako da se ne preporučuje kod jako uvećanih prostata (55). Ređa suprapubična enukleacija hiperplastičnog tkiva je klasični hirurški tretman BHP (51,57,58). Ovo je brza i jednostavna procedura za uklanjanje srednjeg, hipertrofičnog, ali i lateralnih režnjeva (55).

1.20.2. Zračenje

Zračna terapija PCa je najčešći uzrok reaktivne atipije. Citološka atipija neneoplastičnih žlezda podrazumeva uvećana i hiperhromatična jedra, sa vidljivim jedarcima koja sa nalazi u 75% zračenih prostata (51,65). Arhitektura žlezda ostaje relativno očuvana, što pomaže u isključivanju karcinoma. Takođe se nalazi smanjenje žlezdano-stromalnog odnosa, atrofija, skvamozna metaplazija, 'basal cell' hiperplazija, stromalna fibroza i reakcija stranog tela. Citološka atipija je češća u intersticijalnoj radioterapiji (brahiterapija), nego u spoljašnjem zračenju. Citološka atipija može perzistirati u benignoj prostati, dugo godina nakon zračne terapije (51,65).

1.20.3. Hormonska terapija

Tumorske ćelije se lišavaju androgena: orhiektomijom, neutralizacijom estrogenima (16,51,55,58), ili administracijom lekova koji inhibišu 5α -reduktazu i dovode do smanjenja koncentracije DHT (55,64,95). Blokiranjem konverzije testosterona u DHT, visoko specifični antagonistički efekti androgena se registruju u prostati, ali ne i u drugim organima (64).



Slika 22: Metabolički put testosterona (44)

Testosteron iz Leydigovih ćelija se pretvara u 5-dihydrotestosteron (DHT) pomoću 5α -reduktaze (25,34,41). Njegov metabolit 5α -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol (3β Adiol) ima sve osobine prirodnog liganda za ER β . DHT je centar ravnoteže između AR i ER β (33,96). Finasteridi blokiranjem pretvaranja testosterona u DHT istovremeno inhibišu i proizvodnju 3β -Adiola i onemogućuju lokalno dejstvo estrogena (18,35,42,44) (slika 23). Finasteridi smanjenjem DHT u prostati, ublažavaju simptome BHP, smanjuju veličinu prostate i olakšavaju mokrenje (25,34,35,41,55,64,97). Finasteridi pokazuju mali efekat na ćelije PINa (45).

Dutasteridi su novootkrivene molekule koje inhibišu oba izoenzima 5α -reduktaze, dovode do veće supresije DHT i pokazuju bolji efekat lečenja BHP (35).

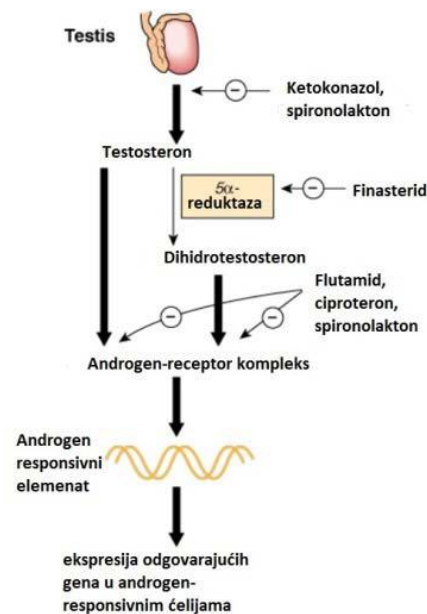
Tamoxifen i fitoestrogeni mogu delovati kao antioksidansi. ER β su uključeni u kontrolu antioksidant-regulišućih gena čiji produkti kontrolišu koncentraciju slobodnih radikala i reaktivnog kiseonika u ćeliji (5,12). Tamoxifen je nesteroidni estrogen (mešani agonista/antagonista), koristi se u terapiji PCa, ali se dobija slab terapijski odgovor (15).

Antagonisti estrogena nisu imali puno uspeha u terapiji PCa. Fulvestrant- ICI i tamoxifen su sprečavali rast u androgen nezavisnih ćelijskih kultura karcinoma PC-3 i DU-145. Ovi podaci sugerišu da je ER β uključen u regulaciju proliferacije androgen neosetljivih PCa (23).

DES je sintetički estrogen (agonista) sa citotoksičnim dejstvom na hormon senzitivne i nesenzitivne ćelijske linije PCa, što ukazuje na značaj ER u progresiji PCa. Estrogeni impulsi mogu biti alternativni mitogeni stimulus u androgen nezavisnih PCa i kao takvi predstavljati moguć terapijski način u stadijumu kada bolest postane refraktorna na terapiju (3,13,15,16,23,27).

Zbog toksičnosti estrogena (bolest koronarnih arterija i infarkt miokarda) i lošeg terapijskog odgovora napušteno je lečenje PCa estrogenima (4,18,51).

Od nedavno su u upotrebi LHRH agonisti (goserelin, leuprolide) ili antagonisti LHRH receptora (abarelix) (18,51).



Slika 23: Postoje 3 grupe antiandrogena:

1. inhibitori sinteze androgena (ketokonazol; deluje i na sintezu kortikosteroida);
2. antagonisti receptora za androgene (spironolakton, flutamid, ciproteron acetat);
3. inhibitori 5α -reduktaze (finasterid, koristi se kod BHP). Dodatno, analozi GnRH (gonadorelina) izazivaju hemijsku kastraciju supresijom pulsatilnog oslobađanja LH i FSH, čime se inhibira testikularna steroidogeneza. (Preuzeto iz supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/18470)

Danas se u terapiji PCa koriste antagonisti estrogena ICI 182,780 i SERM (selective estrogen receptor modulator) kao što je raloxifen (8,15). Kao antagonisti, oni se u određenim tkivima suprotstavljaju dejstvu estrogena, dok u drugima imitiraju dejstvo

endogenih estrogena (agonista) (8). Raloxifen vezivanjem za ER β povećava ekspresiju gena, dok vezivanjem za ER α dovodi do minimalne aktivacije (9).

Drugi mogući način lečenja PCa je inhibicija aromataze u prostati i samim tim blokiranje sinteze 17 β -estradiola (E2). Intraprostatična produkcija E2 može doprineti progresiji bolesti (12).

Paradoks je u tome da estrogeni sami ili u kombinaciji sa androgenima stimulišu rast adultne i fetalne prostate (10,28,35). Izlaganje trudnih miševa fiziološkim dozama E2 dovelo je do uvećanja prostate u njihovih odraslih potomaka, kao i proliferacije ćelija i uvećanje broja AR (13). Dok su visoke doze E2 u njihovih potomaka dovele do razvoja displazije. Farmakološke doze estrogena u fetalnoj i adultnoj prostati indukuju dramatičnu proliferaciju bazalnih ćelija u skvamoznu metaplaziju, kao i poremećaj u histogenezi strome (13,22,29).

DES u ćelijskim linijama PCa DU-145 dovodi do direktne inhibicije rasta karcinomskih ćelija prostate preko mitotskog aresta ili apoptoze. U kulturi PC-3 dejstvom antiestrogena ICI 182,780 ili Tamoxifena je nađeno smanjenje ćelijskog rasta. Izlaganje kulture PC-3 dejstvu E2 indukuje inhibiciju ćelijskog rasta (15).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je da pokaže, lokalizuje i okarakteriše ekspresiju (procenat pozitivnosti) ER β u prostatama sa očuvanom građom, odnosno benignom hiperplazijom, u prekanceroznim promenama ('low' i 'high-grade' PINu) i adenokarcinomu prostate sa različitim Gleason scorom, kao i da ukaže na fiziologiju koja je posredovana ovim receptorom.

3. HIPOTEZA

S obzirom na literaturne podatke o različitoj ekspresiji ER β u različitim morfološkim lezijama prostate, pretpostavka je da prekancerozne lezije u svojim različitim fazama evolucije ne koreliraju u potpunosti sa ekspresijom (procentom pozitivnosti) ER β . LGPIN pokazuje ekspresiju, dok u HGPINu nema ekspresije.

Takođe je pretpostavka da ekspresija (procenat pozitivnosti) ER β , postoji u većine srednje diferentovanih invazivnih karcinoma prostate, te da se ekspresija posmatranog receptora gubi sa porastom Gleason scora.

4. MATERIJAL I METODE

Analizirani materijal predstavlja 48 iglenih isečaka prostate koje su uzorkovane sekstant biopsijom odraslih osoba muškog pola, različite životne dobi, za koje je postojala sumnja na PCa, a na osnovu kliničko laboratorijskih parametara, u periodu od početka 2010. do kraja 2012. godine. Nijedan pacijent nije prethodno primio hormonalnu terapiju.

Istraživanje je izvedeno na rutinskim histološkim preparatima bioptičkog materijala koje se svakodnevno sprovode u Centru za patologiju i histologiju, Kliničkog centra Vojvodine.

Bioptički uzorci su sistematizovani i formirano je pet ispitivanih grupa (tabela 1):

- **K**- grupa sadrži 10 uzoraka prostate očuvane histološke građe, odn. sa znacima benigne hiperplazije i predstavlja kontrolnu grupu.

Ostale grupe su eksperimentalne (ogledne):

- **EP** - grupa sadrži 10 uzoraka prostate sa premalignim lezijama,
 - u podgrupi **-EPL** sa LGPIN lezijama je bilo 8 pacijenata i
 - 2 pacijenta u podgrupi **-EPH** sa HGPIN lezijama.
- **EC1** - grupa sadrži 8 uzoraka prostate sa dobro diferentovanim adenokarcinomom i Gleason scorom 2-4.
- **EC2** - grupa sadrži 10 uzoraka prostate sa srednje diferentovanim adenokarcinomom i Gleason scorom 5-7.
- **EC3** - grupa sadrži 10 uzoraka prostate sa loše diferentovanim adenokarcinomom i Gleason scorom 8-10.

Tabela 1. Struktura uzorka

		Iglena biopsija				
		BHP Grupa K	PIN Grupa EP	GS 2-4 Grupa EC1	GS 5-7 Grupa EC2	GS 8-10 Grupa EC3
Redni isečka	broj	1	11	21	29	39
		2	12	22	30	40
		3	13	23	31	41
		4	14	24	32	42
		5	15	25	33	43
		6	16	26	34	44
		7	17	27	35	45
		8	18	28	36	46
		9	19	/	37	47
		10	20	/	38	48
UKUPNO		10	10	8	10	10

Sve grupe su trebale biti podjednagog obima, ali zbog nedostatka materijala dobro diferentovanog karcinoma prostate u iglenim biopsijama u posmatranom periodu, ogleđna grupa, broj III -**EC1** morala je biti modifikovana.

Obzirom da pacijenti u posmatranoj dobi imaju donekle očuvanu građu prostate i da starenjem nastaju promene u smislu BHP, a promene nisu praćene displazijom epitela, tako je i ovakav histološki nalaz uzet za normalan, odnosno odgovarajuću građu, i formiranje kontrolne grupe -**K**.

Podaci o starosi pacijenta i serumskoj vrednosti PSA se nalaze na propratnom uputu za patohistološki pregled i predstavljaju standardni klinički dopis.

Dužina iglene biopsije je određena merenjem lenjirom samog isečka na predmetnom staklu.

Obzirom da je udeo gradusa 4 u Gleason scoru 7 od velikog prognostičkog značaja, Gleason score 7 je posebno izdvojen, kao umereno slabo diferentovani

adenokarcinom. Već samo prisustvo loše diferentovanog tumora sa Gleason gradusom 4 se smatra klinički značajnim karcinomom prostate i važan je deo u procesu donošenja kliničkih odluka. U većini Partinovich tablica, Gleason score 7 (3+4) i Gleason score 7 (4+3) se posmatraju odvojeno zbog različitog prognostičkog značaja. Veliko iskustvo je neophodno u dijagnostikovanju gradusa 4, a mnogi oblici se teško razlikuju od gradusa 3, koji predstavlja dobro diferentovani oblik tumora. Gleason gradus 4 je najčešći oblik loše diferentovanog adenokarcinoma prostate i njegovo razlikovanje od gradusa 3 je često najvažnija odluka u gradaciji tumora. Gleason score manji od 7, generalno ukazuje na manje agresivnu bolest i pacijent obično ima nepalpabilan tumor. Gleason score veći od 7 ukazuje na agresivnije ponašanje sa velikom verovatnoćom umiranja od ove bolesti.

4.1. Metod rada

Celokupan biopički materijal je fiksiran u 10% formalinu, kalupljen u parafinu i nakon sečenja mikrotomom na serijske rezove debljine 5 μ , bojen standardnom histološkom tehnikom sa hematoksilinom i eozinom (98). Analiza histoloških preparata je vršena na svetlosnom mikroskopu. Tokom histološke analize je određen histološki gradus karcinoma prostate i Gleason score, odnosno postavljena dijagnoza premaligne lezije ili benigne hiperplazije prostate.

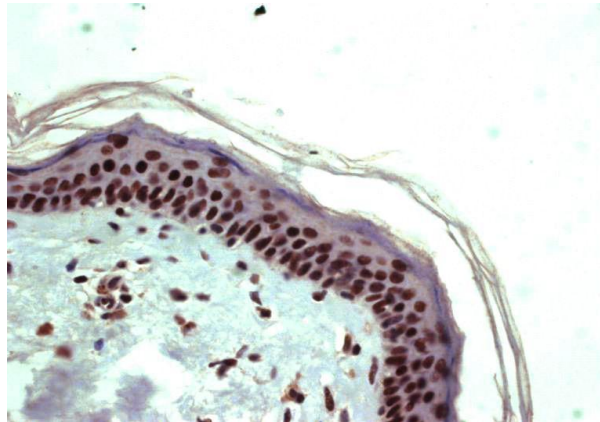
Sve histološke rezove je inicijalno pregledalo više patologa, a od strane ispitivača je ocenjeno postojanje dovoljne količine materijala za imunohistohemijsku analizu.

Nakon rutinske patohistološke dijagnostike, odabrani su uzorci i podeljeni prema navedenim grupama i dodatno je rađena imunohistohemijska analiza za prikazivanje estrogenog receptora β (liofilizirano mišije monoklonalno antitelo razblaženo 1:50-1:100 Novocastra).

Bojenje je izvršeno po uputstvu proizvođača. Rezovi debljine 5 μ su nakon deparafinizacije neutralisani sa 0,5% vodonik peroksid/metanolom, isprani u TBS pufetu pH 7,6. Zatim su inkubirani sa primarnim mišijim antihumanim antitelom NCL-ER β (clone number EMR02) koje se primarno koristi u analizi humanog materijala. Zatim se

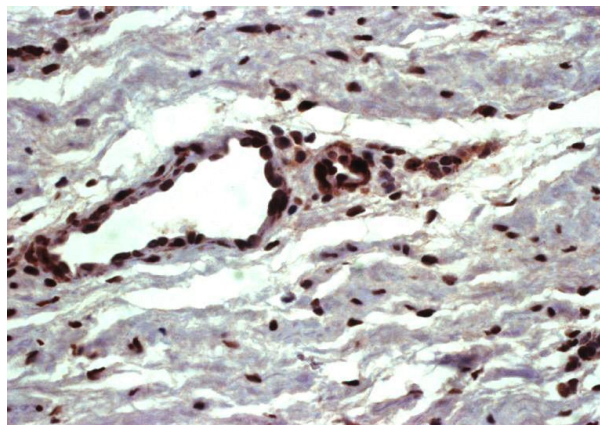
inspiraju u TBS puferu, inkubiraju sa ABC reagensom i DABom. Krajnji rezultat su braon obojena jedra ćelija pozitivna na ER β (99).

U analiziranju i ocenjivanju su korišćene i odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole: spoljašnja i unutrašnja. Za pozitivnu spoljašnju kontrolu je uzeta koža -jedra bazalnih ćelija epidermisa pokazuju pozitivnost na ER β (slika 24).



Slika 24. Pozitivna spoljašnja kontrola, koža (ER β , x400)

Negativnu kontrolu su predstavljali rezovi inkubirani umesto sa primarnim antitelom, sa neimunim serumom miša - koji ne pokazuju imunoreaktivnost na ER β . Pozitivna unutrašnja kontrola - su pozitivno obojena jedra stromalnih i mezenhimalnih ćelija (adipociti, endotel i glatke mišićne ćelije krvnih sudova) (slika 25). Negativna unutrašnja kontrola je isključivala uzorak iz istraživanja.



Slika 25. Pozitivna unutrašnja kontrola, BHP (ER β , x400)

4.2. Histološka analiza uzorka

Status (procenat obojenosti) ER β je određen na imunohistohemijskim rezovima reprezentativnog isečka gde su ćelije brojane ručno sa uvećanjem 400 i 630. Odvojeno se brojala epitelna i stromalna komponenta. U proseku je izbrojano oko 100 ćelija. Detaljno su tražene ćelije posebno tumorske i displastične sa bilo kakvom nukleranom pozitivnošću. Broj pozitivnih ćelija je procentualno izražen.

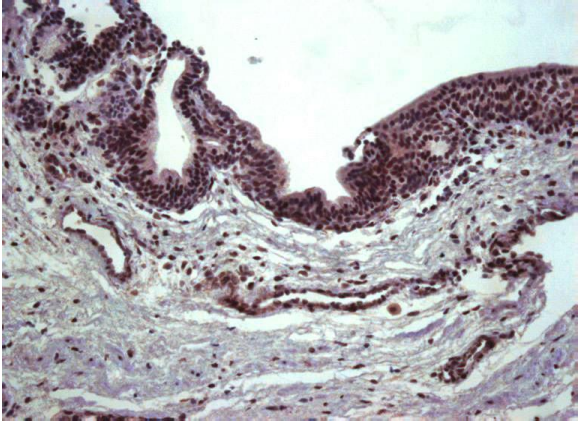
Ocena obojenosti predstavljena je procentualnim odnosom pozitivnih ćelija prema ukupnom broju ćelija unutar istog kompartmenta (stromalne, bazalne i sekretorne) u svakoj od ispitivanih grupa.

Procenta obojenosti ćelija na ER β je podeljena u šest kategorija i formirane su diskriminacione grupe:

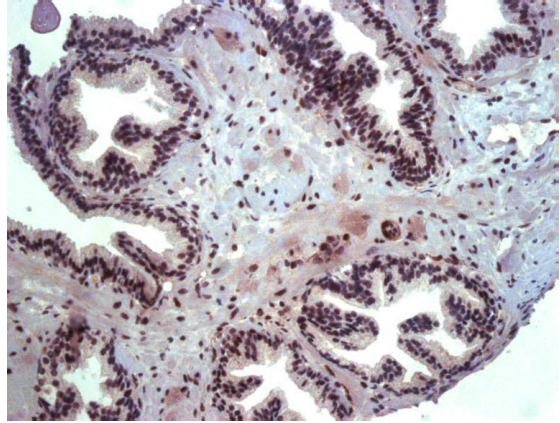
- **0** - nema bojenja, sve ćelije su negativne na bojenje ER β
- **1** - $\leq 1\%$ ćelija je pozitivno na bojenje ER β
- **2** - >1 do $\leq 10\%$ ćelija je pozitivno na bojenje ER β
- **3** - >10 do $\leq 33\%$ ćelija je pozitivno na bojenje ER β
- **4** - >33 do $\leq 66\%$ ćelija je pozitivno na bojenje ER β
- **5** - $>66\%$ ćelija je pozitivno na bojenje ER β

Obzirom da ne postoji standardna i usvojena šema za određivanje receptornog statusa u karcinomu prostate, kao model je korišćena procena receptornog statusa za karcinom dojke po Allred-u DC (100).

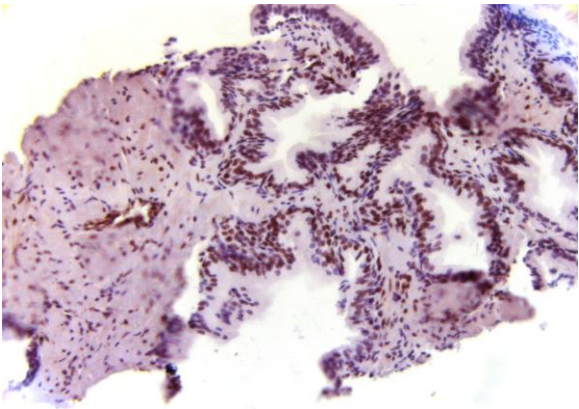
Način procene obojenosti ER β unutar određenog kompartmenta je prikazan na slikama 26-32.



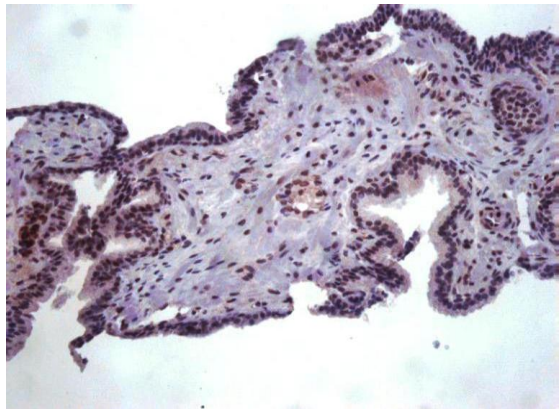
Slika 26.



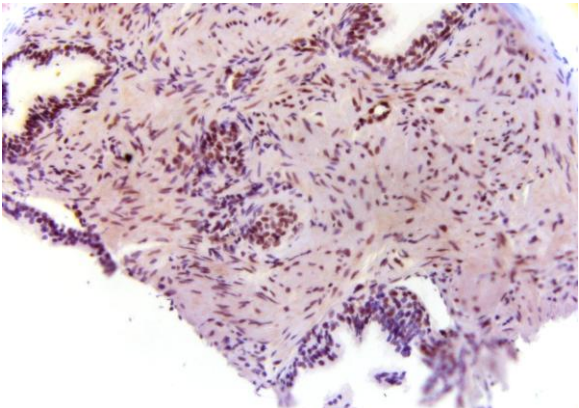
Slika 27.



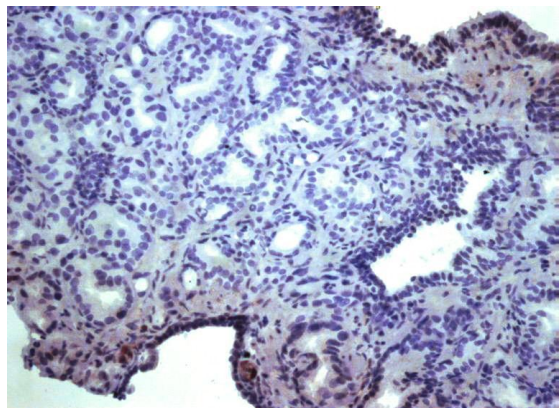
Slika 28.



Slika 29.



Slika 30.



Slika 31.

Slika 26. Histološki prikaz kontrolne biopsije prostate. Ocena 5 za bojenje bazalnih i sekretornih ćelija, ocena 4 za stromalne ćelije (ER β , x200)

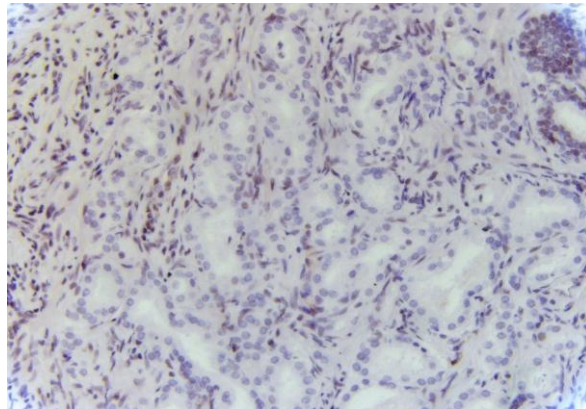
Slika 27. Histološki prikaz kontrolne biopsije prostate. Ocena 4 za bojenje stromalnih, bazalnih i sekretornih ćelija (ER β , x200)

Slika 28. Histološki prikaz premaligne lezije prostate. Ocena 4 za bojenje sekretornih ćelija, ocena 3 za stromalne i bazalne ćelije (ER β , x200)

Slika 29. Histološki prikaz kontrolne biopsije prostate. Ocena 3 za bojenje stromalnih, bazalnih i sekretornih ćelija (ER β , x200)

Slika 30. Histološki prikaz premaligne lezije HGPIN. Ocena 3 za bojenje stromalnih ćelija, ocena 2 za bazalne i sekretorne ćelije (ER β , x200)

Slika 31. Histološki prikaz dobro diferentovanog adenokarcinoma GS 4. Ocena 2 za bojenje stromalnih i bazalnih ćelija, ocena 1 za bojenje sekretornih ćelija (ER β , x200)



Slika 32. Histološki prikaz dobro diferentovanog adenokarcinoma GS 4. Ocena 3 za bojenje stromalnih ćelija. Ocena 1 za bojenje bazalnih ćelija i 0 za sekretorne ćelije (ER β , x200)

Standardni biopsijski protokol podrazumeva 12 bioptičkih uzoraka što je skoro udvostručilo broj novootkrivenih karcinoma. Tačnost iglene biopsije u odnosu na radikalnu prostatektomiju iznosi preko 85%.

Na ovako podeljenim i raspoređenim grupama analizirana je:

1. Starost ispitanika,
2. Procena vrednosti Gleason scora, i odnos prema starosti ispitanika,
3. Dužina bioptičkog isečka i poređenje sa vrednostima Gleason scora,
4. Procena vrednosti PSA, i komparacija sa starosti pacijenata i vrednostima Gleason scora,
5. Distribucija promena u odnosu na strane (levo/desno) u posmatranim grupama,
6. Ocena pozitivnosti ćelija na ER β i to: stromalnih, bazalnih i sekretornih,
7. Odnos procenta ER β pozitivnih ćelija prema Gleason scoru i prema vrednostima PSA,
8. Obzirom na specifičnost unutar grupe sa Gleason scorom 7, urađena je zasebna analiza iste,
9. Ocena pozitivnosti ER β u grupi premalignih lezija prostate, uz komparaciju sa starosti pacijenata i vrednostima PSA,
10. Ocena ER β pozitivnih ćelija u podgrupama EP grupe.

Dobijeni podaci su kompjuterski obrađeni u statističkom programu SPSS verzija 18.0. Korišćene su različite metode deskriptivne statistike (distribucija frekvencija, srednje vrednosti, standardna varijacija), a za utvrđivanje značajnosti razlika korišćene su sledeće statističke metode: Mann-Whitney test, t-test i jednosmerna analiza varijanse (ANOVA). Svi statistički testovi su prihvaćeni ukoliko je verovatnoća hipoteze bila jednaka ili manja od 5%.

5. REZULTATI I ANALIZA

5.1. Starost ispitanika

U grupi **K** starost pacijenata se kretala u rasponu od 53-72 godine. Prosečna starost iznosila je 66,40 godina, SD=5,76 godina.

U grupi **EP** prosečna starost ispitanika iznosila je 69,50 godina (SD=7,59 godina), a starost pacijenata se kretala u rasponu od 61-84 godine.

U grupi pacijenata obeleženoj sa **EC1**, starost se kretala u rasponu od 61-74 godine, dok je prosečna starost ispitanika iznosila 66,38 godina (SD=6,46 godina); u grupi **EC2** starost pacijenata se kretala od 63-82 godine, sa prosečnom vrednošću od 68,80 godina (SD=6,25 godina), dok je u **EC3** grupi prosečna starost pacijenata iznosila 67,90 godina (SD=7,05 godina) i kretala se u intervalu od 59-77 godina (tabela 2).

Tabela 2. Starost ispitanika u posmatranim grupama (u godinama)

Grupe	Prosečna starost	SD	min	max
K	66,40	5,76	53	72
EP	69,50	7,59	61	84
EC1	66,38	6,46	61	74
EC2	68,80	6,25	63	82
EC3	67,90	7,05	59	77

U eksperimentalnim grupama starost pacijenata kretala se u rasponu od 59-84 godine. Prosečna starost iznosila je 68,24 godina, SD=6,69 godina. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnoj starosti pacijenata kontrolne i eksperimentalne grupe ($t=-0,793$, $df=46$, $p=0,432$) (tabela 3).

Tabela 3. Prosečna starost ispitanika u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi

Grupe	N	Prosečna vrednost	SD	p
Kontrolna	10	66,40	5,76	0,432
Eksperimentalna	38	68,24	6,69	

Posmatrajući prosečnu starost u kontrolnoj grupi pacijenata u odnosu na svaku podgrupu ogledne grupe, došli smo do sledećih rezultata:

-nisu uočene statistički značajne razlike između prosečnih starosti u grupi **K** i grupi **EP** ($t=-1,029$, $df=18$, $p=0,317$)

-nisu uočene statistički značajne razlike između prosečnih starosti u grupi **K** i grupi **EC1** ($t=0,009$, $df=16$, $p=0,993$)

-nisu uočene statistički značajne razlike između prosečnih starosti u grupi **K** i grupi **EC2** ($t=-0,893$, $df=18$, $p=0,384$)

-nisu uočene statistički značajne razlike između prosečnih starosti u grupi **K** i grupi **EC3** ($t=-0,521$, $df=18$, $p=0,609$).

U daljim analizama starosne grupe su formirane na osnovu preporuka Svetske zdravstvene organizacije (101), i to na sledeći način: osobe mlađe od 65 godina i osobe od 65 i više godina starosti. Primenjujući taj kriterijum, uočeno je da su u grupi **K** dva pacijenta (20,0%) bila mlađa od 65 godina, a njih osmorica (80,0%) su bili u grupi starosti od 65 i više godina. Na osnovu iste podele, u oglednoj grupi trećina pacijenata (36,8%) je bila mlađa od 65 godina, dok je gotovo dve trećine njih (63,2%) imalo 65 i više godina starosti. Pripadnost starosnim kategorijama za svaku od grupa pacijenata (mlađi od 65 godina i osobe starosti 65 i više godina) prikazana je u tabeli 4.

Tabela 4. Starosne kategorije ispitanika u kontrolnoj i eksperimentalnim podgrupama

Grupe	Starost ispitanika		Ukupno (u %)
	Mlađi od 65 godina (u %)	65 i više godina (u %)	
Kontrolna grupa	20,0	80,0	100,0
Ogledna grupa	36,8	63,2	100,0
EP	30,0	70,0	100,0
EC1	50,0	50,0	100,0
EC2	33,3	66,7	100,0
EC3	40,0	60,0	100,0

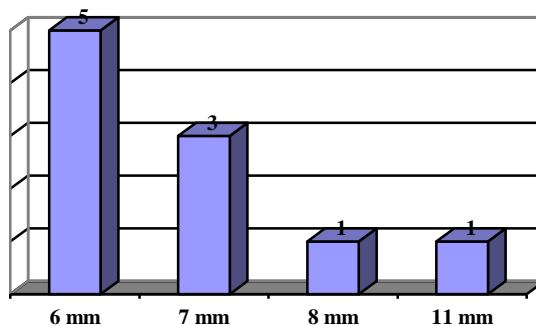
5.2. Dužina bioptičkog isečka i poređenje sa vrednostima Gleason scora

Tabela 5. Dužina bioptičkog isečka (u mm) u istraživanju

Grupe/ Dužina isečka	Uzorci									
K										
Pacijent	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
dužina	6	7	6	11	7	6	7	8	6	6
EP										
Pacijent	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
dužina	7	4	4	8	9	9	10	11	10	11
EC1										
Pacijent	21	22	23	24	25	26	27	28	/	/
dužina	9	3	12	9	6	7	3	7	/	/
EC2										
Pacijent	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
dužina	11	4	11	9	4	7	9	9	8	8
EC3										
Pacijent	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
dužina	6	7	3	6	6	6	7	5	11	10

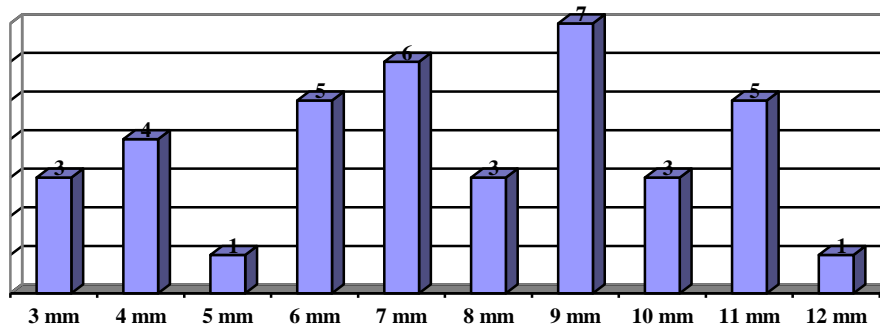
U grupi isečaka označenoj sa **K** prosečna dužina isečka iznosila je 7,00 mm (SD=1,56 cm) i kretala se u rasponu od 6-11 mm. Na grafikonu 1. prikazana je učestalost dužina bioptičkih uzoraka.

Grafikon 1. Dužina isečaka u grupi **K**



U eksperimentalnoj grupi (**EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3**) koja se sastojala od 38 isečaka, prosečna dužina iznosila je 7,53 mm (SD=2,58), a kretala se u rasponu od 3-12 mm. Na grafikonu 2. prikazana je učestalost dužine isečaka kod pacijenata iz eksperimentalne grupe.

Grafikon 2. Dužina isečaka (u mm) i broj isečaka iste dužine u celoj eksperimentalnoj grupi (koliko se neka dužina puta pojavljivala)



Nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnoj dužini bioptičkog isečka kod pacijenata iz grupe **K** i eksperimentalne grupe (**EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3**) ($t=-0,614$, $df=46$, $p=0,542$) (tabela 6).

Tabela 6. Prosečna dužina isečka (u mm) u grupi **K** i celoj eksperimentalnoj grupi

Grupe	N	Prosečna vrednost	SD	p
Kontrolna	10	7,00	1,56	0,542
Eksperimentalna	38	7,53	2,58	

Prosečna dužina isečka unutar podgrupa eksperimentalne grupe kretala se od 6,70 mm (SD=2,31 mm) u grupi **EC3**, pa do 8,30 mm (SD=2,58) u grupi **EP**. Prosečne vrednosti dužine bioptičkog isečka u grupama pacijenata sa nekim od tipova patološkog nalaza prikazane su u tabeli 7. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnim dužinama bioptičkog isečka među podgrupama **EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3** ($F=0,858$, $df=5$, $p=0,472$).

Tabela 7. Prosečna dužina isečaka kod ispitanika u eksperimentalnim grupama **EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3** (u mm)

Grupe	Prosečna dužina	SD	min	max
EP	8,30	2,58	4	11
EC1	7,00	3,07	3	12
EC2	8,00	2,45	4	11
EC3	6,70	2,31	3	11

Poređenjem prosečne dužine bioptičkog isečka sa vrednostima Gleason scora u eksperimentalnoj grupi, nisu utvrđene statistički značajne razlike među grupama pacijenata sa različitim vrednostima Gleason scora **EC1**, **EC2** i **EC3** ($F=0,492$, $df=2$, $p=0,617$) (tabela 8).

Tabela 8. Prosečne dužine bioptičkog materijala (u mm) u ogleđnim grupama **EC1**, **EC2** i **EC3** pacijenata u odnosu na vrednosti Gleason scora

Grupe	N	Prosečna dužina	SD	Min	Max	p
EC1	7	7,00	3,32	3	12	0,617
EC2	10	7,90	2,47	4	11	
EC3	11	6,82	2,23	3	11	
UKUPNO	28	7,74	2,57	3	12	

5.3. Procena vrednosti Gleason scora i odnos prema starosti ispitanika

U grupama **K** i **EP** se po definiciji ne nalaze maligne ćelije, pa se iz tog razloga nije mogla odrediti ni vrednost Gleason scora (tabela 9).

Tabela 9. Vrednosti Gleason scora i Gleason gradusa u posmatranih pacijenata

Grupe/ gradusi	Uzorci									
K										
Pacijent	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Score	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Gradusi	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
EP										
Pacijent	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Score	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Gradusi	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
EC1									/	/
Pacijent	21	22	23	24	25	26	27	28		
Score	4	4	4	4	4	4	4	4	/	/
Gradusi	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	/	/
EC2										
Pacijent	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
Score	5	7	7	7	6	7	5	5	5	5
Gradusi	2+3	3+4	3+4	4+3	3+3	4+3	2+3	3+2	3+2	3+2
EC3										
Pacijent	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Score	9	9	8	9	9	9	8	9	9	9
Gradusi	4+5	4+5	4+4	4+5	4+5	4+5	4+4	4+5	4+5	4+5

U grupi **EC1** prosečna vrednost Gleason scora iznosila je 4,00 (SD=0,00); u grupi **EC2**, prosečna vrednost Gleason scora iznosila je 5,59 (SD=1,14), dok je u grupi **EC3**, prosečna vrednost Gleason scora bila 8,80 (SD=0,42) (tabela 10).

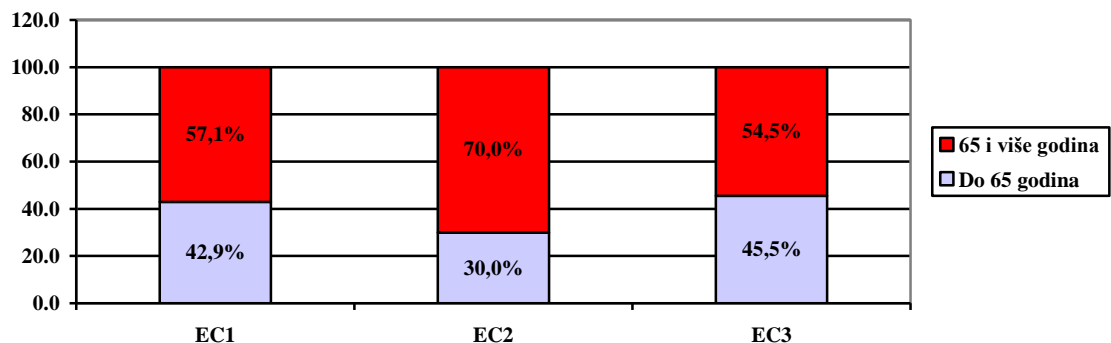
Tabela 10. Prosečne vrednosti Gleason scora u podgrupama sa različitim rasponom Gleason scora.

Grupe	N	Prosečna vrednost GS	SD	Min	Max	p
EC1	8	4,00	0,00	4	4	0,000
EC2	10	5,59	1,14	5	7	
EC3	10	8,80	0,42	8	9	
UKUPNO	28	6,39	2,08	4	9	

Prosečna vrednost Gleason scora u celoj eksperimentalnoj grupi iznosila je 6,39 (SD=2,08). Prosečne vrednosti Gleason scora u podgrupama eksperimentalne grupe međusobno su se statistički značajno razlikovale ($F=126,403$, $p=0,000$) (tabela 10).

Starost ispitanika nije imala statistički značajan uticaj na vrednosti Gleason scora (Mann Whitney $Z=-0,251$, $p=0,802$) (grafikon 3).

Grafikon 3. Vrednosti Gleason scora kod pacijenata sa malignim lezijama u odnosu na njihovu starost



Prosečne vrednosti Gleason scora kod osoba mlađih od 65 godina i kod pacijenata starosti 65 i više godina nisu se statistički značajno razlikovale ($t=-0,779$, $df=26$, $p=0,432$) (tabela 11).

Tabela 11. Prosečne vrednosti Gleason scora posmatrane u odnosu na starost ispitanika

Starost	N	Prosečna vrednost Gleason scora	SD	p
Do 65 godina	11	6,00	2,24	0,432
65 i više godina	17	6,65	2,00	

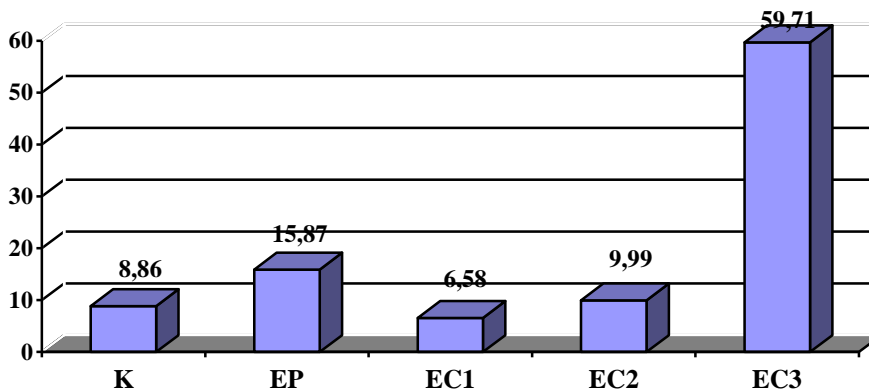
5.4. Procena vrednosti PSA u ispitivanim grupama i poređenje sa starosti ispitanika i vrednostima Gleason scora

U grupi **K** prosečna vrednost PSA iznosila je 8,86 ng/ml (SD=2,54 ng/ml), a kretala se u rasponu od 5,83 -12,55 ng/ml.

U grupi **EP**, prosečna vrednost PSA iznosila je 15,87 ng/ml (SD=9,47 ng/ml), a kretala se u rasponu od 4,77 -27,80 ng/ml.

U grupi **EC1** prosečna vrednost PSA iznosila je 6,58 ng/ml (SD=0,77 ng/ml) i kretala se u rasponu 5,76 -7,21 ng/ml; u grupi **EC2** prosečna vrednost PSA je iznosila 9,99 ng/ml (SD=5,31 ng/ml) i kretala se od 1,80 -16,50 ng/ml, dok je u grupi **EC3** prosečna vrednost PSA bila 59,71 ng/ml (SD=40,14 ng/ml), a kretala se od 2,40 -100,00 ng/ml (grafikon 4).

Grafikon 4. Prosečna vrednost PSA u posmatranim grupama (u ng/ml)



Jedan pacijent na pratećem uputu za patohistološku analizu nije imao naznačenu vrednost PSA u serumu. Prosečna vrednost PSA u celoj eksperimentalnoj grupi (**EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3**) bila je 24,37 ng/ml (SD=30,30 ng/ml) i kretala se u rasponu od 1,80 ng/ml-100,00 ng/ml. Nije bilo statistički značajnih razlika u prosečnim vrednostima PSA kontrolne - **K** i cele eksperimentalne grupe ($t=-1,604$, $df=45$, $p=0,116$) (tabela 12).

Tabela 12. Prosečne vrednosti PSA u kontrolnoj i eksperimentalnoj grupi (u ng/ml)

Grupa	N	Prosečna vrednost PSA	SD	p
Kontrolna	10	8,86	2,54	0,116
Eksperimentalna	37	24,37	30,30	

Posmatrajući prosečne vrednosti PSA kontrolne grupe, kao i podgrupe eksperimentalne grupe (**EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3**), utvrđene su statistički značajne razlike ($F=13,026$, $p=0,000$). Najniža prosečna vrednost PSA izmerena je u grupi **EC1**, a najviša u grupi **EC3** (tabela 13).

Tabela 13. Prosečne vrednosti PSA u posmatranim grupama uzorka

Podgrupa uzorka	N	Prosečna vrednost PSA	SD	Min	Max	p
K	10	8,87	2,51	5,83	12,55	0,000
EP	10	15,88	9,48	4,77	27,80	
EC1	7	6,59	0,77	5,76	7,21	
EC2	10	9,99	5,31	1,80	16,50	
EC3	10	59,71	40,15	2,40	100,00	
UKUPNO	47	21,07	27,59	1,80	100,00	

Prilikom poređenja prosečne vrednosti PSA u podgrupama eksperimentalne grupe, došlo se do sledećih rezultata:

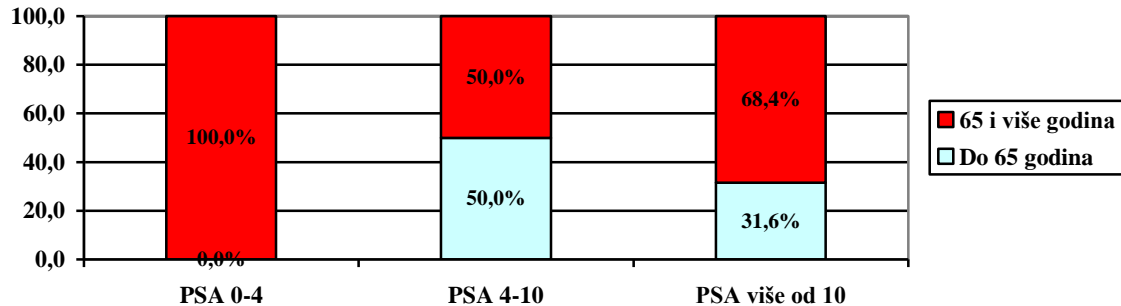
-razlika u prosečnoj vrednosti PSA između **EP** i **EC1** bila je statistički značajna ($t=-2,562$, $df=15$, $p=0,022$)

-razlika u prosečnoj vrednosti PSA između **EC1** i **EC2** nije bila statistički značajna ($t=-1,668$, $df=15$, $p=0,116$)

-razlika u prosečnoj vrednosti PSA između **EC2** i **EC3** bila je statistički značajna ($t=-3,883$, $df=18$, $p=0,001$).

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u intervalima vrednosti PSA (0-4 ng/ml, 4-10 ng/ml, >10 ng/ml) u odnosu na starosnu grupu ispitanika iz eksperimentalnih grupa (Mann Whitney $Z=-0,495$, $p=0,676$) (grafikon 5).

Grafikon 5. Vrednost PSA (u ng/ml) u odnosu na starost ispitanika u eksperimentalnoj grupi pacijenata (**EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3**)



Prosečne vrednosti PSA kod pacijenata u eksperimentalnoj grupi nisu se statistički značajno razlikovale kod osoba do 65 godina starosti, odnosno osoba 65 i više godina ($t=-0,011$, $df=35$, $p=0,991$) (tabela 14).

Tabela 14. Prosečne vrednosti PSA u ogleđnoj grupi u odnosu na starost ispitanika (u ng/ml)

Starost	N	Prosečna vrednost PSA	SD	p
Do 65 godina	14	24,30	32,67	0,991
65 i više godina	23	24,42	29,53	

Dobijene vrednosti Gleason scora po ispitivanim grupama koreliraju sa dobijenim prosečnim vrednostima PSA kod pacijenata u eksperimentalnoj grupi ($F=13,414$, $df=2$, $p=0,000$). Najniže prosečne vrednosti PSA zapažaju se u grupi pacijenata sa vrednostima **EC1**, dok sa lošijom diferencijacijom tumora rastu i prosečne vrednosti PSA (tabela 15).

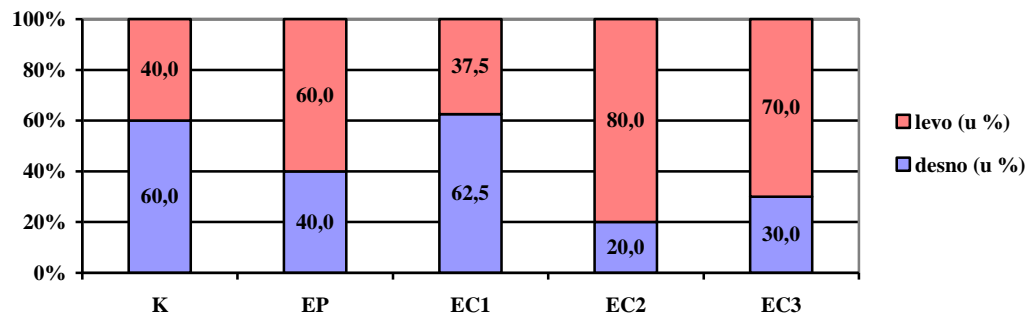
Tabela 15. Prosečne vrednosti PSA u odnosu na vrednosti Gleason scora kod pacijenata u podgrupama **EC1**, **EC2** i **EC3** (u ng/ml)

Gleason score	N	Prosečna vrednost PSA	SD	Min	Max	p
EC1	7	6,58	0,77	5,76	7,21	0,000
EC2	10	9,99	5,31	1,80	16,50	
EC3	10	59,72	40,55	2,40	100,0	
UKUPNO	27	27,52	34,68	1,80	100,0	

5.5. Distribucija promena u odnosu na strane u posmatranim grupama

U grupi **K** 60% slučajeva je imalo promene u desnoj polovini prostate, dok su u levoj polovini nađene u 40%. U grupi **EP** promene su nađene u 40% slučajeva sa desne strane, dok su sa leve strane nađene u 60%. U grupi **EC1** promene su nađene u dve trećine sa desne strane 62,5% i samo jedna trećina je nađena sa leve 37,5%; u grupi **EC2** promene su desno nađene u svega 20,0%, dok su u 80,0% slučajeva nađene levo, dok je u grupi **EC3** 30% promena nađeno desno, a 40% levo (grafikon 6). Posmatrajući celu eksperimentalnu grupu, promene se nalaze u 36,8% sa desne strane, odnosno 63,2% sa leve strane.

Grafikon 6. Lokalizacija promene u posmatranim grupama



5.6. Ocena pozitivnosti ćelija na ER β

5.6.1. Procenat obojenosti ER β u stromalnim ćelijama

Određivanje statusa ER β je izvršeno prema kriterijumima datim u poglavlju Materijal i metode.

U grupi **K** polovina bioptiranih stromalnih ćelija pokazivala je ocenu obojenosti 4 (34-66%), po jedna petina ćelija imala je ocenu obojenosti 2 (2-10%), odnosno 3 (11-33%), dok je kod desetine ćelija ocena obojenosti ER β iznosila 1 ($\leq 1\%$).

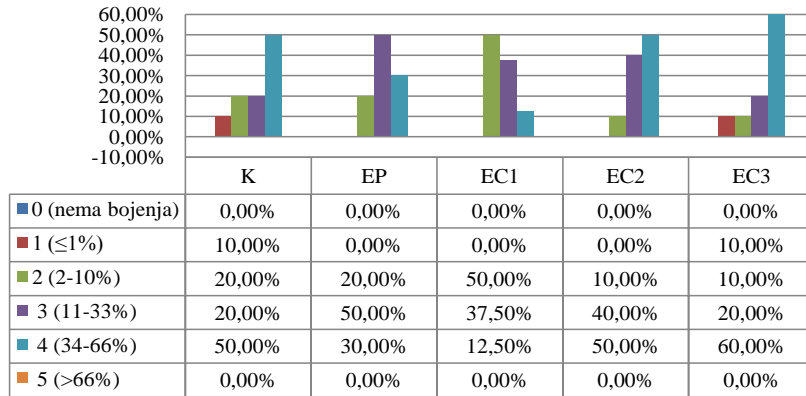
U grupi označenoj kao **EP** polovina uzorka je imala 3 kao ocenu obojenosti ER β u stromalnim ćelijama (11-33%), 30% uzorka ocenu 4 (34-66%), a petina je imala ocenu 2 (2-10%).

U grupi **EC1** u polovini uzorka ocena obojenosti ER β u stromalnim ćelijama iznosila je 2 (2-10%), u nešto više od jedne trećine (37,5%) ocena je bila 3 (11-33%), a kod 12,5% stromalnih ćelija ocena je bila 4 (34-66%).

U grupi **EC2** zapaženo je da u polovini stromalnih ćelija je ocena obojenosti ER β bila 4 (34-66%), u 40% ćelija ocena je bila 3 (11-33%), a u 10% stromalnih ćelija iznosila je 2 (2-10%).

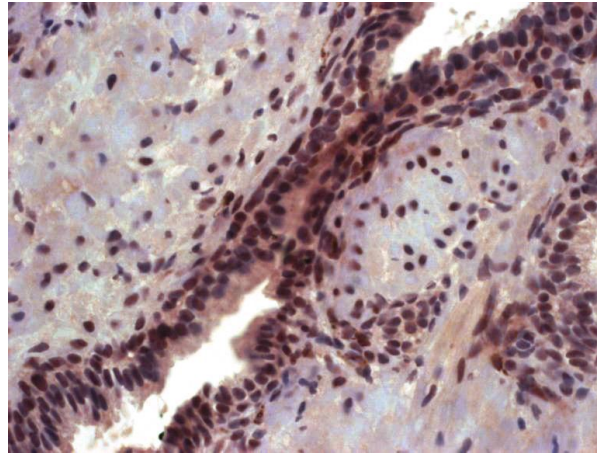
U grupi **EC3** uočena je najbolja obojenosti stromalnih ćelija: u 60% ćelija uzorka ocena obojenosti je iznosila 4 (34-66%), u 20% stromalnih ćelija ocena je bila 3 (11-33%), dok je u po 10% stromalnih ćelija ona iznosila 2 (2-10%), odnosno 1 ($\leq 1\%$) (grafikon 7).

Grafikon 7. Komparativna evaluacija stepena obojenosti ER β u stromalnim ćelijama u kontrolnoj grupi i eksperimentalnim grupama



5.6.2. Procenat obojenosti ER β u bazalnim ćelijama

Ocena obojenosti ER β u bazalnim ćelijama u **K** grupi bila je najbolja u odnosu na sve ostale grupe: u čak 40% ćelija iznosila je 5 (>66%) (slika 33).

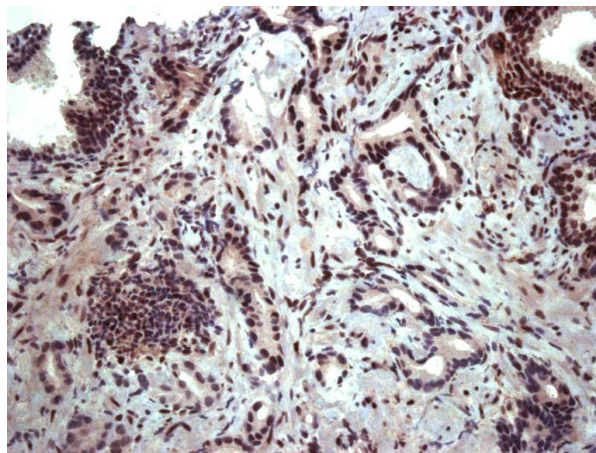


Slika 33. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u kontrolnoj grupi. Najveći stepen obojenosti je bio u bazalnim, a zatim u sekretornim ćelijama (ER β , x400)

U grupi označenoj sa **EP** polovina ćelija pokazivala je ocenu obojenosti 3 (11-33%), 20% je imalo ocenu 2 (2-10%), dok je po 10% ćelija imalo ocenu obojenosti 1 (\leq 1%), odnosno 4 (34-66%) i 5 (>66%).

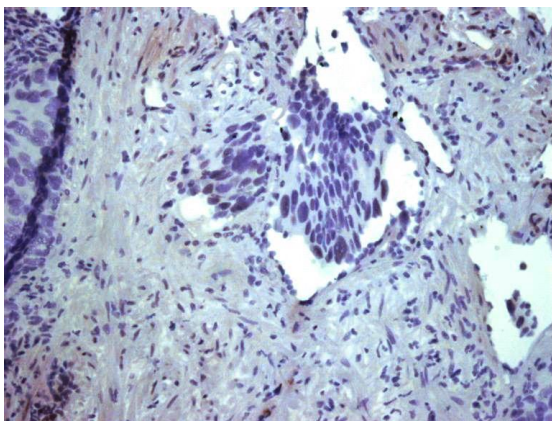
U grupi **EC1**, u nešto manje od dve trećine uzorka (62,5%) ocena obojenosti ER β u bazalnim ćelijama iznosila je 2 (2-10%), u 25% bazalnih ćelija ocena obojenosti je bila 3 (11-33%), a kod 12,5% bazalnih ćelija ocena je bila 1 (\leq 1%).

U grupi **EC2** u 50,0% bazalnih ćelija ocena obojenosti ER β je bila 4 (34-66%), u gotovo trećine ćelija ocena obojenosti je iznosila 2 (2-10%), a u 20% ćelija je bila 3 (11-33%) (slika 34).

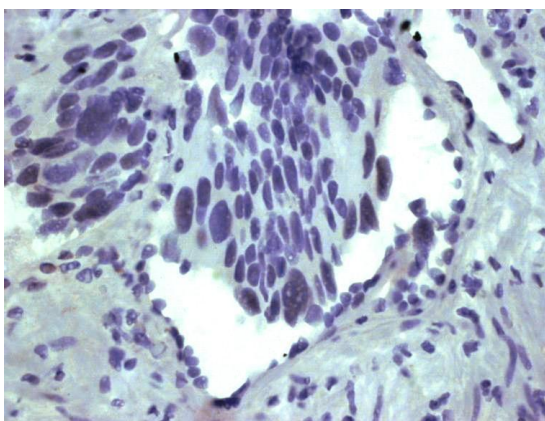


Slika 34. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u srednje diferentovanog tumora GS5 - EC2. Ocena je 4 u stromalnim i bazalnim, dok je u sekretornim ćelijama 3 (ER β , x200)

U grupi EC3 u 40% bazalnih ćelija ocena obojenosti je bila 4 (34-66%), u 20% ćelija ocena obojenosti ER β iznosila je 5 (>66%), odnosno 3 (11-33%), dok je u po 10% bazalnih ćelija ocena bila 1 (\leq 1%), odnosno nije bilo obojenosti, ocena 0. (Slika 35, Slika 36). (Grafikon 8).



Slika 35.

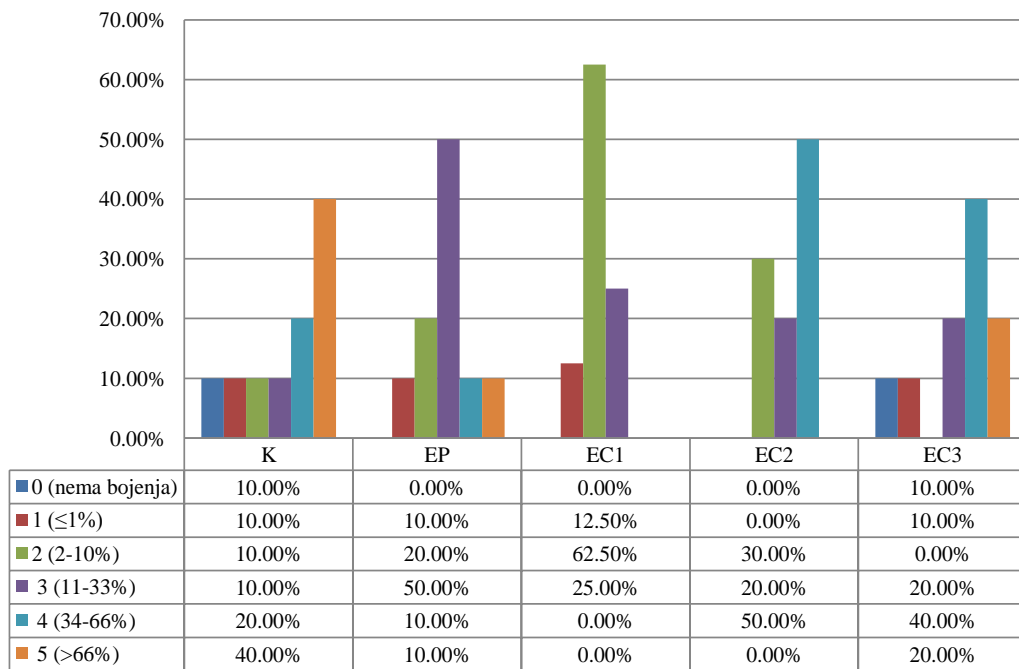


Slika 36.

Slika 35. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u loše diferentovanog tumora GS9 - EC3. (ER β , x200) Ocena obojenosti je bila 1 u stromalnim, 0 u bazalnim i u sekretornim ćelijama

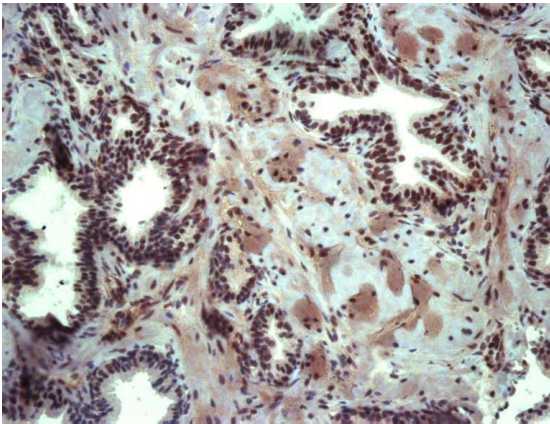
Slika 36. Histološki prikaz stepena obojenosti ERβ u loše diferentovanog tumora GS 9 - EC3. (ERβ, x400) Na slici je prikazano smanjenje ekspresije ERβ u malignim acinusima prostate. Lošije diferentovani adenokarcinomi su pokazali pad ekspresije ERβ u bazalnim i u sekretornim ćelijama

Grafikon 8. Komparativna evaluacija stepena obojenosti ERβ u bazalnim ćelijama u kontrolnoj grupi i eksperimentalnim grupama

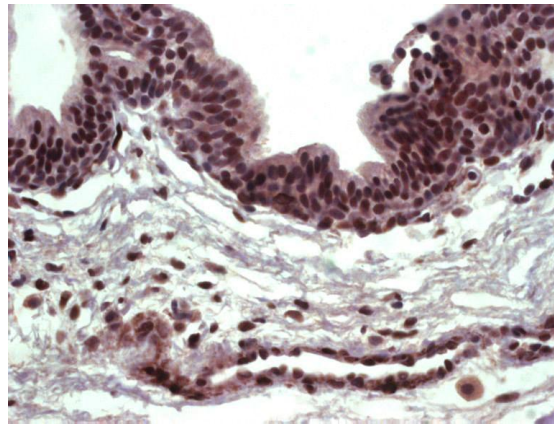


5.6.3. Procenat obojenosti ER β u sekretornim ćelijama

Ocena obojenosti ER β u sekretornim ćelijama u grupi **K**, kao i kod bazalnih ćelija, bila je najbolja u odnosu na sve ostale grupe: u 40% ćelija ocena obojenosti iznosila je 5 (>66%); u po 20% ćelija ocena je bila 3 (11-33%), odnosno 1 (\leq 1%), u 10% sekretornih ćelija iznosila je 4 (34-66%), a 10% ćelija se nije bojilo, ocena 0. (slika 37, slika 38).



Slika 37.



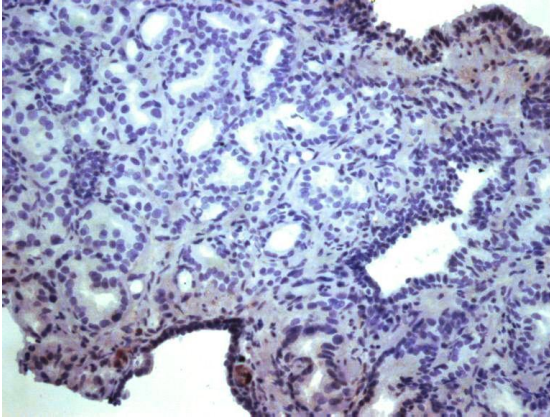
Slika 38.

Slika 37. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u kontrolnoj grupi. Ocena obojenosti ER β je bila 5 u bazalnim i sekretornim ćelijama i 4 u stromalnim (ER β , x200)

Slika 38. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u kontrolnoj grupi. Ocena obojenosti je bila 4 u bazalnim i sekretornim ćelijama i 3 u stromalnim (ER β , x400)

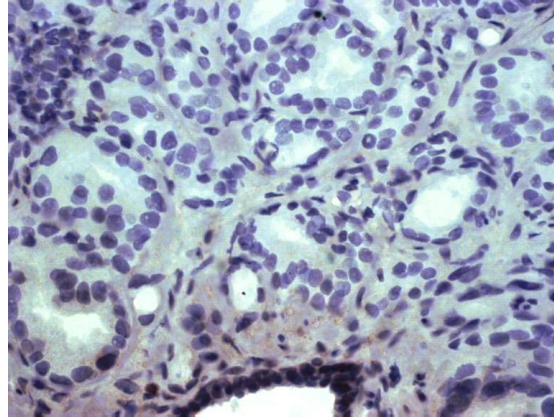
U grupi **EP** u najvećem broju sekretornih ćelija uzoraka (40%) ocena obojenosti ER β iznosila je 4 (34-66%), u 20% ćelija obojenost je bila 5 (>66%), kao i 2 (2-10%), a u po 10% sekretornih ćelija ocena obojenosti ER β iznosila je 3 (11-33%), to jest 1 (\leq 1%).

U grupi **EC1** u trećine sekretornih ćelija ocena obojenosti ER β je bila 2 (2-10%), u isto toliko 1 (\leq 1%), a u po 12,5% ocena obojenosti je bila 3 (11-33%), to jest 4 (34-66%). (slika 39, slika 40)



Slika 39.

Slika 39. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u dobro diferentovanog tumora GS4 – EC1. Stromalne, bazalne i sekretorne ćelije su bile negativne (ER β , x200)

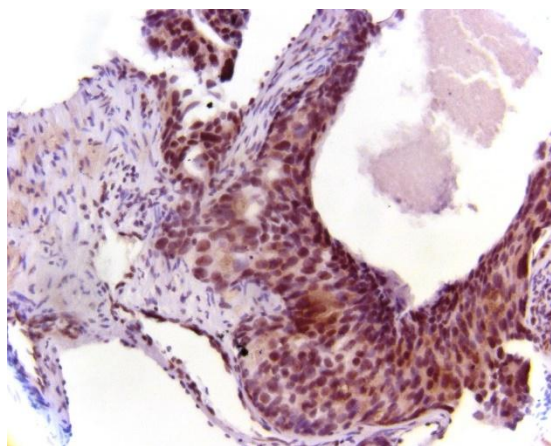


Slika 40.

Slika 40. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u dobro diferentovanog tumora GS4 – EC1. Slika prikazuje najslabiju ekspresiju ER β u epitelnim ćelijama (ER β , x400)

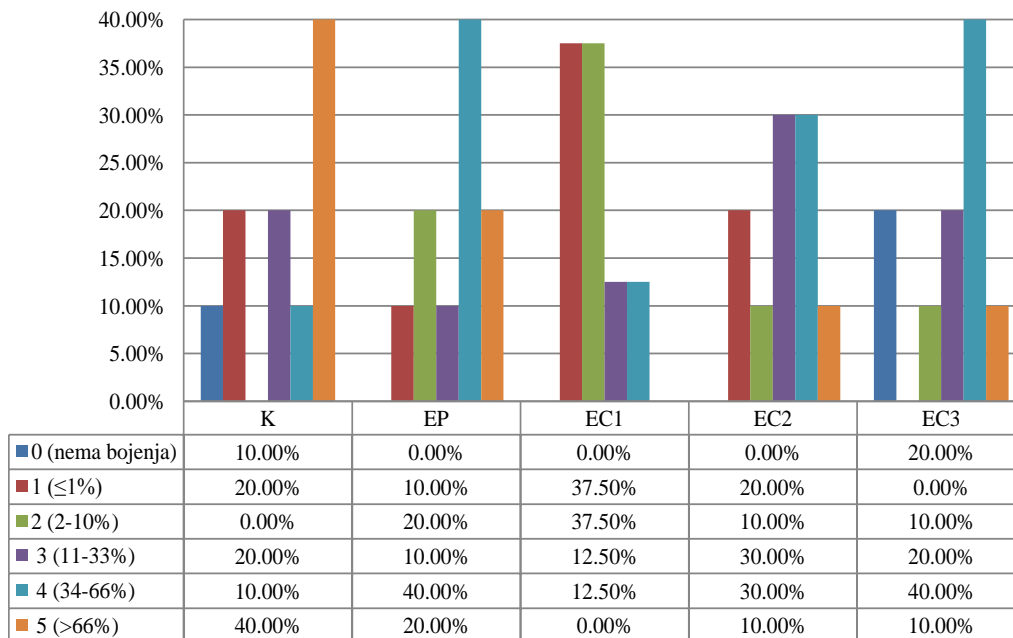
U grupi označenoj sa **EC2** u po 30% sekretornih ćelija je ocena obojenosti bila 3 (11-33%), odnosno 4 (34-66%), u 20% sekretornih ćelija ocena obojenosti ER β iznosila je 1 ($\leq 1\%$); u 10,0% ćelija ocena je bila 2 (2-10%), a kod istog broja (10,0%) je bila 5 ($>66\%$).

U grupi **EC3** u 40% sekretornih ćelija ocena obojenosti je bila 4 (34-66%), u 20% ćelija obojenost ER β je iznosila 3 (11-33%); takođe se uočava da se 20% sekretornih ćelija nije bojilo, ocena 0; dok je u po 10% sekretornih ćelija ocena bila 5 ($>66\%$), odnosno 2 (2-10%) (slika 41) (grafikon 9).



Slika 41. Histološki prikaz stepena obojenosti ER β u loše diferentovanog tumora GS9 – EC3. Slika prikazuje jasnu ekspresiju ER β u epitelnim ćelijama (ER β , x200)

Grafikon 9. Komparativna evaluacija ocene obojenosti ER β u sekretornim ćelijama u kontrolnoj grupi i eksperimentalnim grupama



5.7. Odnos procenta ER β pozitivnih ćelija prema Gleason scoru i vrednostima PSA

U daljim analizama posmatrali smo prosečne vrednosti Gleason scora i PSA u grupama ćelija sa različitom ocenom obojenosti, a u cilju utvrđivanja statistički značajnih razlika između podgrupa **EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3** unutar eksperimentalne grupe.

5.7.1. Odnos obojenosti stromalnih ćelija prema Gleason scoru i PSA

Posmatrajući pacijente sa malignim promenama prostate utvrdili smo da ocena obojenosti stromalnih ćelija ne pokazuje statistički značajnu povezanost sa prosečnim vrednostima Gleason scora unutar eksperimentalnih grupa: **EC1**, **EC2** i **EC3** ($F=2,410$, $df=3$, $p=0,092$) (tabela 16). Takođe, nije utvrđena ni značajna povezanost sa prosečnim vrednostima PSA ($F=2,390$, $df=3$, $p=0,086$) (tabela 17).

Tabela 16. Ocena obojenosti stromalnih ćelija u grupi pacijenata sa malignim lezijama (**EC1**, **EC2** i **EC3**) u odnosu na prosečne vrednosti Gleason scora

Ocena obojenosti	N	Prosečna vrednost GS	SD	Min	Max	p
1 ($\leq 1\%$)	1	9,00	/	9	9	0,092
2 (2-10%)	6	5,00	2,00	4	9	
3 (11-33%)	9	6,00	2,06	4	9	
4 (34-66%)	12	7,17	1,80	4	9	
UKUPNO	28	6,39	2,08	4	9	

Tabela 17. Ocena obojenosti stromalnih ćelija u eksperimentalnoj grupi pacijenata (**EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3**) u odnosu na prosečne vrednosti PSA (u ng/ml)

Ocena obojenosti	N	Prosečna vrednost PSA	SD	Min	Max	p
1 ($\leq 1\%$)	1	100,0	/	100,0	100,0	0,086
2 (2-10%)	8	21,36	32,22	5,76	100,0	
3 (11-33%)	13	23,35	28,43	4,77	100,0	
4 (34-66%)	15	21,83	26,98	1,80	100,0	
UKUPNO	37	24,87	30,30	1,80	100,0	

5.7.2. Odnos obojenosti bazalnih ćelija prema Gleason scoru i PSA

Ocena pozitivnosti bazalnih ćelija u grupama pacijenata **EC1**, **EC2** i **EC3** pacijenata pokazuje povezanost sa različitim prosečnim vrednostima Gleason scora ($F=4,779$, $df=5$, $p=0,004$). Uočava se da je najviši score po Gleasonu kod ćelija koje se nisu bojile, ocena 0, dok se najniža prosečna vrednost Gleason scora uočava u grupi ćelija koje su se bojile sa ocenom 2 (2-10%) (tabela 18).

Tabela 18. Ocena obojenosti bazalnih ćelija u podgrupama pacijenata **EC1**, **EC2** i **EC3** u odnosu na prosečne vrednosti Gleason scora

Ocena obojenosti	N	Prosečna vrednost GS	SD	Min	Max	p
0	1	9,00	/	9	9	0,004
1 ($\leq 1\%$)	2	6,50	3,54	4	9	
2 (2-10%)	8	4,38	0,52	4	5	
3 (11-33%)	6	6,17	2,32	4	9	
4 (34-66%)	9	7,56	1,33	5	9	
5 ($> 66\%$)	2	8,50	0,71	8	9	
UKUPNO	28	6,39	2,08	4	9	

Kao i u slučaju stromalnih ćelija, prosečne vrednosti PSA se nisu razlikovale u odnosu na ocenu obojenosti bazalnih ćelija u eksperimentalnoj grupi pacijenata, odnosno pacijenata u podgrupama **EP**, **EC1**, **EC2** i **EC3** ($F=2,302$, $df=5$, $p=0,069$) (tabela 19).

Tabela 19. Ocena obojenosti bazalnih ćelija u eksperimentalnoj grupi pacijenata u odnosu na prosečne vrednosti PSA (u ng/ml)

Ocena obojenosti	N	Prosečna vrednost PSA	SD	Min	Max	p
0	1	100,0	/	100,0	100,0	0,069
1 ($\leq 1\%$)	3	41,43	51,12	5,76	100,0	
2 (2-10%)	10	9,21	6,57	5,76	100,0	
3 (11-33%)	10	24,83	27,90	5,67	100,0	
4 (34-66%)	10	25,09	32,18	1,80	100,0	
5 ($>66\%$)	3	28,75	32,92	4,77	66,29	
UKUPNO	37	24,87	30,30	1,80	100,0	

5.7.3. Odnos obojenosti sekretornih ćelija prema Gleason scoru i PSA

Značajna povezanost ocene obojenosti sekretornih ćelija u podgrupama **EC1**, **EC2** i **EC3** eksperimentalne grupe pacijenata uočena je i u odnosu na razlike u prosečnim vrednostima Gleason scora ($F=3,095$, $df=5$, $p=0,029$). Najviša prosečna vrednost Gleason scora zapažena je kod ćelija koje se nisu bojile, ocena 0; dok se najniža prosečna vrednost Gleason scora uočava u grupi ćelija koje su se bojile sa ocenom 1 ($\leq 1\%$) (tabela 20).

Tabela 20. Ocena pozitivnosti sekretornih ćelija u grupama **EC1**, **EC2** i **EC3** pacijenata u odnosu na prosečne vrednosti Gleason scora svake od grupa

Ocena obojenosti	N	Prosečna vrednost GS	SD	Min	Max	p
0	2	9,00	/	9	9	0,029
1 ($\leq 1\%$)	5	4,40	0,55	4	5	
2 (2-10%)	5	5,20	2,17	4	9	
3 (11-33%)	6	7,00	1,90	4	9	
4 (34-66%)	8	7,00	2,07	4	9	
5 ($>66\%$)	2	7,50	0,71	7	8	
UKUPNO	28	6,39	2,08	4	9	

Ocena obojenosti sekretornih ćelija pokazuje statistički značajnu povezanost sa prosečnim vrednostima PSA u isečcima prostata u eksperimentalnoj grupi ($F=4,367$, $df=5$, $p=0,004$). U sekretornim ćelijama koje se nisu bojile zapažaju se i najveće vrednosti PSA, dok su najniže prosečne vrednosti PSA bile u grupi ćelija koje su se bojile sa ocenom 1 ($\leq 1\%$), odnosno u grupi ćelija gde je ocena pozitivnosti bila 5 ($>66\%$) (tabela 21).

Tabela 21. Ocena obojenosti sekretornih ćelija u eksperimentalnoj grupi pacijenata u odnosu na prosečne vrednosti PSA (u ng/ml)

Ocena obojenosti	N	Prosečna vrednost PSA	SD	Min	Max	p
0	2	100,0	0,00	100,0	100,0	0,004
1 ($\leq 1\%$)	6	8,84	4,84	5,76	18,53	
2 (2-10%)	6	26,27	37,02	7,21	100,0	
3 (11-33%)	7	25,66	33,83	1,80	100,0	
4 (34-66%)	12	22,23	22,29	2,40	66,29	
5 ($> 66\%$)	4	11,20	5,58	4,77	16,50	
UKUPNO	37	24,37	30,30	1,80	100,0	

5.8. Analiza podgrupe sa Gleason scorom 7

U ogednoj grupi **EC3**, kod četiri uzorka (14,29%) utvrđena je vrednost Gleason scora 7 (tabela 22). Unutar ove grupe analizirali smo GS (3+4 ili 4+3), starost pacijenata, PSA, ocenu pozitivnosti stromalnih, bazalnih i sekretornih ćelija.

Tabela 22. Struktura pacijenata sa Gleason scorom 7

Pacijent	Tip lezije	Gleason score	Zbir
30	GS 5-7	7	3+4
31	GS 5-7	7	3+4
32	GS 5-7	7	4+3
34	GS 5-7	7	4+3

Na osnovu preporuka stručne literature i savremenih stavova o ovom entitetu, grupu smo posmatrali kao dve podgrupe: prvu su činila dva pacijenata sa boljom

prognozom i zbirom 3+4, a drugu dva pacijenta sa lošijom prognozom, odnosno zbirom 4+3. Oba pacijenta sa zbirom 3+4 imali su po 72 godine (SD=0,00 godina), dok je grupa osoba sa zbirom 4+3 imala prosečnu starost 71,50 godina (SD=3,54). Njihova starosna struktura prikazana je u tabeli 23.

Tabela 23. Starosna struktura podgrupe pacijenata sa Gleason scorom 7

Zbir Gleason scora	N	Prosečna starost	SD	Min	Max
3+4	2	72,00	0,00	72	72
4+3	2	71,50	3,54	69	74

Vrednost PSA u grupi sa zbirom 3+4 kod oba pacijenta iznosila je 16,50 ng/ml, dok je u grupi pacijenata sa zbirom 4+3 kod jednog pacijenta izmereno je 1,80 ng/ml, a kod drugog 14,42 ng/ml. Prosečne vrednosti PSA u ove dve podgrupe prikazane su u tabeli 24.

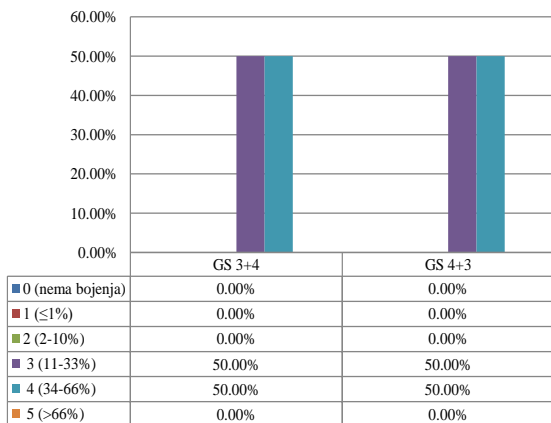
Tabela 24. Vrednosti PSA (u ng/ml) u podgrupama pacijenata sa Gleason scorom 7

Zbir Gleason scora	N	Prosečna vrednost PSA	SD	Min	Max
3+4	2	16,50	0,00	16,50	16,50
4+3	2	8,11	8,92	1,80	14,42

Što se tiče lokalizacije patoloških promena, u grupi pacijenata sa zbirom 3+4, kod oba pacijenta promene su bile u levom lobusu. U grupi pacijenata sa zbirom 4+3, jedan pacijent je imao promene u desnom, a jedan u levom lobusu.

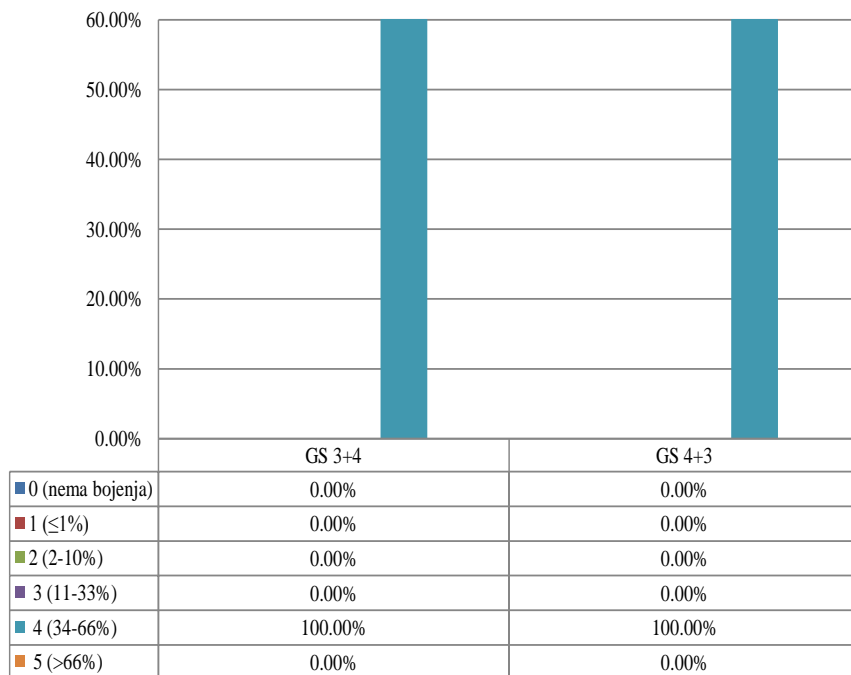
Analizirajući ocenu obojenosti stromalnih ćelija u ove dve podgrupe, utvrđeno je da je u obe podgrupe po jedan pacijent imao ocenu 3 (11-33%), a po jedan ocenu 4 (34-66%) (grafikon 10).

Grafikon 10. Ocena obojenosti ER β u stromalnim ćelijama u podgrupama pacijenata sa različitim zbirovima unutar Gleason scora 7



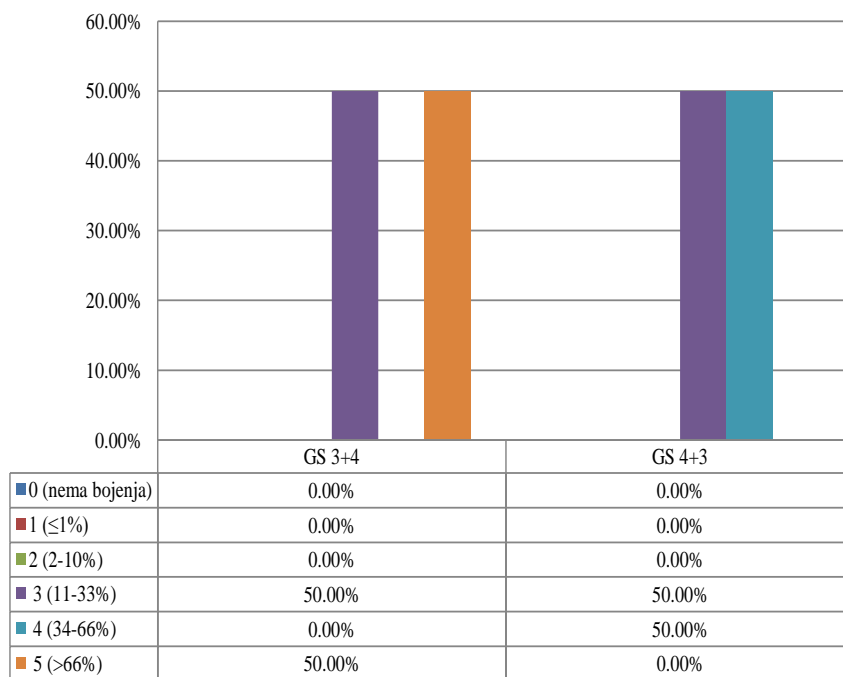
Ocena obojenosti ER β u bazalnim ćelijama u grupi isečaka pacijenata sa zbirom 3+4 kod oba pacijenta iznosila je 4 (34-66%). U grupi pacijenata sa zbirom 4+3 takođe su utvrđene ocene 4 (34-66%) kod oba pacijenta (grafikon 11).

Grafikon 11. Ocena obojenosti ER β u bazalnim ćelijama u podgrupama pacijenata sa različitim zbirovima unutar Gleason scora 7



Ocena obojenosti ER β u sekretornim ćelijama u grupi isečaka prostata sa zbirom od 3+4 kod jednog pacijenta iznosila je 3 (11-33%) i kod jednog pacijenta 5 (>66%). Kod pacijenata sa zbirom 4+3, kao i kod bazalnih ćelija, jedan pacijent je imao ocenu obojenosti sekretornih ćelija 3 (11-33%) i jedan ocenu 4 (34-66%) (grafikon 12).

Grafikon 12. Ocena obojenosti ER β u sekretornim ćelijama u podgrupama pacijenata sa različitim zbirovima unutar Gleason scora 7



Usled malog broja slučajeva nije rađena statistička analiza uticaja ocene obojenosti stromalnih, bazalnih i sekretornih ćelija unutar ovog entiteta na prosečne vrednosti Gleason scora, odnosno na prosečne vrednosti PSA.

5.9. Premaligne lezije prostate uz komparaciju sa starosti pacijenata i vrednostima PSA

U grupi **EP** bilo je osam pacijenata sa LGPIN lezijama -**EPL** i dva pacijenta sa HGPIN lezijama -**EPH**.

Prosečna starost u grupi **EP** iznosila je 69,50 godina (SD=7,59), a kretala se u rasponu od 61-84 godine. Prosečna starost pacijenata u podgrupama **EPL** i **EPH** prikazana je u tabeli 25. Nije utvrđena statistički značajna razlika u prosečnoj starosti pacijenata u podgrupama **EPL** i **EPH** ($t=-0,930$, $df=8$, $p=0,379$).

Tabela 25. Starosna struktura podgrupe pacijenata sa premalignim lezijama

Tip premaligne lezije	N	Prosečna starost	SD	Min	Max
EPL	8	68,38	8,18	61	84
EPH	2	74	0,00	74	74

U podgrupi **EPL** tri pacijenta su bila mlađa od 65 godina starosti, a njih petorica su bila stara 65 ili više godina. Oba pacijenta iz **EPH** podgrupe su bila u starosnoj grupi 65 i više godina.

5.9.1. Vrednosti PSA u ispitivanim podgrupama premalignih lezija

Prosečna vrednost PSA u grupi **EP** iznosila je 15,87 ng/ml (SD=9,47 ng/ml), a kretala se u rasponu od 4,77-27,80 ng/ml. Prosečne vrednosti PSA u **EPL** i **EPH** podgrupama prikazane su u tabeli 26. Razlika u prosečnim vrednostima PSA izmerenim u podgrupama **EPL** i **EPH** bila je statistički značajna ($t=-2,504$, $df=8$, $p=0,037$). (Tabela 26)

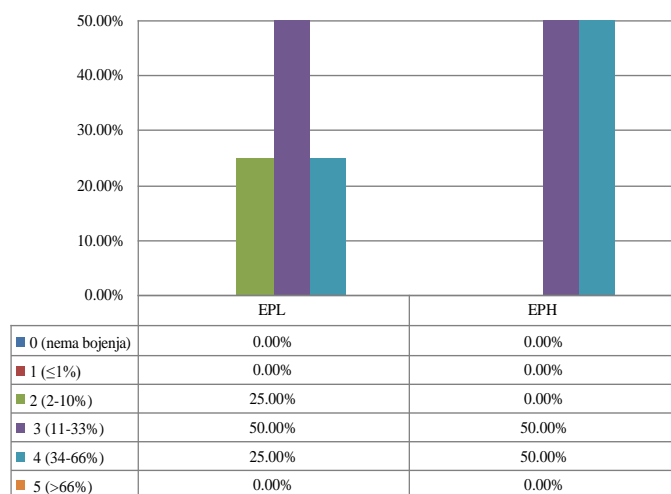
Tabela 26. Vrednosti PSA (u ng/ml) u podgrupama **EP** grupe

Tip premaligne lezije	N	Prosečna vrednost PSA	SD	Min	Max
EPL	8	12,89	8,05	4,77	17,80
EPH	2	27,80	0,00	27,80	27,80

5.9.2. Ocena ER β pozitivnih ćelija u podgrupama EP grupe

Analizirajući ocenu obojenosti stromalnih ćelija utvrđeno je da su u **EPL** podgrupi dva pacijenta imala ocenu 2 (2-10%), četvorica ocenu 3 (11-33%) i dvojica ocenu 4 (34-66%), a u podgrupi **EPH** jedan je imao ocenu obojenosti 3 (11-33%), a jedan ocenu 4 (34-66%) (grafikon 13).

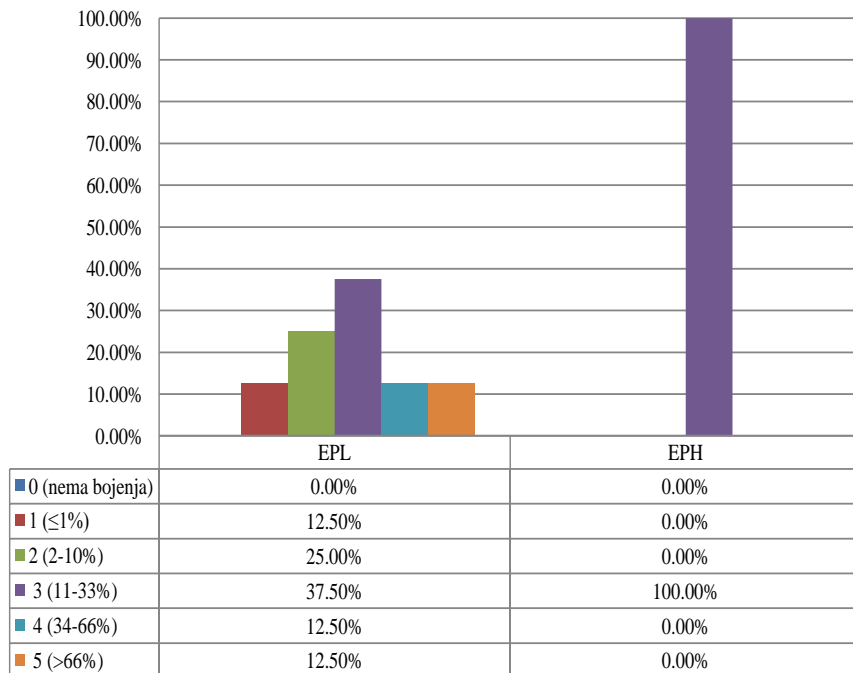
Grafikon 13. Ocena obojenosti ER β u stromalnim ćelijama u podgrupama **EP** grupe



Posmatrajući ocenu obojenosti ER β u bazalnim ćelijama **EPL** podgrupe, uočeno je da je kod jednog ocena obojenosti iznosila 1 (manje ili 1%), kod dvojice 2 (2-10%),

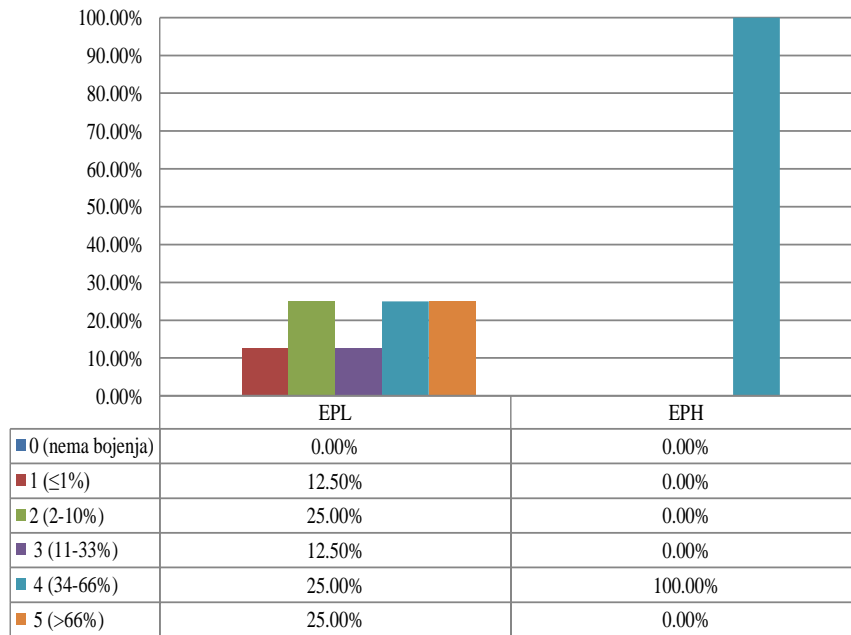
trojica su imala ocenu 3 (11-33%) i po jedan pacijent ocenu 4 (34-66%), odnosno 5 (>66%). Oba pacijenta sa **EPH** imala su ocenu obojenosti ER β u bazalnim ćelijama 3 (11-33%) (grafikon 14).

Grafikon 14. Ocena obojenosti ER β u bazalnim ćelijama u podgrupama **EP** grupe



Kod pacijenata iz **EPL** podgrupe ocena obojenosti sekretornih ćelija pokazivala je sledeću distribuciju: jedan pacijent imao je ocenu 1 (≤1%), dvojica ocenu 2 (2-10%), jedan ocenu 3 (11-33%), dva pacijenta 4 (34-66%) i dvojica ocenu 5 (>66%). Oba pacijenta iz **EPH** podgrupe imala su u sekretornim ćelijama ocenu obojenosti 4 (34-66%) (grafikon 15).

Grafikon 15. Ocena obojenosti ER β u sekretornim ćelijama u podgrupama EP grupe



6. DISKUSIJA

Adenokarcinom prostate je najčešći maligni tumor u muškaraca i drugi po stopi smrtnosti (10,11,31,32,34,39,41,42,51,54,55,57,58,61,65). Adenokarcinom prostate predstavlja najčešći primarni tumor prostate (98%) (54,57,61,65) od kojeg oboljevaju stariji muškarci, a incidenca raste posle 50. godine života (32,34,39,41,42,47,57,58,61).

Faktori okoline imaju značajan uticaj u nastanku bolesti (10,32,34,39,41,46,54,57,61,65), kao i ishrana životinjskim mastima i crvenim mesom (32,43,40,41,46,51,54,57,58). Oštećenje epitelnih ćelija nastaje hemijskom i fizičkom traumom, hormonalno i prehrambenim karcinogenima, a dovodi do autoimune reakcije u prostati. Hronična upala koju izazivaju infektivni agensi ili faktori okoline, ima ulogu u tumorogenezi i udružena je sa fokalnom atrofijom epitela PA, ali i njegovom proliferacijom u sklopu PIA (46,54). HGPIIN i intraduktalni karcinom mogu da se razviju direktno iz atrofičnog epitela (32,41,54,55,57,67). Prostate odraslih često sadrže infiltrat T limfocita, koji su aktivirani u BHP i PCa, gde produkuju velike količine IL17 (54).

I pored svega navedenog uzrok nastanka PCa je nepoznat, a u centru istraživanja su endokrini uticaji (11,39,41,55,57,61). U urinu je registrovan povišen odnos estrogena prema testosteronu (57). Podaci brojnih autora govore u prilog androgene zavisnosti karcinoma prostate (39,41,55). Drugi autori su našli povišen nivo estrogena udružen sa razvojem PCa (3,4,8,11,13,22,23,29,37,46,54). Estrogeni utiču na normalan rast i razvoj prostate: indirektno kroz sekreciju prolaktina u hipofizi i direkto preko ER α - u stromi i ER β - prisutnog u epitelu (25,34,54). ER β može imati zaštitnu ulogu na epitel prostate od genetskog oštećenja, izazvanog inflamatornim ćelijama i karcinogenima (12).

PCa je obično heterogen i multifokalan sa različitim kliničkim i morfološkim manifestacijama (39,46,51,53). Bazalne ili proliferišuće ćelije su meta delovanja u prostatičnoj karcinogenezi. Izražena heterogenost je karakteristika HGPIIN i PCa, tako da brojni fokusi ovih lezija nastaju nezavisno unutar iste prostate (46,53,55). Genetske sličnosti sugerišu da evolucija i klonalna ekspanzija HGPIINa ili drugih prekursornih lezija može objasniti multifokalnu etiologiju karcinoma (53,55). Teorija 'multistep'

transformacije objašnjava morfološki kontinuum transformacije PINa u PCa (40,48,55,61,66).

Histogeneza PCa je jasnija od samog uzroka. Savremene studije postavljaju fokuse intraduktalnog displastičnog epitela odn. HGPIN kao premalignu promenu, koja desetak godina ranije prethodi razvoju PCa (40,43,46,57,67). PIN podrazumeva smanjen broj bazalnih ćelija unutar duktusa i citološku atipiju luminalnih ćelija. HGPIN je važan marker u iglenoj biopsiji prostate, jer se u 'follow-up' biopsijama obično pronađe PCa (40,46,57,61).

U 70% slučajeva PCa nastaje u perifernoj zoni prostate i raste multicentrično (39,51,54,56,57,58,61). Histološki, u PCa nedostaju bazalne ćelije, a prisutna je invazija strome malignim acinusima (46). Karakteristična subkapsularna lokalizacija tumora dovodi do invazije same kapsule (39,51,57,61), sa perineuralnom propagacijom i zahvatanjem susednih tkiva (vesiculae seminalis) (39,51,57,61). Regionalne metastaze se vide u limfnim čvorovima: obturatorne jame, ilijačnim i periaortnim, dok su udaljene metastaze rezultat limfogenog, odnosno venskog širenja u pluća, a koštane metastaze su obično osteoplastičnog tipa (39,51,57,61).

Klinička slika PCa u početku je asimptomatska, a vremenom se razvija otežano mokrenje, nokturia, smanjenje mlaza, akutna retencija urina, zatim hematurija, inkontinencija, bol, anemija i gubitak na težini. U klinički uznapredovalom stadijumu bolesti na DRE se nalazi čvršći nodul, induracija i nepravilni oblik prostate (39,55). Klinički oblik tumora izaziva lokalne simptome i znake. Za razliku od njega, okultni karcinom dovodi do udaljenih metastaza, dok sam primarni tumor ostaje neotkriven (39,51,61). Latentni karcinom se slučajno otkrije u isečcima resekcije kod BHP (57).

6.1. Analiza ekspresije ER β

ER β je steroidni receptor prisutan u sloju bazalnih ćelija, koje su androgen-nezavisne, predstavljaju matične ćelije i učestvuju u proliferaciji. Sa druge strane, sekretorne ćelije sa visokom ekspresijom ER β su diferentovane ćelije, zavisne od androgena, ali bez

proliferativnog kapaciteta (24). Estrogeni hormoni su uključeni u indukciju, ali i prevenciju PCa (22,24,28,36). ER β je fiziološki regulator epitelnog rasta i diferencijacije u prostati (5,11,12,15,21,22,23,24,27) i kao takav se nalazi u epitelu NP, BHP i PCa. Neke studije su pokazale smanjenje njegove ekspresije u PCa, kao i ponovno javljanje u metastazama (4,31). Značaj ovog nalaza još uvek nije jasan, kao što ni uloga ER β u patologiji i fiziologiji prostate, po mišljenju većine autora, još uvek nije definisana.

U više od 95% očuvanih prostata (NP) Horvath je našla pozitivnost ER β u bazalnim i u sekretornim epitelnim ćelijama. Stroma je bila pozitivna u 20-60% slučajeva. Leav je našao lokalizaciju ER β pretežno u bazalnim ćelijama NP, u manjem stepenu u stromalnim ćelijama, i povremeno u sekretornim ćelijama. Neki od autora nisu našli prisutnost ER β u sekretornom epitelu prostate (4,27), dok drugi autori jesu (6,10,23,24).

Fixemer je u grupi BHP našao ekspresiju ER β u stromalnim ćelijama, koje su ujedno služile i kao unutrašnja pozitivna kontrola. Sekretorne luminalne ćelije su bile jače pozitivne nego bazalne. Apoptotične ćelije u lumenima žlezda su bile negativne na ER β . Horvath je u BHP našla ekspresiju ER β u 24% u epitelnim ćelijama i 21% u stromalnim ćelijama. Signoretti i Leav su našli da je ER β manjim delom lokalizovan u stromalnim ćelijama (4,27).

Rezultati našeg istraživanja se slažu sa navedenim konstatacijama i najvećom ekspresijom (procentom obojenosti) ER β u kontrolnoj grupi pacijenata (BHP) i to na sekretornim ćelijama, zatim u bazalnim, i najmanje u stromalnim ćelijama.

U normalnim uslovima sekretorne luminalne ćelije imaju visoku ekspresiju ER β , koju gube transformacijom u HGPIIN (24,29). U grupi premalignih lezija, u 23% slučajeva sa HGPIINom Fixemer je našao jaku ekspresiju ER β , u 64% je našao smanjenje ekspresije u bazalnim i sekretornim ćelijama. U 13% slučajeva epitel je ostao neobojen (24).

Leav je konstatovao lokalizaciju ER β u jedrima bazalnih i displastičnih sekretornih ćelija 'low' i 'moderate grade' PINa. Zatim se ER β gubi i nestaje u displastičnim sekretornim ćelijama HGPIINa, a prisutan je tek na nivou rezidualnih bazalnih ćelija. Smanjenje ekspresije govori u prilog antiproliferativnog dejstva ER β na epitel prostate, koji je delimično izgubljen u HGPIINu (24,29).

McNeal 1995 je našao da se proliferacija odvija u 83% bazalnih ćelija benignog epitela NP, dok samo 7% bazalnih ćelija pokazuje proliferaciju u displastičnim lezijama (PIN). Korenite promene se dešavaju u ekspresiji ER β u HGPINu. Glavno obeležje HGPINa je prebacivanje proliferativne aktivnosti na drugi odeljak, odnosno sa matičnih-bazalnih ćelija na sekretorne-luminalne ćelije (24,29,40,67).

Prisutnost ER β u sekretornim ćelijama LGPINa može predstavljati neuspešni pokušaj zaustavljanja rasta ovih ćelija, a gubitak ovog receptora u HGPINu može značiti kontinuirani gubitak inhibicije proliferacije u ovim prekursorim lezijama, sto doprinosi inicijalnoj fazi karcinogeneze (4,23,27,31). Fixemer je registrovao ER β u sekretornim ćelijama netretiranih tumora (primarnih i metastatskih) i delimični nedostatak u HGPINu i androgen nezavisnim stadijumima bolesti. Hiperplastične promene prostate su pokazale smanjenu ekspresiju ER β u epitelnim ćelijama (24).

Ekspresija (procenat obojenosti) ER β u bazalnim ćelijama u grupi **-K** je bila najbolja od sveukupnog posmatranog materijala. U grupi isečaka sa najlošije diferentovanim tumorima **-EC3**, u 40% bazalnih ćelija procenat obojenosti bio je 4 (34-66%), a u 20% ćelija je bio 5 (>66%).

I drugi autori su našli izraženu ekspresiju ER β u bazalnim ćelijama acinusa NP, a smanjenu u PCa (3,4,12,15,26,27,29,34). Ova subpopulacija ćelija ima različite biološke osobine od sekretornih epitelih ćelija, naročito u sposobnosti da proliferišu (16,43,48) i sintetišu steroide, kao i ključnu ulogu u karcinogenezi prostate. Gubitak ekspresije ER β u bazalnim ćelijama koji vidamo u neoplastičnoj progresiji, može predstavljati oštećenje funkcije receptora.

Analizom naših rezultata potvrđeno je smanjenje bojenja ER β u sekretornim i bazalnim ćelijama u grupi **-EP** (PIN), u odnosu na grupu **-K**. U grupi **-EP**, najveće bojenje ER β je nađeno u sekretornim, pa u stromalnim i najmanje u bazalnim ćelijama posmatranog bioptičkog materijala.

Po Leavu, karcinogeneza u prostati se karakteriše gubitkom ekspresije ER β u bazalnim ćelijama HGPINa, zatim ponovnim javljanjem u Gleason gradusu 3 periferne zone i metastatskim promenama, kao i ponovnim nestajanjem u Gleason gradusu 4/5.

Procenat obojenosti ER β u sekretornim ćelijama kontrolne grupe **-K**, kao i kod bazalnih ćelija, bio je najbolji u odnosu na ostale grupe: u 40% ćelija procenat obojenosti je ocenjen 5 (>66%). U grupi **-EP** u 40% ćelija procenat obojenosti iznosio je 4 (34-66%), a u 20% je bio 5 (>66%). U grupi **-EC3**, u 40% sekretornih ćelija procenat obojenosti bio je 4 (34-66%). Smanjenje ekspresije se vidi u grupi **-EC2**, a najmanja obojenost ER β u sekretornim ćelijama je nađena u grupi **-EC1**.

ER β je jako prisutan u BHP, a zatim se uočava progresivni gubitak njegove ekspresije u hiperplastičnom epitelu, i još u većem stepenu se vidi u invazivnom karcinomu. Brojni autori se slažu da je ekspresija ER β obrnuto proporcionalna stadijumu i gradusu tumora (3,4,23,24,31,40,44). Pasquali je pokazala da gubitak ER β može ubrzati ćelijsku proliferaciju i moguću karcinogenezu. Interesantno je da u nešto malo slučajeva nema promene, ili se registruje porast ekspresije ER β u tumoru, u odnosu na NP (36).

ER β se nalaze u većini srednje diferentovanih PCa i u androgen nezavisnim metastatskim tumorima (4,24). Ovaj nalaz je takođe kontradiktoran, da li je ER β pozitivan ili negativan nalaz? Da li je njegov gubitak udružen sa tumorogenezom (23) i tumorskom progresijom ili ekspresija ER β u uznapredovalim PCa jeste signal koji pomaže agresivnost tumora. Ovi podaci postavljaju više pitanja nego što daju odgovora (4,8).

ER β se nisu nalazili u stromi NP i BHP, dok je u PCa bilo 12% pozitivnih ćelija u stromi prostate (16). Leav i Signoretti su našli ER β u stromalnim ćelijama NP u manjem stepenu nego u bazalnim ćelijama.

Naši rezultati su pokazali da je ekspresija ER β u stromalnim ćelijama bila najbolja u grupi **-EC3** sa najlošije diferentovanim tumorima, gde je u 60% ćelija obojenost iznosila 4 (34-66%). U grupi **-K**, polovina bioptiranih stromalnih ćelija pokazivala je obojenost 4 (34-66%).

Pozitivna ekspresija ER β u našem sveukupnom uzorku je nađena: u 93,3% slučajeva u grupi **-K**, 100% u **-EP**; i 96,4% u grupama **-EC1**, **EC2** i **EC3**.

Neki autori su našli pozitivnu ekspresiju ER β u 90% u BHP, 47% u PINu, a svega 17,2% u PCa (3,23). Fixemer je u 87% primarnih PCa našao izraženu ekspresiju ER β , kao i u benignom epitelu. U 13% slučajeva je našao smanjenu ekspresiju i nije našao korelaciju između stepena bojenja, gradusa ili stadijuma bolesti (24).

Prelaz iz pozitivne u negativnu ekspresiju ER β na nivou bazalnih ćelija se uočava u PCa gradus 3 (87%) a prema lošije diferentovanom gradusu 4/5 (20%) (27,39).

Analizom je utvrđeno da su bazalne ćelije pokazivale najveću obojenost na ER β u grupi **-K**, zatim u grupi **-EC3**, zatim u **-EC2**, u grupi **-EP** se uočava pad ekspresije, dok je gupa **-EC1** imala najmanju ekspresiju. Ovde nalazimo na određeno odstupanje u smislu značajne prisutnosti receptora u loše diferentovanih tumora (**EC3**) ali i Fixemer je u 87% PCa našao izraženu ekspresiju ER β , dok je Pasquali u nešto malo slučajeva registrovala čak porast ekspresije ER β u tumoru, u odnosu na NP (36).

Bonkhoff i saradnici utvrdili su da dobro i srednje diferentovani PCa pokazuju ekspresiju ER β u malom broju slučajeva, dok loše diferentovani PCa pokazuje fokalnu pozitivnost ER β u 43% slučajeva (gradus 4), odnosno u 61% slučajeva (gradus 5) (29).

Veća ekspresija ER β u karcinomima sa Gleason gradusom 4, nego sa Gleason gradusom 3, odnosno 5, sugeriše da se njegova ekspresija smanjuje tokom progresije karcinoma, ali Fixemer nije našao korelaciju između statusa ER β i primarnog Gleason gradusa (24).

U našem istraživanju procenat obojenosti ER β je najveći u kontrolnoj grupi, prisutan je u većine srednje diferentovanih invazivnih PCa, ali ekspresija posmatranog receptora raste sa porastom Gleason scora, smanjuje se u PINu i najmanja je u dobro diferentovanih tumora.

Izgleda da ne postoji objašnjenje za neslaganja među objavljenim rezultatima. Zna se da je nedovoljna specifičnost antitela ili razlika u primarnim antitelima, neadekvatan retrieval antigena i metoda procesiranja tkiva, ili prisustvo nepoznatih izoformi ER može uticati na rezultate imunohistohemijskog bojenja.

Naše istraživanje nije pokazalo statistički značajnu povezanost stepena obojenosti stromalnih ćelija na prosečne vrednosti Gleason scora unutar eksperimentalne grupe. Takođe, nije utvrđen ni značajna povezanost sa prosečnim vrednostima PSA.

Potom smo analizirali povezanost prosečnih vrednosti Gleason scora sa stepenom obojenosti bazalnih ćelija unutar eksperimentalne grupe. Stepem obojenosti bazalnih ćelija u eksperimentalnoj grupi je pokazao povezanost sa razlikama u prosečnim vrednostima Gleason scora, a dobijene razlike su statistički značajne. Najviši Gleason score je nađen kod ćelija koje se nisu bojile, dok se najniža prosečna vrednost GS nalazila u grupi ćelija koje su ocenjene sa 2 (2-10%). Iako smo, pregledom radova drugih autora, očekivali bolji stepen obojenosti, naši rezultati pokazuju da su se najbolje diferentovani uzorci PCa (GS=4,67) bojili samo ocenom 2 (2-10%), dok su se najlošije diferentovani uzorci PCa (GS=9) bojili 0%, a tek malo bolje diferentovani (GS=8,50) bojili zapravo najviše, sa ocenom 5 (>66%). Tabela 18.

Cheng je našla da ćelije koje pokazuju ekspresiju ER β podležu apoptozi, što može doprineti smanjenoj proliferaciji. Ona je u ćelijskim linijama PCa povratila ekspresiju ER β , pomoću adenovirusa, i smanjila invaziju tumorskih ćelija u oko 60% slučajeva. Smanjenje ekspresije ER β je udruženo sa većim Gleason gradusom i sa većim metastatskim potencijalom tumora. Dokazala je da gubitak ER β vodi u nekontrolisanu ćelijsku proliferaciju. ER β može indukovati ekspresiju p21 i p27 što rezultuje zastojem u G2 fazi ćelijskog ciklusa i zaustavlja rast tumora. Cheng je još otkrila da je promotor ER β metilisan u oko 80% karcinomskih ćelija, što objašnjava gubitak ovog receptora u malignim ćelijama (uspavljaju se geni) (31).

ER β sprečava invaziju i proliferaciju nezavisno od prisustva liganda. ER β inhibira ekspresiju IL-8 (koji pojačava invaziju), tako da se deo dejstva ER β na supresiju invazije može pripisati IL-8. Moguće je da ćelije PCa samostalno sintetišu steroide, koji deluju kao prirodni aktivatori ER β .

Sve navedeno govori o gubitku ekspresije ER β u tkivu koje podleže displastičnoj transformaciji i o njegovoj ulozi 'čuvara'. Ekspresija ER β varira tokom karcinogeneze u prostati (18).

Kao i u slučaju stromalnih ćelija, prosečne vrednosti PSA se nisu razlikovale u odnosu na stepen obojenosti bazalnih ćelija u grupi pacijenata sa premalignim i malignim lezijama.

Stepen obojenosti sekretornih ćelija utiče na prosečne vrednosti PSA u isečcima prostata sa PIN lezijama i malignim promenama. U sekretornim ćelijama koje se nisu bojile zapažaju se i najveće vrednosti PSA, dok su najniže prosečne vrednosti PSA bile u grupi ćelija koje su se bojile ocenom 1 ($\leq 1\%$), odnosno u grupi ćelija gde je obojenost bila 5 ($>66\%$).

Značajan uticaj stepena obojenosti sekretornih ćelija u eksperimentalnoj grupi pacijenata uočen je i u odnosu na razlike u prosečnim vrednostima Gleason scora. Najviša prosečna vrednost Gleason scora zapažena je kod ćelija koje se nisu bojile, dok se najniža prosečna vrednost Gleason scora uočava u grupi ćelija koje su se bojile ocenom 1 ($\leq 1\%$).

Po našem istraživanju ekspresija (procenat obojenosti) ER β nije obrnuto proporcionalna stadijumu i gradusu, već predstavlja složen i moguće paradoksalan nalaz, da nelečeni primarni adenokarcinom zadržava ekspresiju ER β , iako više heterogenu i značajno nižu u poređenju sa benignim epitelom prostate.

Dobijeni nalazi su saglasni sa brojnim literaturnim nalazima, podržavaju početnu hipotezu ali je i proširuju do univerzalnosti da ekspresija ER β varira tokom karcinogeneze u prostati.

6.2. Uticaj različitih faktora na ekspresiju ER β u primarnim i metastatskim tumorima

Kako imunohistohemijske studije koriste samo jedno ER β antitelo, nije moguće precizirati koja se forma ispoljila od 4 moguće izoforme u prostati. Ove izoforme imaju različite kapacitete za vezivanje estrogena i različito utiču na funkciju ER β (22,24). Postojanje izoformi značajno komplikuje razumevanje uloge ovog receptora u prostati, a sam mehanizam dejstva estrogena ostaje do kraja nejasan (19).

Evaluacija ER β u PCa zahteva pozitivnu unutrašnju kontrolu, kako bi se izbegli lažno pozitivni rezultati. Specifičnost i senzitivnost primarnog antitela, procesiranje tkiva i fiksacija mogu značajno ugroziti određivanje ER β u PCa. Ovi parametri objašnjavaju različite rezultate dobijene u dosadašnjim istraživanjima. Horvath je opisala značajan gubitak ER β u primarnom PCa, sa ekspresijom u samo 11% slučajeva. Leav je opisao znatan pad ekspresije u gradusu 4 i 5, kao i odsustvo ekspresije u PCa tranzicionalne zone. Fixemer je registrovao ekspresiju ER β u praktično svim primarnim PCa uključujući i karcinom tranzicionalne zone. U 87% primarnih tumora je očuvan visok stepen ekspresije ER β , kao u benignom žlezdanom epitelu, dok se u 13% tumora sa nešto višim gradusom nalaze niže vrednosti. Svi slučajevi metastaza u limfne čvorove i kosti su pokazali srednje do jaku ekspresiju ER β . Prins je našao ekspresiju ER β u 100% slučajeva metastaza u limfnim čvorovima i kostima (12).

ER β može imati značajnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji epitela prostate (4,16,23) i može uticati na inicijalnu fazu karcinogeneze u prostati i u androgen nezavisnih tumora (24). Da li ER β omogućava ili suprimira razvoj ili progresiju PCa, ostaje da se utvrdi.

Nasuprot nelečenih tumora, rekurentne i androgen nesenzitivne lezije pokazuju znatno smanjenje stepena ekspresije ER β u 38% i gubitak u 13% slučajeva. Ipak 13% slučajeva zadržava jaku ekspresiju ER β . Parcijalni gubitak ER β u hormon refrakternih tumora je povezan sa značajnim padom bioraspoloživih androgena nakon oduzimanja androgena. Oduzimanje androgena smanjuje ekspresiju ER β , govoreći u prilog tome da je ER β androgenom regulisan gen. Parcijalni gubitak ER β može biti rezultat nedostatka bioraspoloživih androgena. Sa druge strane ćelije karcinoma prostate sa prisutnom ekspresijom ER β mogu imati hipersenzitivan AR u uslovima oduzimanja androgena. Da li je prisutna visoka ekspresija ER β udružena sa amplifikacijom gena AR sposobna da održi transkripcione aktivnosti androgenom regulisanih gena, nakon oduzimanja androgena? (24,29)

Visoka ekspresija ER β je nađena u slučajevima BHP (90%) sa PSA \leq 10ng/ml, pozitivna ekspresija u LGPINu, dok je negativna ili slaba ekspresija nađena u HGPINu i u PCa sa PSA \geq 10ng/ml (3,12,27).

Horvath je našla da >75% PCa ne pokazuje ekspresiju ER β . Karcinomi sa ekspresijom ER β su imali lošiju prognozu i veću stopu relapsa. Mehanizam inaktivacije ER β u PCa je i dalje nepoznat (3,4,13,23).

Leav i sar. su našli pozitivnost ER β u perifernoj zoni većine PCa gradusa 3, sa smanjenjem i gubitkom ER β u većini PCa gradusa 4/5 i interesantno je da su uočili bojenje jedarne membrane u ćelijama HGPINa (3,11). Tačno značenje ovakvog nalaza je trenutno nejasno, a verovatno predstavlja lokalizaciju ER β koja se dešava sa neoplastičnom progresijom i može uticati na oštećenje funkcije receptora (3). Bolje razumevanje ekspresije ER β u različitim stadijumima razvoja PCa može ukazati na nove pristupe u dijagnostici, prevenciji i lečenju ove bolesti.

6.3. Analiza ispitivanog uzorka

Naš uzorak se sastoji od 48 bioptičkih isečaka, može se okarakterisati kao srednje veliki i čine ga: kontrolna grupa sa BHP, i eksperimentalna grupa sa pogrupama PIN lezije, dobro diferentovani PCa (GS 2-4), srednje (GS 5-7) i loše diferentovani adenokarcinom (GS 8-10). Rubin deli adenokarcinome prostate na: dobro diferentovane (GS do 5), srednje diferentovane (GS 6-7), i loše diferentovane (GS preko 8). Drugi autori ih dele na: dobro diferentovane (GS 2-4), srednje diferentovane (GS 5-6), srednje do loše diferentovane (GS 7) i loše diferentovane (GS 8-10) (46,61,68,76,78). Različita podela na podgrupe PCa može uticati na razlike u dobijenim rezultatima.

Brojni autori su našli podudarnost Gleason scora u iglenoj biopsiji sa celom prostatom u 34-57%, dok su odstupanje od ± 1 našli u 75-92%. Određivanje Gleason scora u iglenoj biopsiji obično dovodi do podgradiranja i na radikalnoj prostatektomiji nije ekvivalentan nalaz (46,51,60,68,80). Takođe je preporuka da se Gleason score od 4 i manje ne određuje u iglenoj biopsiji (76,80,81,88). Većina ovih tumora se kasnije

revizijom oceni kao GS 5 (46). Ovo su još neki od razloga zbog koje dolazi do odstupanja naših rezultata sa nekim od ostalih autora.

Stepen heterogenosti tumora je najviše povezan sa veličinom tumora. Najveće tumorske lezije možda ne predstavljaju dobro patološki stadijum. Greška u gradiranju iglene biopsije se delom objašnjava zbog stepena heterogenosti ili tumorske multifokalnosti. Detaljna analiza multifokalnosti i heterogenosti pokazuje da je PCa kompleksna bolest. Istorija prirode bolesti se objašnjava sa ograničenjima morfološke analize. Precizniji pristup analiziranju različitih gradusa u tumoru ili lokalizacije tumora unutar iste prostate i koliko je to povezano, možda će biti omogućen određivanjem molekularnih i genetskih karakteristika samih tumora (86).

6.4. Analiza ostalih parametara (starost, Gleason score, PSA, dužina isečka)

U kontrolnoj grupi sa BHP, prosečna starost pacijenata iznosila je 66,40 godina. Prosečna starost u eksperimentalnoj grupi iznosila je 68,24 godina. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnoj starosti pacijenata kontrolne i eksperimentalne grupe. U eksperimentalnoj grupi trećina pacijenata bila je mlađa od 65 godina, dok je gotovo dve trećine imalo 65 i više godina. Prosečna starost u grupi sa PIN lezijama bila je 69,5 godina. Ovo obeležje je istovetno sa karakteristikama uzoraka drugih autora. PIN se zajedno sa PCa javlja u oko 80% muškaraca starosti 50-70 godina, s time da je srednji uzrast za PIN 65 godina, dok je za PCa 70 godina (3,51,58).

Prosečna vrednost Gleason scora u celoj eksperimentalnoj grupi iznosila 6,39. Starost ispitanika nije imala statistički značajan uticaj na vrednosti Gleason scora u eksperimentalnoj grupi. Prosečne vrednosti Gleason scora kod mlađih od 65 godina i kod pacijenata starosti 65 i više godina nisu se statistički značajno razlikovale.

U kontrolnoj grupi pacijenata, sa BHP, prosečna vrednost PSA iznosila je 8,86 ng/ml, a u celoj eksperimentalnoj grupi bila je 24,37 ng/ml, što govori o senzitivnosti ovog parametra u detekciji PCa. Najniža prosečna vrednost PSA izmerena je u grupi **-EC1**, a najviša u grupi **-EC3**.

Nije bilo statistički značajnih razlika u prosečnim vrednostima PSA kontrolne i eksperimentalne grupe. Takođe nisu utvrđene statistički značajne razlike u intervalima vrednosti PSA (0-4 ng/ml, 4-10 ng/ml, >10 ng/ml) u odnosu na starost ispitanika iz eksperimentalne grupe.

Prosečne vrednosti PSA kod pacijenata u eksperimentalnoj grupi se nisu statistički značajno razlikovale kod osoba do 65 godina starosti i osoba 65 i više godina.

Vrednost Gleason scora značajno utiče na prosečne vrednosti PSA kod pacijenata u eksperimentalnoj grupi. Najniže prosečne vrednosti PSA zapažaju se u grupi pacijenata sa **-EC1**, dok sa lošijom diferencijacijom tumora rastu i prosečne vrednosti PSA.

Upotreba sekstant iglenih biopsija prostate za imunohistoheмиjsku analizu PCa ima svoje prednosti (bolja fiksacija i odsustvo prethodne hormonalne terapije) ali i ograničenja. Mala količina uzorka dovodi do gubitka lezije u ponovnom sečenju (11). Prosečna dužina iglenog isečka prostate iznosi 9,4 mm po Ruijteru i predstavlja tkivo iz periferne zone. Odrerđivanje Gleason scora u iglenoj biopsiji, odnosno broj pozitivnih isečaka i procentualna zahvaćenost je u korelaciji sa stadijumom bolesti i veličinom tumora. Tačnost iglene biopsije u odnosu na radikalnu prostatektomiju iznosi preko 82% po Ruijteru odnosno 85% po Rubinu (77,86).

U grupi **-K** prosečna dužina isečka iznosila je 7,00 mm i kretala se u rasponu od 6-11 mm. U eksperimentalnoj grupi prosečna dužina isečka iznosila je 7,53 mm, a kretala se u rasponu od 3-12 mm. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnoj dužini bioptičkog materijala kod pacijenata kontrolne i eksperimentalne grupe, kao ni u prosečnim dužinama bioptičkog materijala među grupama pacijenata sa nekim stepenom maligne promene na prostati. Naše vrednosti su značajno manje od prethodno navedenih prosečnih dužina isečaka (za 2-2,4 mm), te se kao takve mogu smatrati slabije kvalitetnim uzorkom i manje reprezentativnim dijagnostičkim materijalom.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti:

1. U svim ispitivanim grupama, bez obzira na ćelijski odeljak registrovana je pozitivnost na ER β .
2. Bazalne ćelije su u svim eksperimentalnim grupama pokazale pozitivnost koja je bila manja u odnosu na kontrolnu grupu, i u obrnutoj je korelaciji sa stepenom diferentovanosti tumorskog tkiva i displazijom ćelija.
3. Sekretorne ćelije su u svim eksperimentalnim grupama pokazale pozitivnost koja je bila statistički manja u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je najveća ekspresija konstatovana kod loše diferentovanih tumora i premalignih lezija.
4. Procenat obojenosti stromalnih ćelija na ER β registrovan je u svim eksperimentalnim grupama, pri čemu je najveći procenat obojenosti zabeležen u srednje i loše diferentovanim tumorima.
5. Bioptički uzorci kontrolne grupe imali su najveći procenat obojenosti svih ispitivanih ćelijskih odeljaka u poređenju sa eksperimentalnim grupama. Sa pojavom premalignih i malignih lezija procenat obojenosti pojedinih ćelijskih odeljaka je bio manji u eksperimentalnim grupama.
6. U ispitivanim grupama sa srednje i loše diferentovanim tumorskim tkivom procenat obojenosti ćelija na ER β raste sa porastom Gleason scora, i značano je veći u odnosu na premaligne lezije i dobro diferentovane tumore.
7. Sa porastom PSA procenat obojenosti sekretornih ćelija na ER β u tumorskom tkivu opada. U sekretornim ćelijama loše diferentovanih tumora negativnih na ER β zapažaju se i najveće vrednosti PSA, dok su najniže prosečne vrednosti PSA bile u grupi dobro diferentovanih tumora. Stromalne i bazalne ćelije ne pokazuju povezanost sa procentom obojenosti ER β .
8. Po našem istraživanju ukupna ćelijska ekspresija (procenat obojenosti) ER β predstavlja složen i ponekad moguće paradoksalan nalaz, na osnovu čega

primarni adenokarcinom prostate zadržava ekspresiju ovog receptora, ali ipak značajno nižu u poređenju sa benignim epitelom i premalignim lezijama.

8. LITERATURA

1. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4258-4265.
2. Enmark E, Gustafsson JA. Estrogen receptor β – a novel receptor opens up new possibilities for cancer diagnosis and treatment. *End Rel Cancer*, 1998;5:213-222.
3. Gabal SM, Habib FM, Helmy DO, Ibrahim MF. Expression of estrogen receptor-B (ER-B) in benign and malignant prostatic epithelial cells and its correlation with the clinico-pathological features. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2007;19(4):239-248.
4. Signoretti S, Loda M. Estrogen receptor beta in prostate cancer: brake pedal or accelerator? *Am J Pathol.* 2001;159(1):13-16.
5. Gustafsson JA. Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol.* 1999;163:379-383.
6. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(12):5925–5930.
7. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor β subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 1998;19(4):253-286.
8. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007;87(3):905-931.
9. Matthews J, Gustafsson JA. Biological Actions of ER α and ER β . *Molecular interventions Review.* 2003;3(5):281-289.
10. Steiner MS, Raghoebar S. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators reduce prostate cancer risk. *World J Urol* 2003;21:31-36.
11. Asgari M, Morakabati A. Estrogen receptor beta expression in prostate adenocarcinoma. *Diagn Pathol.* 2011;6:61.

12. Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*. 2008;73(3):233-244.
13. Adams JY, Leav I, Lau KM, Ho SM, Pflueger S. Expression of estrogen receptor beta in fetal, neonatal and prepubertal human prostate. *The Prostate* 2002;52:69-81.
14. Hobisch A, Hittmair A, Daxenbichler G, Wille S, Radmayr C, Hobisch-Hagen P, Bartsch G, Klocker H, Culig Z. Metastatic lesions from prostate cancer do not express oestrogen and progesterone receptors. *J Pathol*. 1997;182(3):356-361.
15. Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res*. 2000;60(12):3175-3182.
16. Royuela M, de Miguel MP, Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Arenas MI, Paniagua R. Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Endocrinol*. 2001;168(3):447-454.
17. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology. Estrogen Receptor 2 (ER beta). <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ESR2ID405000ch14q23.html>
18. Risbridger GP, Ellem SJ, McPherson SJ. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J Mol Endocrinol*. 2007;39:183-188.
19. McPherson SJ, Ellem SJ, Patchev V, Fritzemeier KH and Risbridger GP. The role of ER alpha and beta in the prostate: insights from genetic models and isoform-selective ligands. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2006. *Tissue Specific Estrogen Action Novel Mechanisms, Novel Ligands Novel Therapies*. Eds KS Korach, T Winterhamel. Springer-Verlag, Berlin;1:131-147.
20. McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzemeier KH and Risbridger GP. Essential role for estrogen receptor β in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology*. 2007;148(2):566-574.
21. Stettner M, Kaulfuß S, Burfeind P, Schweyer S, Strauss A, Ringert RH, Thelen P. The relevance of estrogen receptor- β expression to the antiproliferative effect observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(10):2626-2633.

22. Weihua Z, Makela S, Andersson L, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA. A role for estrogen receptor β in the regulation of growth of the ventral prostate. *Medical sciences*, 2001;98(11): 6330-6335.
23. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL et al. Frequent loss of estrogen receptor- β expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61(14):5331-5335.
24. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Differential expression of the estrogen receptor β (ER β) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2003;54(2):79-87.
25. Ekman P. The prostate as an endocrine organ: androgens and estrogens. *The Prostate Supplement* 2000;10:14-18.
26. Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson JA, Birch L. Estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology*. 1998;139(3):874-883.
27. Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM. Comparative studies of the estrogen receptors β and α and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol*. 2001;159(1):79-92.
28. Prezioso D, Denis L J, Klocker H, Sciarra A, Reis M, Naber K, Lobel B, Pacik D, Griffiths K. Estrogens and aspects of prostate disease. *International Journal of Urology*, 2007;14:1-16.
29. Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. *Am J Pathol*. 1999;155(2):641-647.
30. Lahita RG. The connective tissue diseases and the overall influence of gender. *International journal fertility & menopausal studies*. 1996;41:156-165.
31. Cheng J, Lee EJ, Madison LD, Lazennec G. Expression of estrogen receptor β in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Lett*. 2004;566(1-3):169-172.
32. Schaid DJ. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Human Molecular Genetics Review*. 2004;13(1):103-121.

33. Guerini V, Sau D, Scaccianoce E, Rusmini P, Ciana P, Maggi A, Martini PGV, Katzenellenbogen BS, Martini L, Motta M, Poletti A. The androgen derivate 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor β subtype. *Cancer Res.* 2005;65(12):5445-5453.
34. Marcelli M, Cunningham GR. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3463-3468.
35. Mirone V, Fusco F, Verze P, Schulman C, Debruyne F, Imbimbo C. Androgens and benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol Suppl.* 2006;5:410-417.
36. Pasquali D, Rossi V, Esposito D, Abbondanza C, Puca GA, Bellastella A, Sinisi A. Loss of estrogen receptor β expression in malignant human prostate cells in primary cultures and in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):2051-2055.
37. Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;193(1-2):1-5.
38. Henshall SM, Quinn DI, Lee CS, Head DR, Golovsky D, Brenner PC, Delprado W, Stricker PD, Grygiel JJ, Sutherland RL. Altered expression of androgen receptor in the malignant epithelium and adjacent stroma is associated with early relapse in prostate cancer. *Cancer Res.* 2001;61(2):423-427.
39. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Basic pathology, 5e. Osnove patologije* 1994. WB Saunders company 1992, 5th ed, 596-600.
40. Bostwick DG, Quian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 2004;17:360-379.
41. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361:859–864.
42. Li J, Coalez RJ, Gwinn M, Khoury MJ. Steroid 5 α -reductase type 2 (SRD5a2) gene polymorphisms and risk of prostate cancer. *Am J Epidemiol.* 2010;171:1-13.
43. De Marzo AM, Meeker AK, Epstein JI, Coffey DS. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27 Kip1 in normal, hyperplastic and neoplastic cells. *Am J Pathol* 1998;153:911-919.
44. Imamov O, Lopatkin NA, Gustafsson JA. Estrogen receptor β in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2773-2774.

45. Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, Lopez-Beltran A. Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their importance. *J Clin Pathol* 2000;53:655-665.
46. DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 2003;361:955-964.
47. Schatzl G, Madersbacher S, Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Haitel A, Vutuc C, Micksche M, Marberger M. Association of polymorphism within androgen receptor, 5 α -reductase and PSA genes with prostate volume, clinical parameters and endocrine status in elderly men. *The Prostate* 2002;52:130-138.
48. McNeal JE, Haillet O, Yemoto C. Cell proliferation in dysplasia of the prostate: analysis by PCNA immunostaining. *Prostate*. 1995;27(5):258-268.
50. Šljivić B.M. Sistematska i topografska anatomija. Abdomen i karlica, 6 izdanje, Naučna knjiga Beograd, 1989. 192-195.
51. Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology, 9e. Elsevier Inc 2004, 9th ed, 1361-1395.
52. Sternberg SS. Histology for pathologists, 2e. Lippincott-Raven Publishers 1997, 2nd ed, 997-1017.
53. Montironi R, Mazzucchelli R, Scarpelli M. Precancerous lesions and conditions of the prostate: from morphological and biological characterization to chemoprevention. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;963:169-184.
54. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol*. 2007;25(5):398-400.
55. Tannenbaum M. The Prostate Gland. Principles and practice of surgical pathology and cytopathology. 2295-2334.
56. Atanacković M. i saradnici. Patologija. Poglavlje 19: Genitalni sistem. Libri medicorum, Beograd, 2003; 1 izdanje: 644-648.
57. Rubin E, Farber JL. Pathology, 3rd ed. Lippincott 1999. 952-961.
58. Ross M.H. Pawlina W. Histology: a text and atlas, 5th ed. Lippincott 2006. 952-961.
59. Nikolić I.R. Embriologija čoveka: tekst i atlas, četvrto izdanje, 2010. Data status Beograd. 224-227.
60. Thorson P, Humphrey PA. Minimal adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue.

Am J Clin Pathol 2000;114:896-909.

61. Janjić MA. Osnovi patologije muškog genitalnog sistema. 'Grafampromet' Ruma 2004, 78-127.

62. Wang X, Kruithof-de Julio M, Economides KD, Walker D, Yu H, Halili MV, Hu YP, Price SM, Abate-Shen C, Shen MM. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 2009;461(7263):495–500.

63. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase techniques. A practical approach to tumor diagnosis. American society of clinical pathologists press. 1986;20:50-51.

64. Ekman P. Endocrine therapy for benign prostatic hyperplasia in the 90's. *J Urol (Paris)*. 1995;101(1):22-25.

65. Fletcher CDM, Ro JY, Armin MB, Kim KR, Ayala AG. Diagnostic histopathology of tumors. Tumors of the male genital tract. 14. Elsevier Limited 2007;3:749-785.

66. Brosman SA. Precancerous lesions of the prostate.

<http://emedicine.medscape.com/article/447780-overview> updated Mar 29, 2011

67. Montironi R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M. Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nature Clin Pract Urol*. 2007;4(6):321-332.

68. Parsons JK, Partin W. Clinical interpretation of prostate biopsy reports. *Urology* 2006;67:452-457.

69. Helpap B. The significance of the P504S expression pattern of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HG PIN) with and without adenocarcinoma of the prostate in biopsy and radical prostatectomy specimens. *Virchows Arch* 2006;448:480-484.

70. Lee MC, Moussa AS, Yu C, Kattan MW, Magi-Galluzi C, Jones JS. Multifocal high grade prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for subsequent prostate cancer. *J Urol*. 2010;184(5):1958-1962.

71. Bostwick DG, Meiers I. Atypical small acinar proliferation in the prostate: clinical significance in 2006. *Arch Pathol Lab Med*, 2006;130 (7):952-957.

72. Borboroglu PG1, Comer SW, Riffenburgh RH, Amling CL. Extensive repeat transrectal ultrasound guided prostate biopsy in patients with previous benign sextant biopsies. *J Urol*. 2000;163(1):158-162.

73. McNeal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol.* 1986;17(1):64-71.
74. Algaba F. Minimal criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma and Gleason grading in prostate needle biopsy. *Pathology of the male genital tract* 2002;157-158.
75. Humphrey PA. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *J Clin Pathol.* 2007;60(1):35-42.
76. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology* 2004;17:292-306.
77. Rubin MA, Dunn R, Kambham N, Misick CP, O'Toole KM. Should a Gleason score be assigned to a minute focus of carcinoma on prostate biopsy? *Am J Surg Pathol.* 2000;24(12):1634-1640.
78. Varma M, Lee MW, Tamboli P, Zarbo RJ, Jimenez RE, Salles PG, Amin MB. Morphologic criteria for the diagnosis of prostatic adenocarcinoma in needle biopsy specimens. A study of 250 consecutive cases in a routine surgical pathology practice. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(5):554-561.
79. Shah RB, Kunju LP, Shen R, LeBlanc M, Zhou M, Rubin MA. Usefulness of basal cell cocktail (34 β E12+p63) in the diagnosis of atypical prostate glandular proliferations. *Am J Clin Pathol* 2004;122:517-523.
80. Shah RB. Current perspectives on the Gleason grading of prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1810-1816.
81. Berney DM. The case for modifying the Gleason grading system. *BJU International (OnlineEarly Articles)*.
doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07036.x
82. Rubin MA, Bismar TA, Curtis S, Montie JE. Prostate needle biopsy reporting: how are the surgical members of the Society of Urologic Oncology using pathology reports to guide treatment of prostate cancer patients? *Am J Surg Pathol.* 2004; 28: 946-952.
83. Cheng L, Koch MO, Juliar BE, Daggy JK, Foster RS, Bihrlle R, Gardner TA. The combined percentage of Gleason patterns 4 and 5 is the best predictor of cancer progression after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2005; 23(13):2911-2917.

84. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):256-269.
85. Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer*. 1991;64(4):631–644.
86. Ruijter ET, van de Kaa CA, Schalken JA. Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. Biological and clinical implications. *J Pathol* 1996;180:295-299.
87. Qian J, Bostwick DG. The extent and zonal location of prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia: relationship with carcinoma in radical prostatectomy specimens. *Pathol Res Pract* 1995,191(9): 860-867.
88. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol (Paris)*. 2010;183(2):433-440.
89. Renshaw AA, Schultz D, Cote K, Loffredo M, Ziembra D, D'Amico AV. Accurate Gleason grading of prostatic adenocarcinoma in prostate needle biopsies by general pathologists. *Arch Pathol Lab Med*,127(8):1007-1008.
90. Cvetković-Dožić D, Skender-Gazibara M, Manojlović E, Milenković S, Dožić S. Pathology of central nervous system metastases-an overview. *Arch Oncol*. 2006;14(1):50-52.
91. Bostwick DG, Meiers I. Prostate biopsy and optimization of cancer yield. *European Urology* 2006;49(3):415-417.
92. Schmidt JD, Gibbons RP, Murphy GP, Bartolucci A.
Evaluation of adjuvant estramustine phosphate, cyclophosphamide, and observation only for node-positive patients following radical prostatectomy and definitive irradiation. Investigators of the National Prostate Cancer Project. *Prostate*. 1996; 28(1):51-57.
93. Johnson JJ, Syed DN, Suh Y, Heren CR, Saleem M, Siddiqui IA. Disruption of androgen and estrogen receptor activity in prostate cancer by a novel dietary diterpene carnosol: implications for chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(9):1112-1123.

94. Vojinov S, Levakov I, Jeremić D, Živojinov S, Marušić G. Hormonski status bolesnika sa uznapredovalim karcinomom prostate lečenih androgenim blokadama. *Vojnosanitetski pregled*. 2011; 68(4):321-326.
95. Flüchter S.H, Weiser R, Gamper C. Recent results in cancer research. The role of hormonal treatment in prostate cancer, Springer-Verlag, 2007;175, 217-237.
96. Matzkin H, Braf Z. Endocrine treatment of benign prostatic hypertrophy: current concepts. *Urology*. 1991;37(1):1-16.
97. Vaughan D, Imperato-McGinley J, McConnell J et al. Long-term (7 to 8-year) experience with finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2002;60(6):1040-1044.
98. Lalošević D. i sar. Mikroskopska laboratorijska tehnika u medicini. Medicinski fakultet Novi Sad, 2005:1-140.
99. http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/2013/9512027_Rev_A_2013_USA_IHC_and_ISH_product_catalog.pdf
100. Allred DC. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998.11(2): 155-168.
101. who.int [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization [cited 2014 December 29]. Available from:<http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/>

9. LISTA SKRAĆENICA

ER- estrogenski receptor

E2- 17 β -estradiol

E3- estriol

E1- estron

α ERKO- estrogen receptor α knock out

AR- androgenski receptor

NP- normalna prostata

BHP- benigna hiperplazija prostate

PCa- adenokarcinom prostate

GnRH- gonadotropni rilizing hormon

LH- luteinizirajući hormon

LHRH- luteinizirajući rilizing hormon

DES- diethylstilbestrol

3 β Adiol- 5 α -androstane 3 β ,17 β -diol

HMWCK- high molecular weight cytokeratin

DHT- 5 α -dihidrotestosteron

ARE- androgen response elements

PSA- prostate specific antigen

GSH-PO- glutathione-peroxidase

GST- glutathione-S transferase

HGPIN- high grade prostate intraepithelial neoplasia

PIN- prostate intraepithelial neoplasia

LGPIN- low grade prostate intraepithelial neoplasia

GG- Gleason gradus

PR- progesterone receptor

IL- interleukin

AAH- atipična adenomatozna hiperplazija

CK- cytokeratin

PAP- prostatic acid phosphatase

IGF- insuline like growth factor

EGF- epidermal growth factor
TGF- α - transforming growth factor α
FGF- fibroblastic growth factor
VEGF- vascular endothelial growth factor
TNF- tumor necrosis factor
BCH- basal cell hyperplasia
CCCH- clear cel hyperplasia
SA- sklerozirajuća adenoza
ASAP- atypical small acinar proliferation
AMACR- alpha-methylacyl-CoA racemase
IDCP- intraductal carcinoma prostate
TURP- transurethral resection of the prostate
DRE- digital rectal examination
PCNA- proliferating cell nuclear antigen
TCC- urotelni karcinom
PAH- postatrofična hiperplazija
RP- radikalna prostatektomija
PIA- proliferative inflammatory atrophy
STI-Sexually transmitted infections
PA- proliferative atrophy
GS- Gleason score
AFIP- Armed Forces Institute of Pathology
SERM- selective estrogen-receptor modulator
TAM- tamoxifen
FSH- folikulostimulirajući hormon
AAT- androgen ablaciona terapija
ILC- intersticijalna laserska koagulacija
TUNA- transuretralna iglena ablacija
TUIP- transuretralna incizija
ICI- Fulvestrant (ICI 182,780) selective estrogen receptor down-regulator