

# Procjena vrijednosti određivanja izraženosti proteina c-myc i caveolina-1 na bioptatima u otkrivanju signifikantnog raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika

---

Tomašković, Igor

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:489832>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## Središnja medicinska knjižnica

**Tomašković, Igor (2010) *Procjena vrijednosti određivanja izraženosti proteina c-myc i caveolina-1 na bioptatima u otkrivanju signifikantnog raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika [Immunohistochemical expression of c-myc and caveolin-1 on biopsy cores in detection of significant prostate cancer in low risk patients].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1686>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

# 1. UVOD

## 1.1 EPIDEMIOLOGIJA

Rak prostate spada među najčešće maligne bolesti u muškaraca. U Sjedinjenim Američkim Državama najčešća je dijagnosticirana maligna bolest, a druga po smrtnosti od malignoma (1). U Hrvatskoj se po učestalosti malignih bolesti u 2006. u muškaraca nalazi na 3. mjestu iza karcinoma pluća i crijeva s incidencijom 72/100000, a stopa mortaliteta iznosi 20,0 na 100 000 muškaraca (2). Bolest se javlja u starijoj životnoj dobi te se 75% dijagnosticira u muškaraca starijih od 65 godina. Od 1985. do 1989. ukupna incidencija raka prostate u SAD-u bila je u porastu otprilike 6% godišnje, a s pojavom PSA u kliničkoj praksi rapidno je porasla na 17.5% godišnje od 1989. do 1992. (3). Od 1992. do 1995. incidencija se smanjuje stopom od 14% godišnje i stabilizirala se na 141 pacijenta na 100000 (3). No, incidencija raka prostate kod pedesetogodišnjaka raste od 1992. sa stopom od 1.9% godišnje, što je vjerojatno rezultat rane dijagnostike, a i dokaz da ovaj rak postaje bolest srednje životne dobi (4). Osim dramatičnih promjena u incidenciji dogodio se i značajan pomak u stadiju bolesti kod postavljanja dijagnoze te je broj pacijenata s metastatskom bolešću dramatično pao. Broj pacijenata s lokaliziranom bolešću porastao je s 62.6/100000 u 1987. na 117.7/100000 u 1998. godini (3). Posljedično ovome, broj bolesnika liječenih radikalnom prostatektomijom porastao je sa 7% 1983.

na 32% 1992. (4). Broj pacijenata koji se podvrgavaju radikalnoj prostatektomiji u stadiju T1c (nepalpabilan, biopsijom dokazan karcinom otkriven zbog povišenih vrijednosti PSA) porastao je s 10% 1988. na 73% 2007. godine. (5). U proteklom desetljeću smrtnost od raka prostate u SAD-u smanjila se za 25% i sada iznosi 31 900 muškaraca godišnje ili 19.4/100000 za bijelce odnosno 47.0/100000 za crnce (6). Specifični mortalitet raka prostate bio je u stalnom porastu od sedamdesetih do devedesetih godina prošlog stoljeća s prosječnom stopom 3.1% godišnje, a potom je od devedesetih smanjivan stopom od 1.9% godišnje (3). Smatra se da bi ovaj pad mogao biti rezultat uvođenja prostata specifičnog antigena u dijagnostiku bolesti i boljeg liječenja. Taj je zaključak još vjerojatniji ako se zamijeti da do pada u smrtnosti od raka prostate nije došlo u zemljama u kojima PSA nije uveden u rutinsku urološku praksu. Petogodišnje preživljenje za bijelce u SAD povećalo se sa 74.1% za pacijente dijagnosticirane 1981. na 96.8% za pacijente dijagnosticirane 1993. Desetogodišnje preživljenje također pokazuje trend porasta s 59.7% za pacijente dijagnosticirane 1981. na 74.7% za one dijagnosticirane 1998. (3).

Potreban je međutim oprez u interpretaciji trendova preživljenja zbog takozvane *lead time* i *length time* pogreške.

*Length time* pogreška podrazumijeva mogućnost da širokom uporabom PSA otkrivamo karcinome koji nisu klinički manifestni jer sporije rastu i imaju dugo vrijeme udvostručenja mase. Zbog toga pacijenti kojima je bolest dijagnosticirana na temelju povišenog PSA duže preživljavaju (njihovi tumori bi

još dugo rasli bez kliničkih manifestacija, a možda i ne bi uzrokovali smrt pacijenta) te time lažno mijenjaju statistiku preživljenja.

*Lead time* pogreška podrazumijeva da se bolest samo otkriva ranije, a da pacijent preživljava jednako kao i da je dijagnosticiran kada bolest postane simptomatska. Drugim riječima, moguće je da pacijent samo ranije "sazna" da ima bolest, a da je ukupno preživljenje nepromijenjeno (3).

## 1.2. ETIOLOGIJA

Rak prostate javlja se u dva oblika: latentnom i kliničkom. Latentni oblik podrazumijeva akcidentalno otkriven rak prostate na autopsiji koji je vrlo čest (30-40% muškaraca starijih od 50 godina). On ima indolentan tijek i niski maligni potencijal. Klinički manifestni rak prostate je onaj koji, ako se ne liječi ili se kasno otkrije, uzrokuje smrt bolesnika. Životni rizik za latentni rak prostate je kod 50-godišnjaka 40%, rizik za obolijevanje od klinički manifestnog raka prostate je 9.5%, a rizik od umiranja od ove bolesti je 2.9% (7).

Osim starosne dobi i genetski ustroj te okolišni faktori doprinose pojavi raka prostate na individualnoj razini. Bolest je češća među crncima (8), a Azijati imaju najnižu incidenciju bolesti u svijetu (9). Obiteljsko pojavljivanje raka prostate prisutno je u 10% slučajeva (10). Nekoliko je područja ljudskog genoma za koje se vjeruje da su povezani s ovom bolešću: kromosomi 8p, 8q,

10q, 13q, 16q, 17p, 18q (11). Smatra se da je u otkrivanju etiologije ove bolesti važno prepoznati *inicijaciju* histološkog raka prostate kao prvi korak maligne transformacije, a potom njegovu *progresiju* u klinički manifestni oblik.

Genetske mutacije koje dovode do gubitka kontrole rasta i umnožavanja stanice te gubitka programirane smrti stanice u osnovi su složenih promjena koje dovode do nastanka raka prostate i predmetom su intenzivnog istraživanja.

Okolišni faktori također igraju ulogu u etiopatogenezi raka prostate.

Hrana bogata masnoćama u nekim studijama nije se pokazala rizičnim za rak prostate (12), dok se u drugima spominje čak dvostruki relativni rizik (7).

Rizičnim se smatra prehrana siromašna selenom (13) i vitaminom E (14) te izloženost kadmiju. Uloga pušenja, konzumacije alkohola i seksualne aktivnosti u etiopatogenezi raka prostate ostaje nerazjašnjena jer postoje studije koje su dale proturječne rezultate.

Hormonski utjecaji na rak prostate odavno se proučavaju. Kako je i zdravo tkivo prostate ovisno o hormonima, u prvom redu testosteronu, tako je i rak prostate, barem u početku hormonski ovisan. Je li promjena u metabolizmu nekih hormona važan za malignu transformaciju ili je posrijedi neki drugi mehanizam, još nije poznato.

### 1.3. PATOLOGIJA

Preko 95% karcinoma prostate su adenokarcinomi. Ostali su karcinomi prijelaznog epitela, sarkomi, neuroendokrini karcinomi, adenoidni cistični karcinomi. U klinički lokaliziranih adenokarcinoma prostate tumorska se masa nalazi u 70% slučajeva u perifernoj zoni prostate, 10-20% u prijelaznoj zoni, a u 5-10% u centralnoj zoni (7). Periferno locirani karcinomi prostate najčešće se šire izvan kapsule prodorom u perineuralni prostor. Smatra se da je perineuralni prostor *locus minoris resistentiae* (15). Lokalno širenje raka prostate može dovesti do zahvaćenosti sjemenih mjehurića u koje tumor prodire širenjem preko kapsule ili, rjeđe, preko ejakulatornih duktusa. Najčešće rak prostate metastazira u limfne čvorove, potom u kosti i pluća. Prema TNM klasifikaciji T1 i T2 tumori ograničeni su na prostatu i predstavljaju lokalizirani karcinom, dok T3 predstavlja tumor izvan prostate (16). Osim stupnjevanja proširenosti (*staging*) važan je i stupanj diferenciranosti (*grading*) raka prostate. On se najčešće opisuje Gleasonovom skalom od 1-5 kod koje 1 predstavlja najbolje diferencirani, a 5 najslabije diferencirani karcinom prostate. Ako se odrede dvije najčešće patohistološke slike uzorka, stupanj diferenciranosti se izražava kao Gleasonov zbroj. Korištenjem Gleasonovog zbroja u biopsijskom materijalu postiže se zadovoljavajuća reproducibilnost stupnja diferenciranosti na konačnoj patohistološkoj analizi nakon radikalne prostatektomije (17).

Važno je još napomenuti da postoje prekancerozne i potencijalno prekancerozne promjene koje zahtijevaju posebnu pozornost. Naime pojava HGPIN (*high grade prostatic intraepithelial neoplasia*) i ASAP (*atypical small acinar proliferation*) sugerira potrebu ponavljanja biopsije. HGPIN čine benigni *ductusi i acinusi* uz citološki atipičnu strukturu stanica s uvećanjem i hiprekromazijom jezgre, prominentnim nukleolima i očuvanom bazalnom laminom. HGPIN se javlja u 0.7-16.5% biopsija, ovisno o studiji. Ponovljena biopsija otkriva karcinom u 23-50% slučajeva (18). ASAP predstavlja fokuse malih žlijezda koji ne zadovoljavaju kriterije karcinoma, ali istovremeno ne pokazuju jasne karakteristike benignog tkiva. Drugim riječima, ASAP je suspektan karcinom prostate bez dovoljno dokaza. Neki autori nalaze karcinom u 30-50% ponovljenih biopsija nakon nalaza ASAPa (18).

Proliferacijska inflamatorna atrofija (PIA) je skup atipičnih atrofičnih žlijezda koje se mogu javiti žarišno ili difuzno. PIA može progredirati u karcinom, regradirati ili potpuno nestati. Kontradiktorni su podaci o PIA kao prekursoru raka. Dok je neki autori smatraju jednom od faza u nastanku raka prostate, drugi autori nisu takva mišljenja (19,20,21).

Atipična adenomatozna hiperplazija (AAH) može nalikovati karcinomu malih stanica, ali građom i citološki ne ispunjava kriterije za postavljanje dijagnoze karcinoma prostate. Nema čvrstih dokaza koji bi povezali AAH i karcinom prostate (22).



### 1.3.1 Kvantitativna patohistologija

Pojam kvantitativne patohistologije odnosi se na niz parametara dobivenih patohistološkom analizom u biopsijskom uzorku raka prostate koji se mogu koristiti kao dodatna informacija u procjeni stadija bolesti kod svakog pojedinog pacijenta. Broj tih parametara intenzivnim istraživanjem u ovom području sve je veći, a njihova stvarna uloga i vrijednost još se proučavaju. Predmnijeva se da bi korištenjem ovih parametara, uz one tradicionalne, određivanje stadija bolesti bilo preciznije pa bi se preciznije moglo odrediti indikacijsko područje za pojedinu vrstu liječenja raka prostate (23).

Kvantitativna patohistologija može se danas koristiti u:

1. predviđanju stadija bolesti
2. odabiru pacijenata za *nerve sparing* prostatektomiju
3. odabiru pacijenata s rakom prostate za aktivni nadzor

Danas postoje studije koje analiziraju i više različitih parametara koji se mogu dobiti patohistološkom analizom bioptata. Analiza uključuje:

- A) broj biopsijskih cilindara s rakom,
- B) postotak cilindra zauzetog rakom,
- C) okaciju cilindra s tumorom (unilateralnost ili bilateralnost tumora),
- D) Gleasonov zbroj na biopsiji i
- E) perineuralnu invaziju.

## A) Broj biopsijskih cilindara s rakom

Još 1969. McNeal sugerirao da je maligni potencijal raka prostate u uskoj vezi s volumenom prostate. Od tada je u mnoštvu studija proučavana veza volumena s razinom PSA, histološkom slikom, kapsularnom penetracijom, invazijom sjemenih mjehurića, pozitivnim kirurškim rubovima, metastazama u limfne čvorove, progresijom bolesti nakon prostatektomije itd. Poželjno je procijeniti i volumen tumora preoperativno kako bi se razlučili oni pacijenti koji imaju nesigifikantni rak od onih kojima bi liječenje bilo nužno. Tako se broj biopsijskih cilindara rabi kao surogatni pokazatelj volumena tumora i jedan je od najčešćih metoda kvantitativne patohistologije. Veći broj pozitivnih cilindara na biopsiji povezan je sa češće pozitivnim kirurškim rubovima, s metastazama u limfnim čvorovima, s većim volumenom tumora, sa češćom invazijom sjemenih mjehurića i sa češćim *relapsom* nakon liječenja (24,25,26,27). Autori navedenih studija su potvrdili da je broj cilindara zahvaćenih tumorom značajan prediktor izvankapsularnog širenja raka. Tako je kod 3 pozitivna cilindra bolest ograničena na prostatu u samo 28-40% slučajeva, kod 4 pozitivna cildra u 5-25% slučajeva, kod 5 pozitivnih cilindara u 3-11% slučajeva, a kad je svih 6 cilindara pozitivno bolest je lokalizirana u 0-7% slučajeva (24,25,26,27).

## **B) Postotak cilindra zauzetog rakom**

Ovaj je parametar još jedna od mjera volumena tumora. Utvrđeno je da je ovaj parametar nezavisan prediktor patološkog stadija i volumena tumora (28). Na temelju postotka tumora zahvaćenog rakom Freedland je stratificirao pacijente u nisko, srednje i visokorizične grupe (29). Ranije studije Bostwicka i Raverya pokazale su odnos ovog parametra i stadija bolesti; 70% prisutnosti tumora u cilindru korelira s kapsularnom penetracijom u 28-44% slučajeva (30, 31).

## **C) Lokacija cilindra s tumorom**

Badalment i sur. smatraju da prisutnost tumora u biopstatima uzetim iz apeksa značajno češće korelira s pozitivnim kirurškim rubovima, dok je prisutnost tumora u biopstatu baze prostate povezano sa češćim izvankapsularnim širenjem (24). Prisutnost tumora u oba lobusa može se pripisati ili tumoru većeg volumena ili multifokalnom karcinomu kakvih je otprilike 50%.

Narayan je istraživao važnost ovog parametra i utvrdio da je tumor koji je biopsijom dokazan u oba lobusa lokaliziran nakon prostatektomije u samo 43% slučajeva (32).

#### **D) Gleasonov zbroj na biopsiji**

Gleasonov zbroj na biopsijskom materijalu već je dulje vremena standardni prediktor stadija bolesti i prognoze. Ovaj je parametar uz DRP i PSA uključen i u Partinove tablice (33, 34). Narain i sur. utvrdili su na preko 1000 pacijenata da biopsijski Gleasonov zbroj korelira sa stadijem bolesti i stopom preživljenja (35). Oni su pokazali da ako je Gleasonov zbroj  $< 7$ , rak je lokaliziran u 59% slučajeva; ako je Gleasonov zbroj  $= 7$ , rak je lokaliziran u 44% slučajeva; a ako je Gleasonov zbroj  $> 7$  rak je lokaliziran u samo 26% slučajeva (35).

#### **E) Perineuralna invazija**

Perineuralna invazija (PNI) predstavlja nalaz malignih stanica oko ili duž živaca u prostatičnom tkivu. Prodor tumora u perineuralni prostor smatra se prodorom u područje *locus minoris resistentiae* što olakšava širenje tumora preko prirodnih barijera. Živci perforiranjem prostatične kapsule uklanjaju prirodnu barijeru širenju tumora i maligne stanice se duž živca mogu probiti, zaobilaženjem kapsule, do periprostatičnog tkiva i organa. To je jedan od opisanih načina širenja bolesti. Uzimajući u obzir ranije rečeno razmatralo se može li nalaz PNI u biopsijskom materijalu na neki način signalizirati postojanje lokalno uznapredovale bolesti odnosno već prisutnog proširenja tumora izvan prostate.

Perineuralna invazija u biopsijskom materijalu još je predmetom istraživanja, a njezin prediktivni potencijal u procjeni stadija raka prostate i izvanprostatičnog širenja bolesti ostaje kontroverzan (15). Iako su neke studije pokazale sposobnost perineuralne invazije u predviđanju stadija bolesti (36-39), druge su tu mogućnost osporile (40). Perineuralna invazija identificira se na otprilike 20-24% biopsija prostate (15, 37) uz 27-40% osjetljivost i 83-96% specifičnost ovog nalaza u predikciji izvanprostatičnog širenja bolesti (36, 37). Za razliku od ovih studija u kojima je PNI ispitivana univarijatnom analizom, u studiji Egana i sur. osporena je njezina važnost na multivarijatnoj razini (40).

### 1.3.2..Volumen raka prostate

Osim surogatnih parametara volumena tumora na bioptatima koji su ranije navedeni moguće je odrediti stvarni volumen tumora na konačnom patohistološkom preparatu prostate. Procjena veličine tumora nakon prostatektomije može biti rezultat kompliciranog serijskog mjerenja narezanih presijeka preparata umnoženih s debljinom narezivanja. Premda je izražavanje tumora u  $\text{cm}^3$  zlatni standard, ono je nepraktično i često neprecizno te oduzima patologu puno vremena (41). Vizualna estimacija postotka tumora u prostati pokazala se puno bržom, praktičnijom i što je najvažnije točnijom (41, 42). Naime, u analizi Vollmera istaknuta je važna činjenica da je u 22 studije koje su analizirale povezanost volumena tumora sa konačnom prognozom i

preživljenjem samo 29% pokazalo povezanost volumena tumora izraženog u  $\text{cm}^3$  s preživljenjem, dok je tu povezanost pokazalo 67% studija s volumenom izraženim postotkom tumora u preparatu (42). Europsko istraživanje navodi da najveći broj patologa u Europi u izvješćima volumen tumora nakon prostatektomije iznosi u postotku tumora (43). Vollmer navodi da je uz prisutnost manje od 5% tumora u preparatu vjerojatnost preživljenja blizu 100%. (42). Kao graničnu vrijednost insignifikantnosti tumora postavlja se granica manja od 5% (42, 44, 45). Zbog toga smo u našoj studiji ovu graničnu vrijednost uzimali kao mjeru signifikantnosti tumora nakon operacije.

### **1.3.3. Insignifikantni rak prostate**

Insignifikantni tumor definira se kao tumor koji ne predstavlja rizik od progresije i metastaza, ne ugrožava bolesnika i ne izaziva smrt (46). To je jedna od posebnosti raka prostate. Naime, rak prostate je heterogen i varira od bolesti indolentnog tijeka koja se nađe u patohistološkom materijalu na obdukciji u gotovo 30% muškaraca starijih od 50 godina umrlih od drugih bolesti, do klinički vrlo agresivnog raka koji progredira u metastatsku bolest i uzrokuje smrt bolesnika (47,48,49). Terminologija koja se još koristi za ovu vrstu raka prostate uključuje indolentni rak, incidentalni rak, latentni rak, niskorizični,

klinički irelevantni rak ili minimalna bolest. Za naglasiti je da se svi ovi termini u literaturi ne koriste jednoznačno (50).

Iznimno je važno u trenutku postavljanja dijagnoze raka prostate predvidjeti njegovo ponašanje i maligni potencijal te razlikovati tumore koji zahtijevaju promptno agresivno liječenje s ciljem izlječenja, od tumora koji vjerojatno uopće neće postati simptomatski tijekom bolesnikova života. Svake se godine u Europi dijagnosticira oko 345 900 slučajeva raka prostate, a od njega umre oko 87 400 muškaraca (51). U Hrvatskoj se godišnje otkrije 1500 novih slučajeva, a oko 500 muškaraca umre od ove bolesti (52). Očigledan je nesklad između incidencije i mortaliteta i on još više postaje aktualan od početka 90-ih godina kada u kliničku praksu ulazi uporaba prostata specifičnog antigena (PSA). Od tada je incidencija porasla u svim zemljama (53,54). U Sjedinjenim državama omjer incidencije i mortaliteta je 7.7 (55).

Od muškaraca s dijagnozom raka prostate tek će 12% umrijeti od te bolesti, dok će ostali umrijeti s rakom prostate, ali ne od njega (56). Jasno je da će, otkriju li se za života svi postojeći karcinomi prostate u populaciji, doći do značajnog pretjeranog otkrivanja i posljedičnog pretjeranog liječenja. Opravdana je bojazan da se, barem u nekim sredinama, sve više otkrivaju indolentni odnosno klinički insignifikantni tumori. Bolesnici dijagnosticirani s ovakvim rakom prostate niskog rizika mogli bi biti podvrgnuti aktivnom nadzoru i izbjeći radikalno liječenje i s njim povezan morbiditet. Smatra se da je svake godine u SAD takvih bolesnika koji bi mogli izbjeći radikalni tretman oko 69 000 (57).

Danas oko 80% bolesnika s rakom prostate otkrivenih na temelju povišenog PSA ima lokalizirani rak, a oko 50% spada u skupinu niskog rizika. Aktivni nadzor u svjetlu navedenih činjenica plijeni sve veću pozornost urologa i onkologa u svijetu. Ovaj pristup podrazumijeva da se bolesnici niskog rizika ne liječe agresivno (operacijom ili zračenjem) nego prate putem PSA i ponovljenih biopsija te se u slučaju progresije bolesti u agresivniji oblik poduzme aktivno liječenje samo za tu skupinu bolesnika i to u fazi dok je bolest izlječiva.

Svakako je važno napraviti distinkciju aktivnog nadzora od pristupa koji se popularno naziva *watchful waiting* (oprezno čekanje) koje je desteljećima podrazumijevalo opservaciju u selektiranoj skupini bolesnika sa primjenom palijativnog tretmana u slučaju progresije. Koncept aktivnog nadzora ima važne implikacije na savjetovanje bolesnika o njihovoj bolesti, na liječenje i s njim povezanu kvalitetu života te na troškove liječenja. S druge pak strane rak prostate je u Zapadnom svijetu drugi po smrtnosti od malignih bolesti i godišnje od njega u razvijenom svijetu umre više muškaraca nego od kolorektalnog karcinoma. To znači da je apsolutni broj umrlih od raka prostate još uvijek toliko visok da, osim raka pluća (u Hrvatskoj i raka debelog crijeva), nadmašuje smrtnošću sve ostale karcinome u muškaraca. Važno je naglasiti da je mortalitet od raka prostate u Hrvatskoj još u porastu.

Razvidna je dakle važnost i potreba preciznog definiranja i razlikovanja insignifikantnog raka prostate kod kojega moramo reducirati suvišno liječenje i s



njim povezan morbiditet od signifikantnog raka kojeg moramo još agresivnije i tražiti i liječiti kako bi se smanjila smrtnost od ove bolesti.

### **1.3.3.1. Kriteriji insignifikantnog raka prostate**

Trenutno se u predviđanju (in)signifikantnosti raka prostate koristi nekoliko modela.

Jedan model čine patohistološki parametri, drugi nomogrami, a treći, koji je praktički u nastajanju i fazi opsežnih ispitivanja čine molekularni parametri.

Prva istraživanja ove problematike započeo je Epstein koji je najranije definirao da je volumen tumora manji od  $0.5 \text{ cm}^3$  uz odsutnost Gleasonova gradusa 4 ili 5 u zbroju na konačnoj patohistologiji kriterij insignifikantnog raka (58). Kriteriji nisu bez prijepora pa suvremena serija incidentalnog karcinoma kod cistoprostatektomije pokazuje da bi granična vrijednost volumena dobro diferenciranog tumora nakon radikalne prostatektomije koji bi se mogao smatrati insignifikantnim bila  $1 \text{ cm}^3$  (59). U novije se vrijeme, zbog praktičnosti, procjena udjela tumora u prostati izražava umjesto  $\text{cm}^3$  - postotkom tumora u preparatu. Kao graničnu vrijednost insignifikantnosti tumora Romero-Selas te Stamatiou postavljaju volumen tumora u manje od 5% preparata (44,45).

Svi ovi kriteriji, međutim, primjenjivi su tek kada je bolesnik već operiran, a patolog ima cijelu prostatu za analizu i utvrđivanje spomenutih kriterija.

Diferencijacija klinički signifikantnog od klinički insignifikantnog raka prostate već na biopsijskom materijalu uzetom širokom iglom (kojim se de facto i postavlja dijagnoza) imala bi dalekosežne posljedice u savjetovanju bolesnika o terapijskim opcijama, mogućoj prognozi, tijeku i ishodu bolesti. Biopsijski kriteriji insignifikantnosti definirani po Epsteinu su Gleasonov zbroj 6 i manje, PSA gustoća (PSAD- *PSA density*) manja od 0.15 ng/ml, 2 i manje pozitivna cilindra u kojem je manje od 50% tumorskog tkiva (59). Njegov model inicijalno je imao pozitivnu prediktivnu vrijednost od 75%. Ohori je definirao insignifikantni tumor kao tumor manji od 3 mm na bioptatu, Gleasonova zbroja 6 i manje (60). Allanovi kriteriji insignifikantnosti na biopsiji su tumor manji od 0.5 mm u pozitivnom cilindru i  $GS \leq 6$  (61). Unatoč tako restriktivnim kriterijima maksimalni volumen tumora nakon operacije bio je  $3.75 \text{ cm}^3$  (dakle više od gornje granice po Epsteinu od  $0.5 \text{ cm}^3$ ) i s više od 10 % prodora kroz kapsulu (61). Sve navedene studije bazirane su na sada već opsoletnim sekstant biopsijama. Tek 2006. godine Bocon-Gibod i Barber objavljuju studije koje uključuju 6-12 bioptata (62,63). Potonji definira insignifikantni tumor na biopsiji kao solitaran fokus u manje od 5% cilindra i  $GS \leq 6$ . Prosječni volumen ovog tumora nakon operacije je također bio iznad  $1 \text{ cm}^3$  (64). Kattan je predložio nomogram za predikciju insignifikantnog tumora nakon prostatektomije koji se bazira na T1c ili T2a kliničkom stadiju, PSA manji od 20 ng/mL, bez Gleasonova gradusa 4 ili 5 na biopsiji, manje od 50% pozitivnih bioptata, manje od 20 mm karcinoma na bioptatima i više od 40 mm benignog

tkiva prostate (65). Pozitivna prediktivna vrijednost ovog nomograma je 64%. Kattanov nomogram je validirao i korigirao Steyerberg (66). U novijem studijama validaciju Epsteinovih kriterija proveli su Bastian na američkoj i Jeldres na europskoj populaciji (67,68). Potonja studija pokazala je značajnu razliku u pogledu preciznosti ovih kriterija na europskoj populaciji jer je primjenom istih čak 24% bolesnika koji su zadovoljili biopsijske kriterije insignifikantnosti po Epsteinu imalo signifikantnu bolest nakon operacije. To se tumači različitom migracijom stadija i gradusa bolesti u Europi u odnosu na SAD, a svjedoči da se nomogrami ne mogu nekritično koristiti ne uzimajući u obzir lokalne razlike. U našem istraživanju na 586 bolesnika operiranih radikalnim zahvatom, od svih bolesnika koji su zadovoljavali preoperativne kriterije insignifikantnog raka čak 39% je na konačnoj patohistologiji imalo bolest koja je klinički signifikantnog karaktera (69).

Navedeni kriteriji su promjenom karaktera populacije koja se podvrgava radikalnom liječenju doživjeli brojne kritike zbog nedovoljne specifičnosti i osjetljivosti te su vrednovanjem ovih kriterija na populaciji bolesnika u sadašnjem trenutku pokazali nedostatnu preciznost u razlučivanju signifikantnog od insignifikantnog raka prostate. Stoga se preporučuje oprez kod savjetovanja bolesnika u pogledu liječenja (64, 68).

Budućnost donosi nove, molekularne parametre koji će sigurno doprinijeti boljem razlikovanju raka prostate kojeg treba agresivno liječiti od onog čiji je tijek indolentan (70). Trenutno se ispituju tisuće potencijalnih biomarkera za rak

prostate. Istražuju se faktori tumorskog rasta, faktori angiogeneze, regulatori staničnog ciklusa, regulatori apoptoze, kromosomske i genetske promjene. Z nadati se da će neka od ovih istraživanja omogućiti da se pristup bolesniku s rakom prostate individualizira i odabere najbolja terapijska opcija koja će omogućiti izlječenje onima kojima je liječenje potrebno i izbjegavanje radikalnog pristupa bolesnicima koji imaju insignifikantnu, indolentnu bolest.

## **1.4. KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOZA**

### **1.4.1. Klinička slika karcinoma prostate**

Karcinom prostate je tiha bolest i u ranom stadiju nema kliničkih manifestacija.

Tek kada se bolest lokalno ili sustavno proširi može uzrokovati smetnje.

Lokalno uznapredovala bolest simptomima se može preklapati s onima koje uzrokuje benigna hiperplazija prostate te isti nisu specifični za rak. Oni se u prvom redu odnose na opstruktivne smetnje poput slabijeg i tanjeg mlaza urina, produljenog mokrenja, napinjanja kod mikcije, retencije, renalne insuficijencije kao posljedica infiltracije ureteralnih ušća, a moguće su i iritativne smetnje i hematurija. Pacijenti sa sustavnom diseminacijom bolesti imaju kliničke manifestacije, najčešće koštanih, metastaza.

## **1.4.2. Dijagnoza i stadij karcinoma prostate**

U dijagnosticiranju ove bolesti važni su klinički pregled, serumska razina prostate specifičnog antigena (PSA) i slikovne metode (transrektalni ultrazvuk, magnetska rezonanca). Definitivna potvrda dijagnoze dobiva se biopsijom prostate pod kontrolom transrektalnog ultrazvuka ili citološkom punkcijom.

Program *screeninga* karcinoma prostate u proteklom je desetljeću izazvao brojne rasprave. Prospektivne studije PLCO ( Prostate, Lung, Ovary Cancer Trial) i RSPCS (Randomized Study for Prostate Cancer Screening) dale su proturječne rezultate pa još nema definitivne preporuke o postupanju po ovom pitanju (71,72).

### **1.4.2.1. Digitorektalni pregled**

Digitorektalni pregled (DRP) još uvijek je neizostavni korak u procjeni stanja prostate. Njime dobivamo informaciju o veličini prostate, o ograničenosti, podijeljenosti, konzistenciji i o bolnosti. U slučaju prisustva tumora njime procjenjujemo lokalizaciju, veličinu i proširenost tumora. Ova metoda je međutim insuficijentna jer je subjektivna i nedovoljno reproducibilna kako u pogledu postavljanja dijagnoze, tako i u pogledu određivanja stadija bolesti. Procijenjeno je da prisutnost abnormalnog supstrata na DRP ukazuje na rak u

15-40% slučajeva (41). Od toga ih je gotovo polovica već uznapredovala kad ih se otkrije samo na temelju abnormalnog rektalnog nalaza (41).

#### **1.4.2.2. Prostata specifični antigen (PSA)**

Prostata specifični antigen je po građi glikoprotein građen od 240 aminokiselina, molekularne mase 33 000 daltona koji se stvara u epitelnim stanicama prostate.

Po funkciji je enzim, serinska proteaza, koja ima ulogu u likvefakciji sperme.

Zbog toga ga u najvećoj koncentraciji nalazimo upravo u sjemenoj tekućini, a

tek u tisuću puta manjim koncentracijama u serumu. Gen za kodiranje PSA

nalazi se na 19. kromosomu i pripada skupini humanih kalikreinskih gena

(hKLK) kojih ima 15 (do nedavno je bilo poznato samo 3), a sam gen za PSA je

hKLK 3 gen. Zbog toga se PSA zove i humani kalikrein 3.

Povijesno gledano, PSA je otkrio Hara 1971. u sjemenoj tekućini, a 1979.

Wang i sur. nalaze ga u prostati (73,74). Od 1980. datiraju prvi radovi koji

detektiraju više vrijednosti PSA u bolesnika s karcinomom prostate (73). Od

1990. počinje šira uporaba PSA u ranom otkrivanju raka prostate, a s njim i

brojna istraživanje njegove uloge, mogućnosti i ograničenja u dijagnostici raka

prostate. Zahvaljujući širokoj uporabi PSA, danas je prisutan pomak u

otkrivanju raka prostate u njegovom ranijem stadiju. Trendovi pokazuju da je

stopa incidencije lokalizirane bolesti porasla s 62.6 /100 000 u 1987. godini na

117.7/100 000 u 1998. godini (3). Tako je u SAD-u 83% karcinoma dijagnosticirano kao klinički lokalizirana bolest. Većina od njih otkrivena je jedino na temelju povišene vrijednosti PSA (T1c stadij). Time PSA potvrđuje neprijepornu zaslugu u ranom otkrivanju raka prostate. Tako otkriveni rak prostate ima bolju prognozu nakon tretmana u usporedbi s onim otkrivenim digitorektalnim pregledom (75). Smatra se da porast PSA u serumu prethodi otprilike 6.7 godina palpabilnoj leziji (75). Unatoč njegovim prednostima, PSA još nije savršen tumorski marker. Osim raka, njegove vrijednosti u serumu povisuju benigna prostatična hiperplazija, trauma, upala, ejakulacija, instrumentalna manipulacija urotakta, razina androgena, hormonski preparati. Nadalje njegove vrijednosti variraju s dobi, rasom i volumenom prostate, a korištenje finasterida smanjuje njegovu razina na 50%.

25% kliničkih značajnih karcinoma prostate prati razina PSA ispod 4ng/mL. U 81% slučajeva to su patološki lokalizirani tumori. U rasponu od 4-10 ng/mL, što se uobičajeno smatra sivom zonom PSA zbog preklapanja s benignom prostatičnom hiperplazijom, pozitivna prediktivna vrijednost povišenog PSA je 12-32% pri negativnom DRP (76). Zbog toga se biopsijom prostate u ovom rasponu PSA karcinom dokaže kod svakog četvrtog bioptiranog pacijenta. Ako je PSA iznad 10 ng/mL uz negativan DRP postoji više od 40% vjerojatnosti da pacijent ima karcinom prostate.

Dakle, sposobnost PSA da razlikuje BPH od karcinoma nije baš impresivna, posebice u "sivoj zoni". Zbog toga se istražuju novi oblici i forme PSA koji bi

bili specifičniji. Kako bi se smanjio broj nepotrebnih biopsija rabe se *PSA velocity*, volumenu i dobi prilagođene PSA vrijednosti (*age specific PSA*, *volume adjusted PSA*), omjer slobodnog i vezanog PSA, gustoća ukupnog PSA i gustoća PSA za prijelaznu zonu.

*PSA velocity* podrazumijeva praćenje porasti vrijednosti PSA tijekom određenog razdoblja. Obično se porast od 0.75 ng/mL godišnje smatra sumnjivim na karcinom. Porast bi se trebao evidentirati barem u tri mjerenja tijekom 1.5 godina (77).

Između različitih metoda, koje se koriste sa ciljem povećanja specifičnosti T-PSA, svojom jednostavnošću i iznimnom praktičnošću, izdvaja se dobno specifičan raspon PSA (*age-specific PSA range*) temeljen na porastu T-PSA s dobi (78).

Partin i Reissigl su, neovisno, prikazali pozitivne rezultate kliničkom uporabom tog parametra navodeći povećanje osjetljivosti u mlađih i specifičnosti u starijih muškaraca, u odnosu na T-PSA test uz graničnu vrijednost 4.0 ng/mL (79, 80).

Catalona ne dijeli to mišljenje navodeći kako se korištenjem dobno specifičnog raspona PSA povećava broj nepotrebnih biopsija u mlađih, dok istodobno odgađa postavljanje dijagnoze u starijoj dobi od 60-73 godine kad bolesnici predstavljaju legitimne kandidate za radikalno liječenje (81). Do identičnog zaključka dolazi i Littrup i navodi kako standardna granična vrijednost T-PSA od 4 ng/mL predstavlja najbolji parametar za screening (82). Kliničari su upozoreni, budući Food and Drug Administration (FDA) nije odobrila dobno



specifičan raspon PSA, da s oprezom koriste tu metodu u dnevnoj kliničkoj praksi (83).

Temelj kriterija gustoće PSA prijelazne zone leži u činjenici da se tkivo BPH nalazi gotovo isključivo u prijelaznoj zoni prostate, dok se vrlo mala količina hiperplastičnog tkiva nalazi u perifernoj i centralnoj zoni pa time predstavlja zanemarivi izvor PSA. Djavan je publicirao povoljne rezultate specifičnosti ovog parametra od 20-37% uz osjetljivost od 90% i graničnu vrijednost od 0.10 ng/mL/cc, istodobno propustivši 10% karcinoma prostate. Isti je autor uz graničnu vrijednost >0.25 objavio 95% osjetljivosti i 47% specifičnosti ovog testa, ali navodi kako gustoća PSA prijelazne zone zadržava dobru dijagnostičku točnost samo za prostate veće od 30 grama, odnosno prijelazne zone veće od 20 grama (84).

Poznato je da mjerenje volumena prostate pokazuje veliki nedostatak reproducibilnosti zahvaljujući znatnim odstupanjima kod ponavljanja mjerenja od strane istog ili drugog istraživača (*intra i inter examiner* odstupanje). Ta činjenica umanjuje vrijednost gustoće PSA prijelazne zone u predikciji raka prostate kao što je nepovoljno utjecala i na prihvaćanje ukupne gustoće PSA za cijeli volumen prostate.

PSA u serumu cirkulira u slobodnom i vezanom obliku. 65-90% PSA vezano je s alfa-1-antikimotripsinom (PSA-ACT), a 10-35% cirkulira slobodno (85).

Ostatak PSA vezan je s alfa-2-makroglobulinom i alfa-1-inhibitorom proteaza (<1%). Udio slobodnog PSA veći je kod bolesnika s benignom prostatičnom

hiperplazijom pa se omjer slobodnog i ukupnog PSA koristi za povećanje specifičnosti ovog markera za karcinom prostate i redukciju broja biopsija. Uz različite granične vrijednosti za % fPSA koje variraju od 19-25% postiže se smanjenje nepotrebnih biopsija i do 20% (86,87).

Uvođenje PSA u praksu dovelo je do značajnog pomaka u preoperativnoj procjeni stadija bolesti koja se do tada bazirala samo na digitorektalnom pregledu. Dok je temeljeno samo na DRP čak 63% slučajeva pokazivalo neočekivano veći stadij bolesti, uporabom PSA ta se situacija znatno izmijenila. Uočeno je da porast PSA korelira s većim volumenom tumora te kliničkim i patološkim stadijem bolesti (88). Naime, uz negativan DRP, kada je PSA ispod 4 ng/mL, vjerojatnost lokalizirane bolesti je 81-84%; kada je PSA 4-10 ng/mL, vjerojatnost lokalizirane bolesti je 53-67% , a kod PSA u rasponu 10-20 ng/mL ta je vjerojatnost 31-56%. Uz PSA ispod 20 ng/mL vjerojatnost udaljenih metastaza u kostima je vrlo mala (75).

Zbog ograničenja PSA, ovaj se tumorski marker u predviđanju stadija bolesti kombinira sa drugim parametrima pa su nastali posebni tablični sustavi zvani nomogrami. Najpoznatiji i u kliničkoj uporabi najrašireniji nomogram načinio je Partin 1993. (33). Do danas je napravljeno preko 80 različitih vrsta nomograma koji pomažu u određivanju stadija bolesti, preživljenja bez biokemijskog relapsa, predviđanju zahvaćenosti limfnih čvorova ili sjemenih mjehurića tumorom, metastazama u kostima itd. Većina nomograma kao sastavnicu uzima u obzir i vrijednost PSA.

### **1.4.2.3. Transrektalni ultrazvuk (TRUS)**

Kod transrektalnog ultrazvuka se otprilike 70% karcinoma prikazuje kao hipoehogena zona, dok se ostatak prikazuje kao izoehogeno ili hiperehogeno područje. Osim toga kod većih tumora prikaz je heterogen, a s obzirom na infiltrativan rast tumora, ova metoda nije precizna u određivanju stadija bolesti. Glavni značaj ove slikovne metode je u boljoj orijentaciji pri uzimanju bioptičkih cilindara.

### **1.4.2.4. Biopsija prostate**

Od 1989. kada je Hodgeova predložila tehniku sekstant biopsije pod kontrolom UZV-a, dijagnostika karcinoma prostate postala je brža, sigurnija i učinkovitija (89). Do tada se koristila tehnika citološke punkcije pod kontrolom prsta i biopsija slučajnog uzorkovanja. U svom izvornom obliku sekstant biopsija je opisana kao biopsija u parasagitalnoj ravnini na polovici od sredine do ruba prostate na tri tipična mjesta sa svake strane: baza, sredina i apeks. Ova je preporuka našla utemeljenje i u analizi materijala nakon radikalne prostatektomije glede zonalne anatomije prostate i distribucije raka s obzirom na nju (90). Istraživanja su pokazala da se 70-80% karcinoma nalazi u perifernoj

zoni prostate te su iz toga proizašle brojne modifikacije ove metode. Danas je poznato da sustavna sekstant biopsija može imati i do 30% lažno negativnih nalaza (91, 92). Zbog toga su predloženi brojni protokoli koji povećavaju broj cilindara u biopsiji i određuju novu lokalizaciju bioptata (93-100). Tako sheme biopsije s 6 +2 anteriorne i/ili lateralne biopsije, s 8, 11, 12, 14 cilindara, biopsije u 5 regija te saturacijske biopsije stječu svoje pobornike, ali i one koji ih osporavaju. Levine i sur. su izvođenjem dvaju konzekutivnih setova sekstant biopsija na istom pacijentu pokazali porast od 37% u detekciji karcinoma (101). Beurton i sur. predložili su protokol s 12 cilindara jer su našli porast od 22% u detekciji karcinoma u odnosu na sekstant biopsiju (102). Kako je broj biopsija usko povezan i s veličinom prostate, Djavan i sur. predložili su Bečki nomogram kojim se postiže 90% sigurnost u detekciji karcinoma, a u kojem je broj biopsija ovisan o veličini (volumenu) prostate i dobi pacijenta (103).

Postoji razumljiv strah da povećanjem broja bioptata povećavamo šansu otkrivanja klinički nesignifikantnih karcinoma i “*over treatment*” pacijenata. Dosadašnje studije pokazuju da je nalaz konačne patohistologije nakon ekstenzivnije biopsije uporediv s nalazima nakon standardnih bioptičkih protokola te da se ne otkriva bitno veći broj nesignifikantnih karcinoma. Važno je naglasiti da s rastom stope otkrivanja karcinoma prostate pri povećanju broja bioptata ne raste značajno broj komplikacija koje ju prate (104). S porastom broja bioptata međutim, rastu troškovi dijagnostičke obrade. Zbog toga se sheme biopsije razlikuju među institucijama ovisno o izboru urologa,

financijskoj moći osiguranika/osiguravatelja ili preporukama nacionalnih uroloških udruženja. U našoj se ustanovi izvodi biopsija po Prestijevoj shemi predloženoj u recentnoj literaturi koja uključuje biopsije s 10-12 bioptata lateraliziranih prema perifernoj zoni prostate (105).

#### **1.4.2.5. Ponavljanje biopsija**

Negativan nalaz na prvoj biopsiji nije kraj dijagnostičke obrade pacijenta kod kojeg postoji klinička sumnja na karcinom prostate. Ako perzistiraju razlozi zbog kojih je učinjena prva biopsija (povišen i/ili rastući PSA, suspektan digitorektalni nalaz), biopsija se ponavlja. Najčešće se biopsija ponovi nakon 6 tjedana. Naime, ovisno o studiji, u ponavljanim biopsijama otkrije se i do 20 % karcinoma (106). Ponavljanje biopsije otvara nova pitanja oko signifikantnosti tako otkrivenih karcinoma, broja i lokacije cilindara kod ponavljanih biopsija, selekcije pacijenata za ponavljanu zahvat i sl. Na mnoga od ovih pitanja još nemamo jednoznačan odgovor. Prije svega veličina prostate značajan je činitelj koji doprinosi negativnom nalazu biopsije. Naime, uvećana prostata na račun benigne prostatične hiperplazije (BPH) dovest će do porasta PSA što može rezultirati suvišnim biopsijama. Nasuprot tome stoji činjenica da i uz BPH pacijent može imati /dobiti karcinom. Taj je problem posebno izražen u takozvanoj sivoj zoni PSA od 4-10 ng/mL. Nedostatna specifičnost povišenog

PSA za karcinom pokušava se poboljšati dodatnim testovima kao što su omjer slobodnog i ukupnog PSA (f/TPSA), gustoća PSA, gustoća PSA za prijelaznu zonu, *PSA velocity*, *age specific PSA*, itd. Njihovom uporabom smanjuje se i broj suvišnih biopsija koje su ne samo invazivne i neugodne za pacijenta nego, s obzirom na broj (i do 75% na prvoj, 80% na ponavljanim biopsijama), i značajno financijsko opterećenje. Remzi i sur. su ustanovili da u rasponu PSA od 4-10 ng/mL volumen prostate i volumen prijelazne zone predstavljaju značajan podatak u odluci o ponavljanoj biopsiji (107). Oni smatraju da pacijentu čiji je volumen prostate od 20-80 mL i volumen prijelazne zone 9-40 mL uz negativan nalaz na prvoj biopsiji treba ponoviti biopsiju. Time bi se izbjeglo 7.1% odnosno 10% ponovljenih biopsija. Karakteristike karcinoma otkrivenog na ponovljenoj biopsiji nisu bitno različiti od karcinoma otkrivenog inicijalnom biopsijom. U izvješću Djavana i sur. objavljeno je da su u prvoj biopsiji otkrili karcinom u 22% pacijenata, u ponovljenoj drugoj biopsiji u 10%, u trećoj u 5% i u četvrtoj ponovljenoj biopsiji u 4% pacijenata (108). Od toga broja 67% pacijenata imalo je lokaliziranu bolest. Djavan i sur. su utvrdili da među karcinomima otkrivenim inicijalnom i ponovljenom biopsijom nije bilo razlike u patološkom stadiju bolesti (pTNM), biopsijskom Gleasonovu zbroju kao niti konačnom Gleasonovom zbroju. Također nije uočena razlika u pojavnosti Gleasonova gradusa 4/5 niti u volumenu tumora. Utvrđeno je da je karcinom otkriven na inicijalnoj biopsiji češće bio multifokalan. Iz toga autori zaključuju da se ponovljenim biopsijama ne otkrivaju nesigifikantni karcinomi

(108). Ponavljanje biopsije posebno se savjetuje ako se otkrije PIN (prostatična intraepitelna neoplazija) jer je prisutnost karcinoma dokazana u 25-35% slučajeva kod takvih nalaza (109).

#### **1.4.2.6. Biopsijski Gleasonov zbroj**

Biopsija prostate pod kontrolom ultrazvuka pruža patologu ograničenu količinu tkiva. Analiza takvog uzorka dodatno može biti otežana tehničkim nesavršenostima preparata i artefaktima. Suradnja urologa i patologa ima veliku važnost, a dodatne informacije kao što su PSA, f/TPSA i podaci o ranijim biopsijama mogu pomoći patologu u postavljanju dijagnoze. Biopsijski određen stupanj diferenciranosti odnosno Gleasonov zbroj vrlo značajan podatak te ga treba određivati s posebnom pažnjom imajući u vidu da će kliničar na temelju tog podatka donositi određene odluke. Poznato je da Gleasonov zbroj na biopsiji korelira i sa stupnjem proširenosti bolesti (110). Viši Gleasonov zbroj povezan je s lošijim stadijem bolesti (111). Kod Gleasonova zbroja 7 bolest je lokalizirana u samo 29% slučajeva (110, 112). Stupanj proširenosti bolesti je od presudne važnosti za odluku o vrsti liječenja koje će se ponuditi pacijentu. Rijetki će se urolozi odlučiti operirati pacijenta sa slabo diferenciranim tumorom s obzirom da i Europsko urološko društvo preporuča prostatektomiju kao metodu izbora za lokaliziranu bolest (113). To stavlja pred patologa tešku

zadaću određivanja Gleasonova zbroja na bioptatu kao parametra diferenciranosti tumora i postavlja pitanje pouzdanosti ovog nalaza.

Većina studija iz ovog područja govori o problemu podcijenjenosti stupnja diferenciranosti tumora na biopsiji, takozvanog *understaginga*, koji je prisutan u rasponu od 20-45% nalaza. Manji je problem precijenjenost Gleasonova zbroja na biopsiji (*overstaging*) koji je prisutan u 3-32% slučajeva (111, 114, 115, 116).

Podcijenjenost je najčešća kod biopsijskog Gleasonova zbroja 5 i 6.

Razlika je najčešća za –1 Gleasonov grade. Češće su pogreške kod dobro diferenciranih tumora pa kad se učini revizija nalaza od strane uropatološkog eksperta Gleasonov zbroj 2, 3 ili 4 obično se procjenjuje kao Gleason zbroj 5 ili 6. Zbog toga eksperti ne preporučuju dodjeljivanje niskog stupnja diferenciranosti od 2-4 na biopsijskom materijalu (115).

#### **1.4.2.7. Ostale slikovne metode.**

Osim transrekatalnog ultrazvuka među slikovnim metodama mogu se rabiti CT, MRI, scintigrafija skeleta. Danas se CT rutinski koristi u planiranju radioterapije. MRI kao znatno skuplja i ne posvuda dostupna metoda ima veću specifičnost u određivanju stadija bolesti. Glavni nedostatak ovih metoda je njihova osjetljivost od najviše 70%. Bolje kvalitete ima endorektalna, dinamička MRI čija točnost u određivanju stadija varira od 51-92% (110). Oprema je



skupa, a zahtijeva i posebno uvježbano osoblje i iskusnog radiologa. Inovacije na tom području kao što je MRI spektroskopija kojom se određuje stadij bolesti temeljem slikovnog prikaza biokemijskih razlika u građi stanične membrane normalne i tumorske stanice (omjer kolina i citrata) još su u fazi kliničkog ispitivanja (117).

Scintigrafija skeleta pomoću  $^{99m}\text{Tc}$ -metilen difosfonata vrlo je osjetljiva metoda u otkrivanju koštanih metastaza. Oesterling i sur. na temelju istraživanja preporučili su da se ova pretraga ne izvodi kod asimptomatskih pacijenata s  $\text{PSA} < 10 \text{ ng/mL}$  (118).

#### **1.4.2.8. Molekularne metode.**

Molekularni *staging* odnosi se na otkrivanje prisutnosti cirkulirajućih karcinomskih prostatičnih stanica u perifernoj krvi. RT-PCR otkriva prisutnost mRNA za PSA u krvi. Klinički značaj ovog nalaza još uvijek nije jednoznačno utvrđen. Radioimunoscintigrafski *sken* s monoklonalnim antitijelima je obećavajuća metoda koja otkriva mikroskopske depozite karcinoma na udaljenim mjestima. Monoklonsko protutijelo za PSMA (prostatični membranski glikoprotein pojačano izražen na membrani karcinomskih stanica) je keliran s Indijem i koristi se u imunoscintigrafske svrhe. Poznat je kao ProstaScint. On otkriva zahvaćenost limfnih čvorova tumorom sa senzitivnošću

od 62% i sa specifičnošću od 72% (117). U tijeku su ispitivanja s drugom generacijom monoklonskih antitijela specifičnih samo za izvanstaničnu domenu PSMA i preliminarni rezultati su ohrabrujući.

#### **1.4.2.9. Pelvična limfadenektomija**

Pelvična limfadenektomija pruža najtočniju informaciju glede proširenosti tumora na regionalne limfne čvorove. Nekada se ova operacija izvodila zasebno, a danas se rutinski obavlja u sklopu radikalne prostatektomije. Intraoperativno se limfni čvorovi šalju na *ex tempore* analizu i ovisno o rezultatima operacija se nastavlja ili se od nje odustaje. Kako je vjerojatnost zahvaćenosti limfnih čvorova u osoba koje imaju PSA<10 svega 1%, neki autori smatraju da se u takvih pacijenata limfadenektomija ne mora rutinski izvoditi (119).

## 1.5. LIJEČENJE

### 1.5.1. Rizične skupine bolesnika

Ishod liječenja i prognoza u velikoj mjeri ovise o prognostičkim parametrima kojima su definirane i skupine rizika.

Klasične (D'Amicove) rizične skupine bolesnika definirane su s obzirom na klinički stadij, PSA i Gleasonov zbroj (120):

1. Niski rizik      cT1-T2a i Gleasonov zbroj <7 i PSA <10 ng/mL
2. Srednji rizik    cT2b-T2c ili Gleasonov zbroj =7 ili PSA 10-20 ng/mL
3. Visoki rizik     cT3a ili Gleasonov zbroj >7 ili PSA >20 ng/mL

Dodatno se u skupini niskog rizika koriste parametri kvantitativne patohistologije (Tablica 1).

### 1.5.2. Aktivni nadzor i oprezno čekanje

Aktivni nadzor je pristup bolesnicima s rakom prostate koji su klasificirani temeljem biopsijskih i biokemijskih parametara u skupinu bolesnika niskog rizika i kod kojih se sustavnim praćenjem nastoji uočiti eventualna progresija bolesti dok je bolest još u lokaliziranom stadiju te se bolesnik tada podvrgava definitivnom liječenju s ciljem izlječenja. Svi ostali u toj skupini time

su pošteđeni morbiditeta terapijskih postupaka koji niti kod radikalne prostatektomije niti kod zračenja nisu zanemarivi.

Idealni bolesnici za aktivni nadzor bili bi oni s insignifikantnim rakom prostate kod kojih bi radikalno liječenje predstavljalo suvišan i nepotreban tretman. Ostaje problem precizne definicije bolesnika niskog rizika i definicije insignifikantnog raka prostate o kojoj se govori u ranijem poglavlju.

Tablica 1. Skupina bolesnika niskog rizika (u nekih autora poistovječena sa insignifikantnim rakom) i kriteriji za aktivni nadzor.

	Autor studije (ref.)	Kriteriji
1.	Epstein i sur. (58)	Stadij cT1c-2, Gleasonov zbroj $\leq 6$ , PSAD $\leq 0.15$ ng/ml/ml, 2 i manje pozitivna cilindra, u cilindru manje od 50% tumorskog tkiva
2.	Bastian i sur. (67)	Stadij cT1c-2, Gleasonov zbroj $\leq 6$ , PSAD $\leq 0.15$ ng/ml, 2 i manje pozitivna cilindra, u cilindru manje od 50% tumorskog tkiva
3.	D'Amico i sur. (120)	cT2a, PSA $\leq 10$ ng/ml, Gleasonov zbroj $\leq 6$
4.	Patel i sur. (121)	cT2, Gleasonov zbroj $\leq 7$
5.	Soloway i sur. (122)	Stadij cT2, Gleasonov zbroj $\leq 6$ , PSA $\leq 0.15$ ng/ml, 2 i manje pozitivna cilindra, u cilindru manje od 50% tumorskog tkiva
6.	Van den Bergh i sur. (PRIAS) (123)	Stadij T1c-T2b, Gleasonov zbroj $\leq 6$ , PSA $\leq 10$ ng/ml, PSAD $\leq 0.20$ ng/ml/ml, 2 i manje pozitivna cilindra
7.	Van As i sur. (124)	cT1-T2a, PSA $\leq 15$ ng/ml, Gleasonov zbroj $\leq 7(3+4)$ , $\leq 50\%$ pozitivnih cilindara
8.	Dall'Era i sur. (uobičajeni kriteriji) (125)	PSA $\leq 10$ ng/ml, Gleasonov zbroj $\leq 6$ , $\leq 33\%$ pozitivnih cilindara, u cilindru manje od 50% tumorskog tkiva

Ovaj pristup treba razlikovati od opreznog čekanja (*watchfull waiting*) kod kojeg su princip praćenja i izbor bolesnika sasvim drugačiji. Kod opreznog čekanja je riječ o uvođenju tretmana koji je po svojoj intenciji palijacijski, (dakle cilj nije izlječenje) u trenutku kad bolest klinički progredira. Bolesnici u ovoj skupini mahom su sa uznapredovalim rakom ili oni koji ne prihvaćaju

postojeće oblike definitivnog liječenja ili njihove komplikacije, a imaju kratko očekivano trajanje života. Progresijom se uvodi androgena deprivacija bilo kirurškom ili kemijskom kastracijom u svrhu smanjenja progresije, boli i prevencije patoloških fraktura kod koštanih metastaza.

### **1.5.3. Radikalna prostatektomija**

Radikalna prostatektomija indicirana je u pacijenata kod kojih je moguće izlječenje, a živjet će dovoljno dugo da od liječenja imaju koristi (119). Pri razmatranju ovog modaliteta liječenja obično razmatramo parametre vezane uz pacijenta te one vezane uz bolest. Kod pacijenta moramo razmotriti dob, komorbidna stanja i njegov osobni izbor. Sa strane bolesti razmatramo klinički stadij bolesti, biopsijski Gleasonov zbroj i preoperativni PSA.

DOB. Smatra se da je ova operacija indicirana kod pacijenata čije je očekivano trajanje života barem 10 godina (113). Time je izbjegnuto i koncept arbitrarnog određivanja dobne granice iznad koje ovaj modalitet liječenja ne bi bio razmatran. Naime, neki su pacijenti i u poznoj dobi vrlo vitalni i imaju očekivano trajanje života dulje od prosjeka za svoju dob. Nasuprot tome postoje pacijenti mlađe životne dobi kojima druge bolesti onemogućuju ovakvo liječenje. Stoga je obavezan individualizirani pristup pacijentu. Pacijenta je važno upoznati i sa rizicima i koristima od kirurškog liječenja, komplikacijama, rizicima anestezije te drugim modalitetima liječenja.

KOMORBIDNA STANJA. Prateće bolesti, bez obzira na dob, smanjuju pacijentove izgleda za kirurško liječenje. Bolesti kardiovaskularnog sustava, respiratorne i druge bolesti smanjuju očekivano trajanje života i povećavaju rizik anestezije.

PACIJENTOV IZBOR. Neki pacijenti *a priori* odbijaju kirurško liječenje zbog straha od operacije, dok drugi vjeruju jedino u moć kirurškog skalpela kad je maligna bolest u pitanju. Ovakvi različiti stavovi rezultat su brojnih čimbenika: ranijih operacija, zdravstvenog odgoja i prosvijećenosti, osobnih uvjerenja. Nakon što je pacijentu pružena puna informacija o njegovoj bolesti, raspoloživim terapijskim opcijama i njihovim prednostima i rizicima treba poštovati njegov konačan izbor liječenja.

KLINIČKI STADIJ BOLESTI. Radikalnoj prostatektomiji podvrgavaju se pacijenti s klinički lokaliziranim karcinomom. Klinički stadij bolesti određuje se digitorektalnim pregledom, serumskim tumorskim markerima, biopsijskim Gleasonovim zbrojem, slikovnim metodama ( TRUS, magnetska rezonanca, scintigrafija skeleta) (7). Ovim pretragama razlučujemo klinički lokalizirani, lokalno uznapredovali i metastatski rak prostate. Patološki se stadij bolesti unatoč tome može razlikovati od kliničkog. Od 1993. u široj su uporabi Partinove tabele kojima predviđamo konačni patološki stadij (33, 34). Prema TNM klasifikaciji za rak prostate iz 2002. lokaliziranom se bolešću smatra T1a, T1b, T1c te T2a, T2b i T2c stadij bolesti (16).

**T1a** predstavlja karcinom slučajno otkriven nakon TURPa ili otvorene prostatektomije u manje od 5% tkiva. U ovom se slučaju obično razmatra nadzirano praćenje, a radikalna prostatektomija se razmatra ako je očekivano trajanje života veće od 15 godina ili je tumor slabo diferenciran (113).

**T1b** (više od 5% tumora u tkivu odstranjenom TURPom ili otvorenom prostatektomijom) Pacijentima se savjetuje operacija ako je očekivano trajanje života dulje od 10 godina. Tehnička izvedba operacije katkad je otežana prethodnom TURP.

**T1c** predstavlja karcinom pronađen na biopsiji prostate koja je poduzeta jedino zbog povišenog PSA. Podignuta razina svijesti o važnosti godišnjih pregleda muškaraca starijih od 50 godina kao i PSA testiranje dovela je do pomaka stadija bolesti od ranije dominantnog uznapređovalog ka T1c karcinomu (5). U zapadnim zemljama 70-80% karcinoma svrstano je u ovaj stadij. Važno je ipak napomenuti da je ovo heterogena skupina karcinoma jer nakon radikalne prostatektomije neki su lokalizirani a neki lokalno uznapređovali karcinomi. Oesterling i suradnici izvijestili su da je 30% T1c karcinoma lokalno uznapređovalo, a 11-16% su insignifikantni (118).

**T2** stadij bolesti i očekivano trajanje života dulje od 10 godina definitivno trebaju radikalno liječenje. Ako je tumorom zauzet samo jedan lobus, 50% će progredirati, a u slučaju zauzetosti oba režnja tumorom, čak 70% će progredirati u petogodišnjem razdoblju (113).

**T3 stadij** bolesti za većinu urologa nije indikacija za radikalnu prostatektomiju. Ovo pitanje još je uvijek predmet rasprava jer, iako je poznato da ovi pacijenti imaju veću šansu pozitivnih limfnih čvorova i lošeg ishoda liječenja, neki smatraju da u slučaju minimalnog T3a stadija operacija može dovesti do izlječenja (126, 127). Lerner i sur. zastupaju takvo stanovište (128). Mora se međutim uzeti u obzir i problem *staginga*. Naime, 15% T3 tumora je precijenjenog stadija (zapravo su T2 tumori), a 8% su podcijenjenog stadija (*understaged*) i zapravo su T4 tumori (113).

**BIOPSIJSKI GLEASONOV ZBROJ.** Unatoč dobroj podudarnosti Gleasonova zbroja na biopsiji i konačnom nalazu nakon prostatektomije problem *undergradinga* još uvijek je značajan. Većina urologa uzima graničnim Gleason zbroj od najviše 8 za radikalnu prostatektomiju.

**PSA VRIJEDNOST.** Multivarijatna analiza pokazala je da PSA neovisni prediktor progresije bolesti (1). S obzirom na značajno preklapanje vrijednosti PSA u različitim stadijima bolesti ovaj se parametar ne koristi samostalno u indiciranju radikalne prostatektomije (75). Većina kliničara rabi Partinove tablice u svakodnevnoj praksi (33, 34). Obično se operacija savjetuje ako je  $PSA < 20\text{ng/mL}$ , iako nije neprihvatljivo zahvat raditi i kod nešto viših vrijednosti.

Osim perinealnog i retropubičnog pristupa sve se više vrše laparoskopske, a u najnovije vrijeme i robotske radikalne prostatektomije. Ove metode zadovoljavaju sve postulate onkološke kirurgije, ali je krivulja učenja vrlo duga,



a potrebna je i posebna oprema. Prve laparoskopske operacija opisane početkom 90-tih godina trajale su prosječno 9.4 sati. Danas se usavršavanjem vještine operatera ova operacija izvodi u gotovo jednakom trajanju kao i otvorene operacije. Preliminarni rezultati pokazuju da je ovaj pristup komparabilan u kontroli bolesti, postoperativnoj inkontinenciji i impotenciji, dok je gubitak krvi tijekom operacije čak manji u odnosu na otvorene operacije. Stopa preživljenja za sada se još ne može uspoređivati i bit će potrebno još neko vrijeme da se ustanovi utjecaj metode na istu (129).

Postoperativne komplikacije ove operacije, bez obzira na pristup, prisutne su u nekoj mjeri u svim centrima. Rizik inkontinencije nakon radikalne prostatektomije varira od 5-10% kada ga prijavljuju kirurzi u velikim serijama, a 19-31% ako se pacijenti izjašnjavaju putem upitnika (130). Postoperativnu seksualnu funkciju bi trebalo prosuđivati obzirom na onu koju je pacijent imao prije operacije. Kako je riječ većinom o starijim pacijentima, neki od njih i s udruženim bolestima poput diabetesa, često je već i preoperativna seksualna funkcija slabija. Uvođenjem *nerve-sparing* tehnike ova je komplikacija u određenoj mjeri smanjena. Tako Quinlan i sur. sa Sveučilišta Johns Hopkins izvješćuju o 58% odnosno 82% očuvanoj potenciji ako je sačuvan jedan odnosno oba neurovaskularna snopa (131).

Catalona u novijem radu izvješćuje na seriji od 1870 pacijenata o stopi od 68% očuvanih erekcija ako su očuvana oba snopa, odnosno 47% ako je očuvan samo jedan (132).

#### 1.5.4. Radioterapija

Radioterapija podrazumijeva korištenje ionizirajućeg zračenja u liječenju raka prostate. Liječenje raka prostate ovom metodom može biti primarno (radikalna radioterapija), adjuvantno (postoperacijsko zračenje) i palijativno (zračenje metastaza). Ovisno o poziciji izvora zračenja može se provoditi teleradioterapija ili *external beam* radioterapija kada je isti udaljen od tkiva koje se zrači ili brahiterapija kada se izvor stavlja u samu prostatu. Napretkom tehnologije sve se više napušta metoda konvencionalne radioterapije gdje se za ciljani volumen koristio dijaskop. Danas se rabi takozvana konformalna radioterapija kod koje se za planiranje zračenja koristi kompjuterizirana tomografija (CT).

*Radikalna radioterapija* može se provoditi kao oblik liječenja s ciljem izlječenja u bolesnika s lokaliziranim karcinomom prostate i alternativa je radikalnoj prostatektomiji. Smatra se postupkom izbora za bolesnike s T3N0M0. Kod konvencionalne radioterapije koriste se 4 fotonska snopa od 66-70 Gy za T1 i T2 te 72 Gy za T3 stadij bolesti. Komparacija s uspješnošću radikalne prostatektomije je teška jer su karakteristike i preoperativne varijable pacijenata uključenih u radijacijsko liječenje bitno različite od onih koji su liječeni kirurški. Naime, većina pacijenata liječenih radikalnom prostatektomijom bila je bez pozitivnih limfnih čvorova, nižeg preoperativnog PSA i boljeg stupnja diferenciranosti. Osim toga početne studije bazirale su se na uporabi isključivo konvencionalne terapije u koje je i do 30% pacijenata imalo ozračen

neadekvatan volumen. Jedina randomizirana usporedna studija radikalne prostatektomije i radioterapije pokazala je prednost radikalne prostatektomije u smislu preživljenja uz ozbiljne zamjerke dizajnu studije (133). Brahiterapija je pokušaj da se dovođenjem izvora zračenja u samu prostatu postigne maksimalan učinak na tumorske stanice uz minimalno djelovanje na okolno tkivo. Zbog toga se u prostatu stavljaju permanentni ili privremeni implantati I-125 ili Pd-103. Rane su studije pokazivale nižu učinkovitost ove terapije u odnosu na teleradioterapiju, ali uz primjenu TRUSa novije studije pokazuju jednaku ili čak bolju učinkovitost ovog modaliteta zračenja u odnosu na ostale, osobito u skupini pacijenata niskog rizika (134).

### **1.5.5. Hormonska terapija**

Više od 50 godina poznata je činjenica da je karcinom prostate hormonski ovisan tumor. Hormonskom manipulacijom služimo se kada pacijent ima lokalno ili sustavno uznapredovalu bolest i kod kojeg radikalno liječenje više ne predstavlja terapijsku opciju te u slučaju kada radikalno liječenje ne daje očekivanu kontrolu bolesti. Na raspolaganju nam stoje kirurška kastracija (bilateralna orhidektomija), estrogeni, LHRH agonisti, antiandrogeni.

Kirurška kastracija jednostavna je i vrlo jeftina metoda kojom se uklanja testikularno tkivo, točnije Leydigove stanice kao glavni proizvođači

testosterona. One su odgovorne za 90-95% serumske razine ovog hormona, dok se ostatak proizvede metaboliziranjem androgena iz nadbubrežne žlijezde. Ova metoda je nekim pacijentima neprihvatljiva iz psiholoških razloga i radije biraju farmakološku kastraciju.

Estrogeni putem negativne povratne sprege inhibiraju lučenje LHRH iz hipotalamusa i na taj način koče hipotalamo-hipofizno-testikularnu osovinu. Ovi su lijekovi poput dietilstilbestrola zbog ozbiljnosti svojih nuspojava (u prvom redu kardiovaskularnih) rjeđe u uporabi (135). Intramuskularna primjena poliestradiol fosfata navodno smanjuje kardiovaskularnu toksičnost (136).

LHRH agonisti ( buserelin, goserelin, triptorelin, leuprorelin) imaju paradoksalan učinak da nakon početne stimulacije hipofizno-testikularne osovine (takozvani "flare fenomen" u prvih 2-3 tjedna) dovode do njezine blokade i kastracijskog efekta. Danas se oni rabe u obliku depot-preparata pa je i primjena jednostavnija, a suradnja pacijenata odlična. Važno je naglasiti da zbog *flare fenomena* davanje ovih lijekova treba uvijek započeti u kombinaciji s antiandrogenima kako bi se spriječilo kliničko pogoršanje ili čak nagla smrt (137). Antiandrogeni su lijekovi koji kompetiraju s androgenima na razini receptora. Ovisno o kemijskoj strukturi razlikujemo steroidne (ciproteron acetat) i nesteroidne (flutamid, bicalutamid i nilutamid) antiandrogene. Ciproteron acetat osim antiandrogene aktivnosti ima i progestagensku aktivnost pa suprimira i sekreciju LH. Zbog toga ciproteron acetat ima za nuspojave i gubitak libida i erektilnu disfunkciju. Za razliku od njega nesteroidni antiandrogeni

djeluju isključivo na razini receptora i ne remete sintezu testosterona pa je u njih prisutan libido i seksualna aktivnost. Zbog toga se ističe njihova prednost u kvaliteti života u odnosu na kastraciju (138). Njihove nuspojave uključuju ginekomastiju i bol u prsima, a čini se da bikalutamid izaziva manje proljeva i toksičnih lezija jetre (139).

Neki istraživači naglašavaju važnost potpune androgene blokade (*MAB-maximal androgene blockade*) jer se oko 5% cirkulirajućeg testosterona stvara iz metabolita nadbubrežne žlijezde. Zbog toga je uveden koncept maksimalne androgene blokade koja kombinira antiandrogene s kirurškom ili farmakološkom kastracijom. Učinkovitost ovog liječenja još je uvijek kontroverzna. Dok studija Crawforda i sur. pokazuje poboljšanje preživljenja bolesnika tretiranih MAB terapijom u odnosu na monoterapiju, studija Eisenbergera i sur. nije pokazala razlike u preživljavanju (140, 141). Rezultati Medical Research Council (MRC) pokazali su da je ukupno i bolest specifično preživljenje bolje u skupini koja je odmah dobila hormonsko liječenje u odnosu na onu kod koje je isto bilo odgođeno (142).

### **1.5.6. Hormonski refrakteran karcinom prostate**

Tijekom vremena mnogi pacijenti će unatoč hormonskoj terapiji imati progresivnu bolest. Obično se nakon 18-24 mjeseca od uvođenja hormonske

terapije javlja relaps bolesti. U manje skupine pacijenata kraća kontrola bolesti postiže se hormonskom manipulacijom; ukidanjem antiandrogene terapije uz tzv. *withdrawl syndrome* ili dodavanjem druge linije terapije kao što je ketokonazol ili niske doze DES. Obično ova poboljšanja ne traju dulje od 6 mjeseci. Medijan preživljenja za pacijenta kojima je dijagnosticirana hormonski refrakтерна bolest je 12-20 mjeseci. Unatoč lošoj prognozi još je moguće liječenje sustavnom kemoterapijom koja za sada uključuje kombinaciju estramustin/taxan u prvoj liniji i mitoxantron/prednisolon u drugoj liniji (143). Pacijenti koji prestanu reagirati na ovu terapiju mogući su kandidati za kliničke studije lijekova koji još nisu u rutinskoj praksi (143).

### **1.5.7. Novije metode liječenja**

Fokusirani ultrazvuk visokog intenziteta ili HIFU (High intensity focused ultrasound) je alternativni, minimalno invazivni postupak liječenja kod kojeg se transrektalnom sondom karcinom izlaže ultrazvučnim valovima visokog intenziteta koji dovode do koagulacijekse nekroze. U tijeku su i brojne studije koje ispituju alternativne postupke liječenja koje uključuju imunoterapiju, gensku terapiju, primjenu inhibitora faktora tumorskog rasta, primjenu blokatora receptora za endotelin i dr. Rezlutati ovih ispitivanja su ohrabrujući, iako za sada šira primjena ovih modaliteta nije uvriježena.

## 1.6. Prognostički biomarkeri kod raka prostate

Molekularna biologija nastanka i progresije raka prostate karakterizirana je aktivnošću brojnih regulatornih puteva, kako u samoj epitelnoj stanici prostate, tako i u okolnom vezivnom tkivu. Ovi se regulatorni putevi mogu grupirati u apoptozu, aktivaciju androgenog receptora, provođenje signala, regulaciju staničnog ciklusa, stanične kohezije i adhezije te angiogeneze (Tablica 2).

Tablica 2. Primjeri molekularnih promjena i potencijalnih markera kod raka prostate (prilagođeno prema ref. 144.)

Proces	Ključne molekule/markeri
Apoptoza	p53, Bcl-2, apoptotički index, Ki67
Androgena stimulacija	AR, AR ligandi
Provođenje	Epidermalni faktor rasta (EGF), EGF receptor
Regulacija staničnog ciklusa	c-Myc, p16 <sup>INK4A</sup> , p27 <sup>KIP1</sup> , pRb,
Stanična adhezija i kohezija	E-cadherin, $\alpha$ -catenin, metaloproteinaze, hondroitin sulfat
Angiogeneza	VEGF, VEGF receptori, dušikov oksid

AR-androgen receptor; VEGF-vascular endothelial growth factor.

Varijacije u DNA, RNA i/ili razini proteina koji sudjeluju u ovim procesima su potencijalni biomarkeri za prognozu i liječenje. Svi se novi markeri uspoređuju s već ustanovljenim prognostičkim faktorima kao što su PSA, Gleasonov zbroj, klinički i patološki stadij bolesti i sl. (144).

## 1.7. C-MYC

C-myc (*engl. cellular myelocytomatosis*) gen se nalazi na kromosomu 8q24 i sastoji se od 3 eksona. Isprva su njegovi analozi otkriveni u životinja i to davne 1911. godine kada je Peyton Rous primjetio da sarkom pileta može biti prenesen putem ekstrakta tumora bez stanica, vjerojatno virusima. Potencijalni ciljni gen identificiran je kao v-onkogen kojeg mogu inducirati retrovirusi. Analog virusnom onkogenu v-mycu otkriven u stanicama nazvan je c-myc (c-celularni). Unazad 2 desetljeća značajan je napredak učinjen u razumijevanju funkcije c-myc u normalnim i tumorskim stanicama. C-myc djeluje na niz bioloških procesa uključujući staničnu proliferaciju, rast, progresiju staničnog ciklusa (modulacijom ciklina, ciklin ovisnih kinaza, ciklin ovisnih inhibitora kinaza i fosfataza), staničnu transformaciju i diferencijaciju, metabolizam (glukoze, aminokiselina i DNA), angiogenezu (regulacijom VEGF), staničnu adhezivnost i mobilnost (regulacijom sinteze integrina) te apoptozu (145).



Kao regulator staničnog ciklusa pojavljuje se nakratko u zdravim stanicama tijekom diobe omogućujući progresiju G1 u S fazu ciklusa te G2 u M i potom nestaje (146). U normalnoj stanici c-myc je reguliran putem mehanizama staničnog ciklusa i vanjskim signalima kao što su faktori rasta. U fazi mirovanja izraženost c-myc je vrlo slaba, ali djelovanjem faktora rasta upravo se ovaj gen rano i snažno aktivira. Nakon završetka stanične diobe izraženost c-myc u stanicama kćerima ponovno je niska do ulaska u novu diobu. Ako pak normalna stanica pokaže pojačanu ekspresiju c-myc aktivira se p19/p14ARF i p53 ovisni put apoptoze i takva stanica umire (146).

C-myc protein obično stvara obligatni dimer sa Max proteinom, a potom djeluju na čitav niz staničnih funkcija. Tako preko N-terminalne c-myc regije stupaju u interakciju sa proteinima koji su uključeni u transkripciju. Takvi su TRRAP koji se veže sa histonskom acetilazom GCN5 koja omogućuje pristup općih transkripcijskih faktora kromatinu odnosno DNA (npr. TFIIE, TBP) (147).

C-myc je izražen tijekom embriogeneze i u visoko proliferativnim tkivima odrasle osobe. Dvojna funkcija c-myc omogućuje njegovo sudjelovanje u staničnom rastu i proliferaciji, ali i inhibiciji terminalne diferencijacije i apoptozi. Senzibilizacija stanice za apoptozu putem c-myc odvija se preko proapoptotičkih stimulusa poput hipoksije, oštećenja DNA, THF, CD95 itd. C-myc tijekom apoptoze oslobađa citokrom c iz mitohondrija u citosol preko Bax koji mitohondrijalnu membranu čini poroznijom. Citokrom c nadalje sa Apaf-1 i prokaspazom-9 stvara „kotač smrti“. Potom se pokreće kaskada aktivnosti

kaspaza koje rezultiraju staničnom degradacijom. Drugi putevi uključuju indirektnu aktivaciju p53 tumorskog supresora preko androgenog receptora i Baxa (148).

No ekspresija c-myc bitno je različita u malignim stanicama. Njegova deregulacija rezultira poremećajem umnažanja i terminalne diferencijacije stanica što ga svrstava u red onkoproteina. Deregulacija c-myc može rezultirati apoptozom, genomskom nestabilnošću, bijegom od imunološkog nadzora, nekontroliranom proliferacijom neovisnošću o stimulaciji faktorima rasta i besmrtnošću (149, 150).

Za razliku od strogo reguliranog c-myc u normalnim stanicama koji se izražava kratko vrijeme tijekom stanične diobe, kod tumora je njegova ekspresija neregulirana i može rezultirati raznim genetskim aberacijama. Sada je nedvojbeno da poremećena izraženost c-myc gena važna u razvoju mnogih humanih tumora. Pojačano je izražen u stanicama raka dojke, jednjaka i crijeva. Pojačana izraženost c-myc gena i proteina prisutna je u 80% karcinoma dojke, 70% karcinoma kolona, 90% ginekoloških karcinoma, 50% hepatocelularnih karcinoma i kod nekih Non Hodgkinovih limfoma te Burkittova limfoma (151).

Poremećaj ekspresije c-myc rezultira genomskom nestabilnošću, nekontroliranim staničnim rastom, bijegom od imunološkog nadzora i kontrole rasta i poremećajem apoptoze.

Aktivacija c-myc gena u tumorima se odvija na nekoliko načina: mutacijom, amplifikacijom, translokacijom, pojačanom ekspresijom, pojačanom proteinskom stabilnošću (150). Kromosomske translokacije kakve nalazimo kod Burkittova limfoma aktiviraju c-myc jukstaponirajući ga kraj gena za imunoglobuline koji su pojačano aktivni u limfomima. U solidnim karcinomima češći je poremećaj amplifikacija gena. Takav se poremećaj primjećuje kod raka pluća, glioblastoma, melanoma, raka jajnika i vrata maternice (150, 151).

Istraživanja izraženosti c-myc onkoproteina kod raka prostate rijetka su i proturječna. Osim u karcinogenezi pretpostavlja se da c-myc ima važnu ulogu u progresiji raka prostate. Naime gen c-myc je amplificiran u lokalno uznapredovalim i metastatskim tumorima (152, 153). Sato i sur. našli su da je amplifikacija myc gena prediktivna za sistemsku progresiju i smrt od raka prostate (154). Amplifikacija gena c-myc prisutna je u 30-50% karcinoma prostate, a pojačana ekspresija proteina c-myc u do 70% karcinoma prostate (155). Quian je fluorescentnom in situ hibridizacijom utvrdio pojačanu amplifikaciju c myc gena u tumorima višeg Glesonova zbroja (156). Važno je naglasiti različitost ekspresije gena c-myc i c-myc proteina. Izraženost c-myc *proteina* u prognostičke svrhe malo se proučavala. Prowatke i sur. su našli negativnu korelaciju izraženosti c-myc onkoproteina sa stadijem (pTNM) i gradusom bolesti (Gleasonov sustav) (157). Postavili su hipotezu da je smanjena ekspresija c-myc proteina odraz njegove uloge u indukciji apoptoze te da je ona u uznapredovalim tumorima smanjenjem prisutnosti c-myca poremećena te da

ista ima prognostičku vrijednost ekspresije u pogledu stadija i gradusa bolesti. Recentni rad Gurelove pokazao je da pojačana ekspresija onkoproteina myc nije nužno u korelaciji s amplifikacijom gena c-myc, sugerirajući da postoje alternativni načini njegove pojačane ekspresije (158). Gurelova i sur. su pokazali prisutnost pojačane ekspresije c-myc proteina u HGPIN, primarnom i metastatskom karcinomu. Odnedavno je moguća imunohistokemijska metoda utvrđivanja ovog antigena u stanicama.

## **1.8. CAVEOLIN-1**

Caveolini su integralni membranski proteini koji imaju važnu ulogu u transportu molekula kroz staničnu membranu. Caveolin je isprva nađen u Golgijevom aparatu i enoplazmatskoj mrežici, a potom i u staničnoj membrani. On je sastavni dio membranskih invaginacija koje su prvi put otkrivene još davne 1952. kao endocitičke strukture odgovorne za prijenos molekula u endotelnim stanicama. Sam protein cavelin je otkriven tek 1992. Kod sisavaca su za sintezu caveolina odgovorna tri gena pa su posljedično njihovi analogni proteini nazvani caveolin-1, caveolin-2, caveolin-3. Caveolin-2 prevladava u Golgijevom aparatu stanice i ne može ga samostalno napustiti, dok caveolin 3 prevladava u skeletnom i srčanom mišiću. Smatra se da caveolin-1 ima važnu ulogu u prijenosu staničnih signala, molekularnom transportu i adheziji stanica. Važna

mu je uloga u prometu kolesterola (159). U recentnoj studiji postavlja se hipoteza da je uloga caveolina regulatorna, a ne strukturalna te da regulira interakciju kaveola sa aktinskim kortikalnim citoskeletom te određuju jesu li kaveole na staničnoj površini ili putuju u stanični citosol (159,160).

U tumorigenezi mu je uloga dvojaka. Ovisno o vrsti tumora utvrđen je i pozitivni i negativni učinak cav-1 na progresiju (160). U nekim tumorima on je protein povezan sa inhibicijom rasta (160, 161, 162). Gen za cav-1 smještan je na lokusu D7S522 kromosoma 7q31.1 koji je podložan deleciji u humanim karcinomima (161). Suprimirajući učinak na tumore je potvrđen kod karcinoma dojke (163), karcinomu pluća (164) i u transformiranim fibroblastima strome kod kojih c-myc onkoprotein sprječava cav-1 ekspresiju (165). Nasuprot tomu, promotorska uloga kod tumora je povezana sa fosforilacijom tirozina i serina i njegova pojačana ekspresija dokazana je u karcinomu jednjaka, bubrega, mozga i prostate i prediktor je loše prognoze i kraćeg preživljenja (167, 168, 169). Dakle, prognostički značaj proteina caveolina-1 je dihotoman i ovisi o vrsti tkiva i stadiju bolesti. Caveolin-1 je pojačano izražen u metastatskom raku prostate (169). Kada ga luče stanice raka prostate djeluje kao autokrini/parakrini faktor koji suprimira apoptozu i osjetljivost stanica na androgenu stimulaciju te ima i ulogu u patološkoj angiogenezi (170, 171). Pojačana izraženost caveolina-1 povezana je i s kraćim vremenom do biokemijskog relapsa i lošijom prognozom. Utvrđeno je da je caveolin 1 reguliran od strane c-myc i da suprimira c-myc induciranu apoptozu (172). Stoga je razumna pretpostavka da interakcija c-myc i

caveolina-1 ima ulogu u tumorskoj progresiji, a njihov status može biti informativan za signifikantnost tumora, odnosno njegov potencijal da progredira i metastazira (173).

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

### **2.1. Hipoteza rada**

Dosadašnja istraživanja su pokazala da nema sasvim pouzdanih preoperativnih parametara signifikantnog raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika.

Proteini c-myc i caveolin-1 su još neispitani markeri tumorske progresije u ovom okviru i nepoznat je značaj njihove izraženosti na biopstatima u predikciji signifikantnosti raka prostate, kako samostalno tako i u kontekstu ostalih parametara.

Hipoteza rada je da su proteini c-myc i caveolin-1 markeri tumorske progresije čija pojačana izraženost na biopsijskom materijalu može biti pouzdan pokazatelj signifikantnosti karcinoma u skupini bolesnika niskog rizika.

### **2.2. Ciljevi rada**

S obzirom na postavljenu hipotezu ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi broj bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate nakon radikalne prostatektomije u ispitivanoj skupini bolesnika niskog rizika. Insignifikantni tumor definiran je kao tumor Gleasonova zbroja  $\leq 6$  koji zauzima  $\leq 5\%$  ukupnog preparata.

2. Odrediti imunohistokemijsku izraženost c-myc onkoproteina i caveolina-1 na biopstatima prostate uzetim širokom iglom u ispitivanoj skupini bolesnika određivanjem postotka tumorskih stanica koje izražavaju c-myc i caveolin-1
3. Usporediti izraženost molekule c-myc na biopsijskim cilindrima s karakterom raka prostate nakon prostatektomije (signifikantni vs. insignifikantni)
4. Usporediti izraženost molekule caveolina-1 na biopsijskim cilindrima s karakterom raka prostate nakon prostatektomije (signifikantni vs. insignifikantni)
5. Procijeniti signifikantnost raka prostate nakon radikalne prostatektomije na osnovi dobi bolesnika, PSA i PSAD, biopsijskog Gleasonova zbroja i takozvanih kriterija minimalnog volumena tumora na biopsiji:  $\leq 2$  pozitivna cilindra i manje od 50% tumora u cilindru
6. Utvrditi prisutnost biokemijskog relapsa nakon radikalne prostatektomije u ispitivanoj skupini bolesnika
7. Na osnovi statističke analize dobivenih rezultata zaključiti o mogućoj ulozi molekula c-myc i caveolina-1 na biopsijskim cilindrima kao prognostičkog čimbenika signifikantnosti raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika



## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 105 uzastopnih bolesnika niskog rizika s klinički lokaliziranim karcinomom prostate kod kojih je učinjena biopsija prostate te radikalna prostatektomija od 01.01.1998-31.12.2007, a koji zadovoljavaju kriterije uključenja.

Kriteriji za uključanje u studiju bili su slijedeći:

- bolesnici s klinički lokaliziranim rakom prostate
- digitorektalna pretraga bez znakova tumorske infiltracije okolnog tkiva
- vrijednost prijeoperativnog PSA  $\leq 10$  ng/mL i PSAD manji od 0.15
- vrijednost biopsijskog Gleason zbroja  $\leq 6$
- u biopsijskom materijalu  $\leq 2$  cilindra s rakom
- manje od 50% karcinoma u cilindru

U studiju nisu uključeni:

- bolesnici stariji od 75. godina života
- bolesnici kod kojih je već jednom obavljen kirurški zahvat na prostati
- bolesnici koji su bili na medikamentoznoj terapiji zbog bolesti prostate (antiandrogeni, LH-RH analozi, finasterid)

## 4.2. Metode

Za imunohistokemijsku analizu izraženosti c-myc proteina i caveolina-1 kod bolesnika koji zadovoljavaju kriterije uključenja u studiju korišten je arhivski materijal bioptata prostate Kliničkog zavoda za patologiju «Ljudevit Jurak» KB «Sestre milosrdnice». Za ostale podatke koristili smo postojeću bolničku dokumentaciju: operacijske protokole, povijesti bolesti, operacijske nalaze, patohistološke nalaze, temperaturne liste bolesnika, ambulantne protokole kontrolnih pregleda.

Iz navedene dokumentacije u istraživanju je korištena: dob pacijenta, vrijednosti preoperativnog prostata specifičnog antigena (PSA), patohistološke nalaze biopsija, patohistološki nalaz nakon učinjene radikalne prostatektomije te vrijeme biokemijskog relapsa (PSA povratka) nakon radikalne prostatektomije.

Nakon identifikacije bolesnika, utvrđeno je postojanje svih neophodnih kliničkih i patoloških podataka te su u istraživanje uključeni samo oni bolesnici za koje su postojali svi podaci.

Od ispitanika su formirane dvije skupine bolesnika sa:

1. signifikantnim i
2. insignifikantnim karcinomom prostate

na temelju definitivnog patohistološkog nalaza nakon radikalne prostatektomije.

Insignifikantnim karcinomom smatran je lokalizirani rak prostate ( $\leq pT2$ ), volumena tumora na konačnom preparatu izraženom u postotku u  $<5\%$  preparata i stupnja diferenciranosti na konačnom preparatu Gleasonova zbroja  $\leq 6$ . Signifikantnim rakom prostate smatratni su tumori koji ne zadovoljavaju sve navedene kriterije.

Ove skupine uspoređene su s obzirom na preoperativnu vrijednost PSA, PSAD, preoperativne biopsijske parametre (broj cilindara s tumorom: 1 ili 2, postotak tumora u cilindru, prisutnost tumora unilateralno ili bilateralno) i imunohistokemijski određenu ekspresiju c-myc proteina i caveolina-1 na bioptatima.

Tijekom uzimanja bioptata svaki uzorak stavljan je u zaseban kontejner s oznakom mjesta s kojega je biopsija u prostati uzeta. Patohistološki nalaz kod biopsije prostate je sadržavao broj cilindara s rakom, ukupan Gleason zbroj i opis svakog pojedinačnog cilindra koji je uključivao i postotak cilindra zahvaćenog tumorom. Preoperativni PSA i Gleason zbroj bioptata te dob bolesnika utvrđen je iz postojeće medicinske dokumentacije. Volumen prostate izračunat je temeljem izmjerenih dimenzija prostate nakon prostatektomije po tzv. elipsoidnoj jednadžbi  $V = \text{dijametar} \times \text{visine} \times \text{širine} \times \text{duljine} \times \pi / 6$  (broj pi:  $\pi \approx 3,141$ ). Gustoća PSA (PSA density) izračunata je iz omjera PSA (ng/ml) i volumena prostate ( $\text{cm}^3$ ). Postoperativni stadij bolesti (TNM klasifikacija, 2002) i Gleasonov zbroj te postotak tumora u cijeloj prostati kao mjera volumena tumora očitani su iz medicinske dokumentacije.

Svi pacijenti su nakon radikalne prostatektomije ambulantno kontrolirani svakih 3 mjeseca tijekom prve dvije godine, a nakon dvije godine svakih 6 mjeseci. Biokemijski relaps bolesti mjeren porastom PSA nakon operacije utvrđen je iz ambulantnih protokola i povijesti bolesti. Za vrijednost postoperativnog PSA koji upućuje na povrat bolest uzet je najčešće korišteni limit PSA vrijednosti nakon RP - jednak ili veći od 0,4 ng/ml, te dvije slijedeće vrijednosti PSA jednake ili veće od 0,4 ng/ml koje je prihvatilo Europsko urološko udruženje (EAU).

### **3.2.1. Patohistološka analiza**

Biopsijski materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje standardnu patohistološku metodu: fiksaciju tkiva u 10% -tnom puferiranom formalinu, uklapanje u parafinske blokove rezane u rezove debljine 4 do 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozinom. Biopsijski tkivni cilindri kao i cijela prostata pregledana je na prisutnost tumorskog tkiva svjetlosnim mikroskopom te je određena patohistološka dijagnoza. Gleason gradus određen je standardno.

*Imunohistokemijska analiza.* Izraženost c-myc proteina je analiziran imunohistokemijski pomoću primarnih protutijela na c-myc (C-MYC, klon 9E10, AB 32); Abcam Plc, Cambridge, United Kingdom), razrjeđenje 1:250 u PBS. Izraženost caveolina-1 je analiziran imunohistokemijski pomoću

primarnih protutijela na caveolin-1 (N-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), razrjeđenje 1:300. Imunohistokemijska analiza za navedena protutijela učinjena je LSAB metodom kao vizualizacijskim sistemom na Dako TechMate TM automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaza MSIP protokola.

Kao negativne kontrole korištena su tkiva istraživanih uzoraka na koje nije aplicirano primarno protutijelo, a kao pozitivna kontrola metode korišteno je tkivo karcinoma dojke (za c-myc) i tkivo crijeva (za caveolin) prema preporuci proizvođača.

#### *Analiza imunohistokemijskog bojanja*

Gotove preparate analizirao je iskusan patolog, bez prethodnih informacija o pojedinom uzorku. Rezultati imunohistokemijskog bojenja za C-MYC I caveolin-1 izraženi su semikvantitativnom metodom, a to znači:

0-Negativna reakcija (-): nema obojenja u tumorskim stanicama.

1-Slabo pozitivna reakcija (+) : do uključivo 25% tumorskih stanica pozitivno.

2-Umjereno pozitivna reakcija (++) : od 25-50% tumorskih stanica pozitivno.

3-Jako pozitivna reakcija ( +++ ) : više od 50% tumorskih stanica pozitivno.

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Numerički podaci su prikazani aritmetičkim sredinama, standardnim devijacijama, medijanom, minimalnom vrijednošću, maksimalnom vrijednošću i interkvartilnim rasponom, dok su kvalitativni odnosno kategorijski podaci prikazani njihovim frekvencijama pojavnosti i pripadajućim postocima. Numeričke varijable su testirane Kolmogorov-Smirnovljevim testom na normalnost raspodjele, a kako većina varijabli nije slijedila normalnu raspodjelu za statističko testiranje je primijenjen neparametrijski Mann-Whitney test za usporedbu dviju nezavisnih skupina (signifikantni odnosno insignifikantni rak prostate). Podaci mjereni ordinalnom skalom također su analizirani Mann-Whitneyevim testom. Za usporedbu kvalitativnih podataka, odnosno postojanje asocijacija, korišten je hi-kvadrat test gdje je to bilo moguće, dok je u suprotnom slučaju korišten Fisherov egzaktni test. Razlike su smatrane statistički značajnim uz  $p < 0,05$ .

Prediktivne karakteristike proteina c-myc i caveolina-1, kao i ostalih potencijalnih prediktora analizirane su univarijatnom i multivarijatnom logističkom regresijom. Dobiveni rezultati su prikazani grafički i tablično. Za analizu podataka korišten je statistički program R Verzija 2.10.1. (Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009.).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Deskriptivna statistika

U periodu od 01.01.1998. do 31.12.2007. godine u našoj ustanovi su 873 bolesnika podvrgnuta radikalnoj prostatektomiji zbog klinički lokaliziranog raka prostate. Od ovog broja 115 (13%) pacijenta je zadovoljilo preoperativne kriterije za skupinu niskorizičnih bolesnika i uključeno u studiju. Kod 10 pacijenata arhivski materijal cilindara u parafinskim blokovima nije bio dostupan te su isključeni iz istraživanja. Istraživanje je provedeno na preostalih 105 pacijenata. Ispitanici su bili u dobi od 46 do 77 godina (prosječno 65,4) godina. Srednja vrijednost PSA je bila 7,1 (2,3-10) ng/ml, volumena prostate 55,5 (29,0-90,0) mL, PSAD 0,128 (0,040-0,150) ng/mL/mL, biopsijski Gleasonov zbroj 5,85 (5-6), prosječan broj uzetih bioptata je 8 (6-12). Klinički stadij bolesti kod ispitanika je bio cT2. Vrijeme praćenja bolesnika je 43,2 (12-84) mjeseca.

Dob, PSA, PSA gustoća, volumen prostate, broj bioptata, broj pozitivnih cilindara, najveći postotak cilindra zauzetog tumorom i biopsijski Gleasonov zbroj, konačni Gleasonov zbroj, volumen karcinoma te izraženost c-myc i caveolina u stromi i epitelu tumora te vrijeme praćenja opisani su parametrima deskriptivne statistike u Tablici 3.

Tablica 3. Obilježja ispitanika s rakom prostate niskog rizika (N=105).

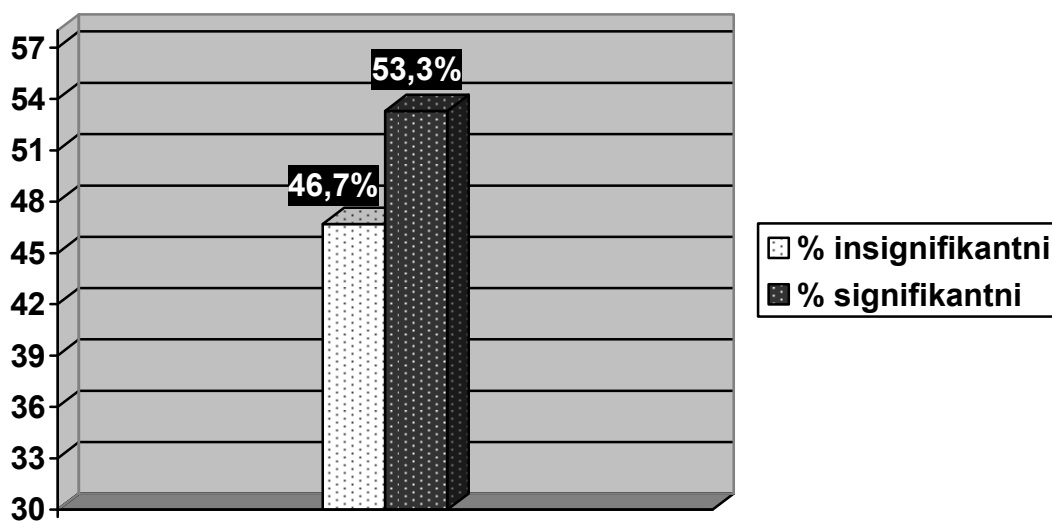
Obilježje	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARD. DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAXIMUM	INTERKVART. RASPON
Dob (god.)	65,4	5,7	66,0	46,0	77,0	8,0
PSA (ng/mL)	7,1	1,9	6,8	2,3	10,0	3,3
Volumen prostate (mL)	55,3	14,4	56,0	29	90	22
PSA gustoća (ng/mL/mL)	0,13	0,03	0,14	0,04	0,15	0,04
Broj bioptata (N)	8,18	1,74	8	6	12	1
Broj pozitivnih bioptata (N)	1,44	0,50	1,00	1	2	1
Biopsijski Gleasonov zbroj	5,9	0,36	6,0	5	6	0
Postotak karcinoma u cilindru (%)	18,52	15,5	10,00	5	50	23
CAVEOLIN-1 stroma	2,39	0,60	2,00	1	3	1
CAVEOLIN-1 epitel	1,25	0,48	1,00	1	3	0
C-MYC Stroma	0,86	0,45	1,00	0	3	0
C-MYC epitel	2,03	0,86	2,0	1	3	2
Konačni Gleasonov zbroj	6,33	0,44	6,0	5	7	1
Volumen karcinoma (%)	10,2	8,60	5,0	1	50	8
Vrijeme praćenja (mj.)	43,2	23,09	36,0	12,0	84,0	36,00



#### 4.2. Udio bolesnika sa significantnim rakom prostate u skupini bolesnika niskog rizika nakon radikalne prostatektomije

U ispitivanoj skupini bolesnika s klinički lokaliziranim karcinomom prostate niskog rizika na konačnoj patohistološkoj analizi nakon radikalne prostatektomije, prema poslije operativnim kriterijima, 49 (46,7%) pacijenata je imalo insignifikantan, a 56 (53,3%) ih je imalo significantan rak prostate (Slika 1). Insignifikantni tumor definiran je kao tumor Gleasonova zbroja  $\leq 6$  koji zauzima  $\leq 5\%$  ukupnog preparata.

**Slika 1.** Grafički prikaz udjela bolesnika sa insignifikantnim i significantnim rakom prostate nakon operacije u skupini bolesnika niskog rizika prema definiranim kriterijima.



### 4.3. Imunohistokemijska izraženost proteina c-myc i caveolina-1 kod svih ispitanika

Kod svih bolesnika je ustanovljena izraženost proteina c-myc i caveolin-1, a imunohistokemijska reakcija je prikazana kao smeđe obojenje u stromi i epitelnim stanicama tumora (Slika 2. i 3.). Rezultati ekspresije c-myc a caveolina-1 u stromi i epitelu tumora svih bolesnika koji su uključeni u studiju prikazana je u Tablicama 4 i 5.

**Tablica 4.** Imunohistokemijska izraženost c-myc u stromi i epitelu tumora u ispitivanoj skupini bolesnika s rakom prostate niskog rizika (N=105).

C-MYC	Izraženost c-myc (broj i postotak bolesnika)								Ukupno	
	0		1		2		3		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>Stroma</b>	17	16,2	86	81,9	1	0,9	1	0,9	105	100
<b>Epitel</b>	0	0	36	34,3	27	25,7	42	40,0	105	100

0- Negativna reakcija (-): nema obojenja

1- Slabo pozitivna reakcija (+) : do uključivo 25% stanica pozitivno.

2- Umjereno pozitivna reakcija (++) : od 25-50% stanica pozitivno.

3- Jako pozitivna reakcija (+++) : više od 50% stanica pozitivno.

**Tablica 5.** Imunohistokemijska izraženost caveolina-1 u stromi i epitelu tumora u ispitivanoj skupini bolesnika s rakom prostate niskog rizika (N=105).

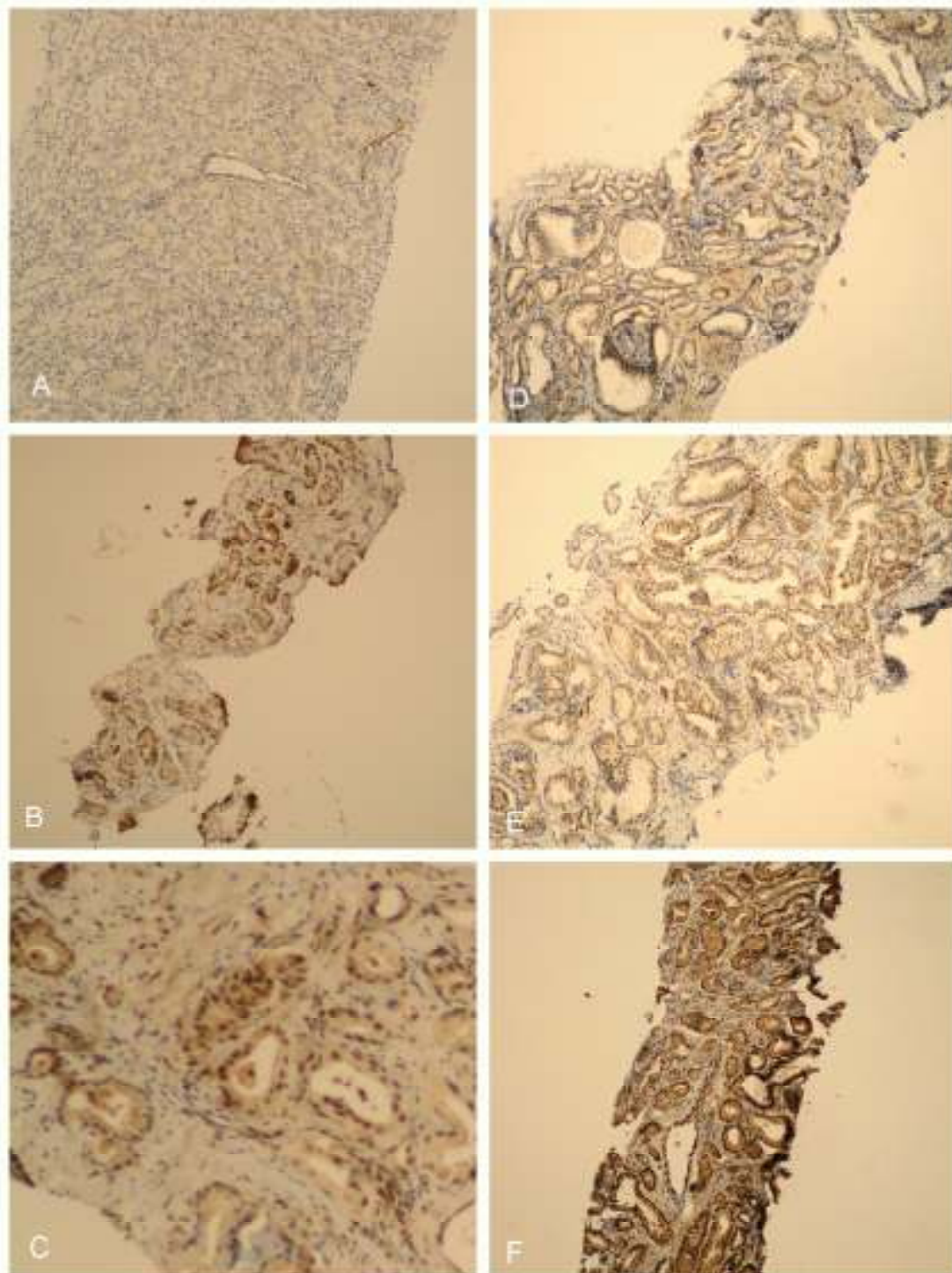
CAVEOLIN 1	Izraženosti caveolina-1 (broj i postotak bolesnika)								Ukupno	
	0		1		2		3		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>Stroma</b>	0	0	6	5,7	52	49,5	47	44,8	105	100
<b>Epitel</b>	0	0	81	77,1	22	21,0	2	1,9	105	100

0- Negativna reakcija (-): nema obojenja

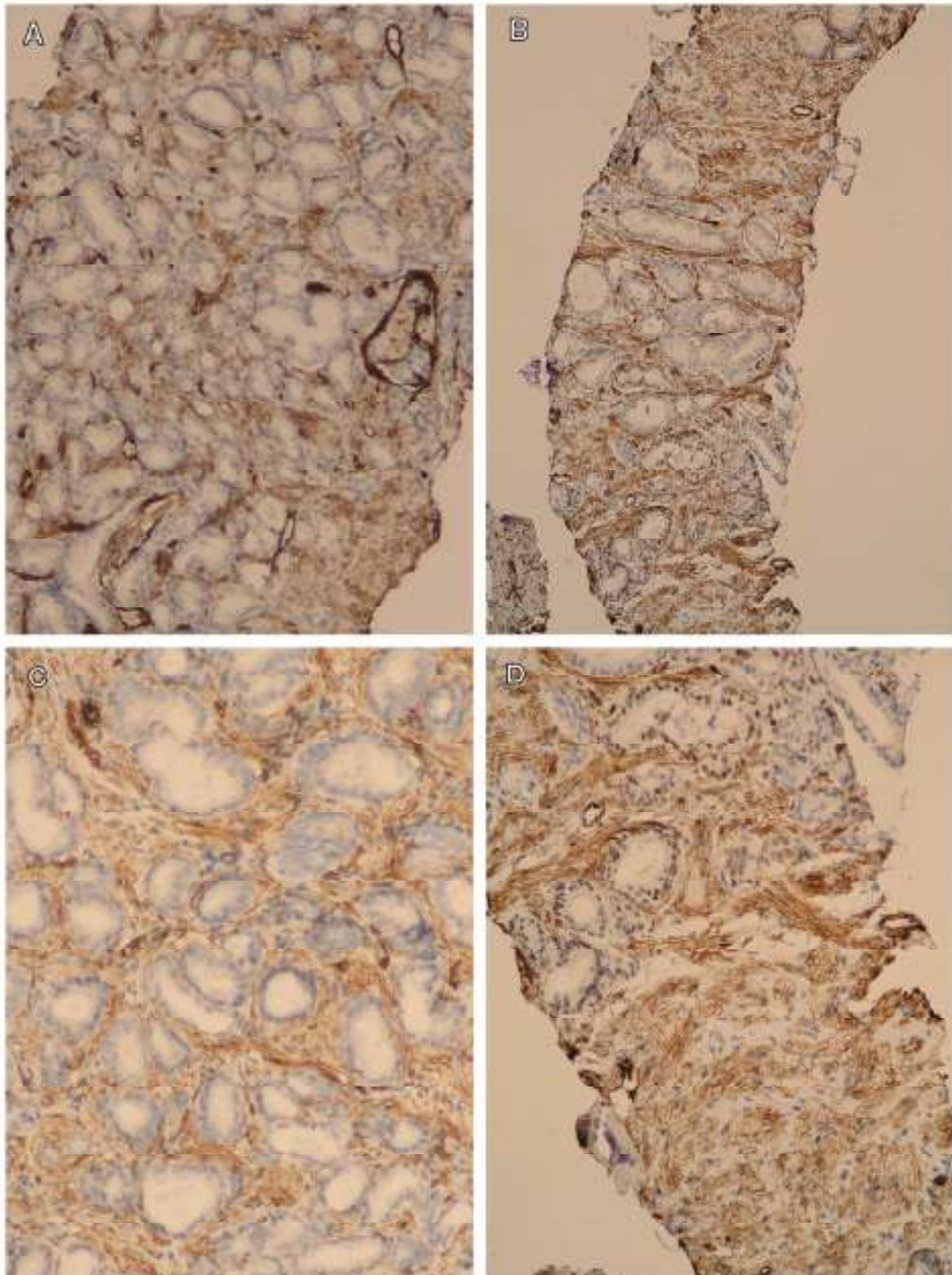
1- Slabo pozitivna reakcija (+) : do uključivo 25% stanica pozitivno.

2- Umjereno pozitivna reakcija (++) : od 25-50% stanica pozitivno.

3- Jako pozitivna reakcija (+++) : više od 50% stanica pozitivno.



**Slika 2.** Imunohistokemijska izraženost c-myc proteina u biopatima adenokarcinoma prostate: A(40x): epitel -, stroma -, primjer negativne reakcije, B(100x): epitel +++, stroma +, C(100x): epitel ++, stroma +, D(100x): epitel +, stroma +, E(100x): epitel ++, stroma -, F(100x): epitel +++, stroma ++.



**Slika 3.** Imunohistokemijska izraženost caveolina-1 u biopstatima adenokarcinoma prostate: A (100x): epitel +, stroma +, B (40x): epitel +, stroma +++, C (100x): epitel +, stroma ++, D (100x): epitel ++, stroma +++ .

#### 4.4. Imunohistokemijska izraženost proteina c-myc kod bolesnika sa insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate

U Tablici 6. prikazani su rezultati imunohistokemijske izraženosti proteina c-myc po skupinama ispitanika.

**Tablica 6.** Imunohistokemijska izraženost proteina **c-myc** u stromi i epitelu raka prostate kod bolesnika s insignifikantnom i signifikantnom bolešću.

C-MYC		KARAKTER BOLESTI			
		INSIGNIFIKANTAN	SIGNIFIKANTAN	Ukupno	
Stroma	0	3 (0,0%)	14 (25,0%)	17 (16,2%)	p=0,013
	1	45 (91,8%)	41 (73,2%)	86 (81,9%)	
	2	0 (0,0%)	1 (1,8%)	1 (1,0%)	
	3	1 (2,0%)	0 (0,0%)	1 (1,0%)	
Ukupno		49	56	105	
Epitel	0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	p<0,001
	1	1 (2,0%)	35 (62,5%)	36 (34,3%)	
	2	12 (24,%)	15 (26,8%)	27 (25,7%)	
	3	36 (73,5%)	6 (10,7%)	42 (40,0%)	
Ukupno		49	56	105	

0- Negativna reakcija (-): nema obojenja

1- Slabo pozitivna reakcija (+) : do uključivo 25% stanica pozitivno.

2- Umjereno pozitivna reakcija (++) : od 25-50% stanica pozitivno.

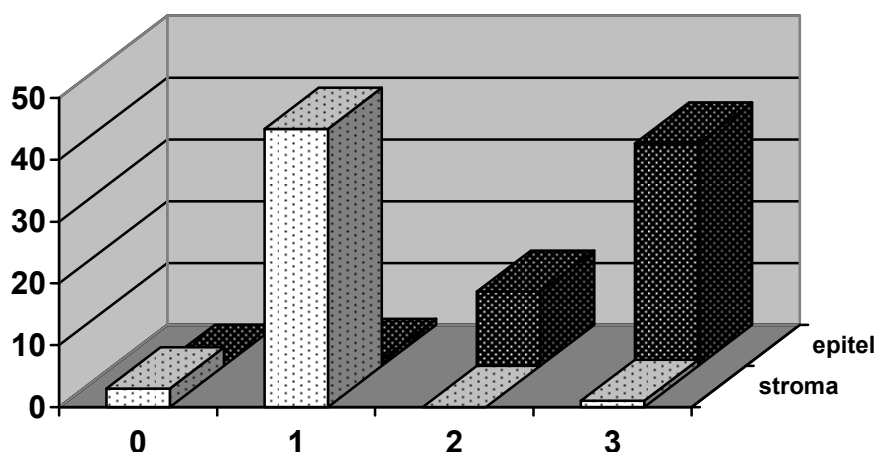
3- Jako pozitivna reakcija (+++) : više od 50% stanica pozitivno.

Izraženost c-myca u stromi kod bolesnika s insignifikantnim rakom prostate značajno se razlikuje od izraženosti u stromi u skupini bolesnika sa signifikantnim rakom prostate (Mann-Whitney test,  $p = 0,013$ ).

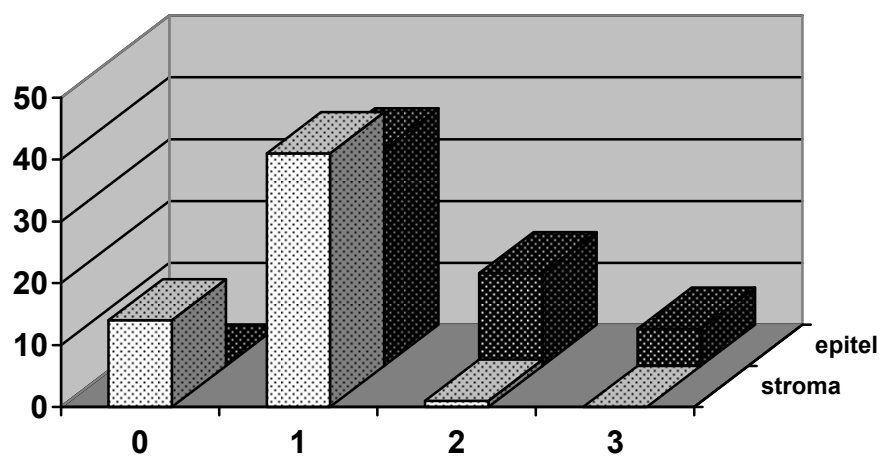
Izraženost c-myca u epitelu kod bolesnika s insignifikantnim rakom prostate značajno se razlikuje od izraženosti u epitelu u skupini bolesnika sa signifikantnim rakom prostate (Mann-Whitney test,  $p < 0,001$ ).

Deskriptivna statistika bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim tumorom prikazana je u Tablicama 6. i 7. Slika 4. i 5. grafički prikazuje raspodjelu inteziteta obojenosti c-myca strome i citoplazme u bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate.

**Slika 4.** Grafički prikaz raspodjele inteziteta obojenosti c-myca strome i citoplazme u bolesnika s **insignifikantnim** rakom prostate



**Slika 5.** Grafički prikaz raspodjele inteziteta obojenosti c-myc strome i citoplazme u bolesnika sa **signifikantnim** rakom prostate.





#### 4.5. Imunohistokemijska izraženost proteina caveolina-1 kod bolesnika sa insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate

U Tablici 7. prikazani su rezultati imunohistokemijske izraženosti proteina caveolina-1 po skupinama ispitanika.

Tablica 7. Imunohistokemijska izraženost **caveolina-1** u stromi i epitelu raka prostate kod bolesnika s insignifikantnom i signifikantnom bolešću.

CAVEOLIN-1		KARAKTER BOLESTI		Ukupno	
		INSIGNIFIKANTAN	SIGNIFIKANTAN		
Stroma	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0,0%)	p=0,001
	1	1 (2,0%)	5 (8,9%)	6 (5,7%)	
	2	18 (36,7%)	34 (60,7%)	52 (49,5%)	
	3	30 (61,2%)	17 (30,4%)	47 (44,8%)	
Ukupno		49	56	105	
Epitel	0	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	p<0,001
	1	47 (95,9%)	34 (60,7%)	81 (77,1%)	
	2	2 (4,1%)	20 (35,7%)	22 (21,0%)	
	3	0 (0%)	2 (3,6%)	1 (1,9%)	
Ukupno		49	56	105	

0- Negativna reakcija (-): nema obojenja

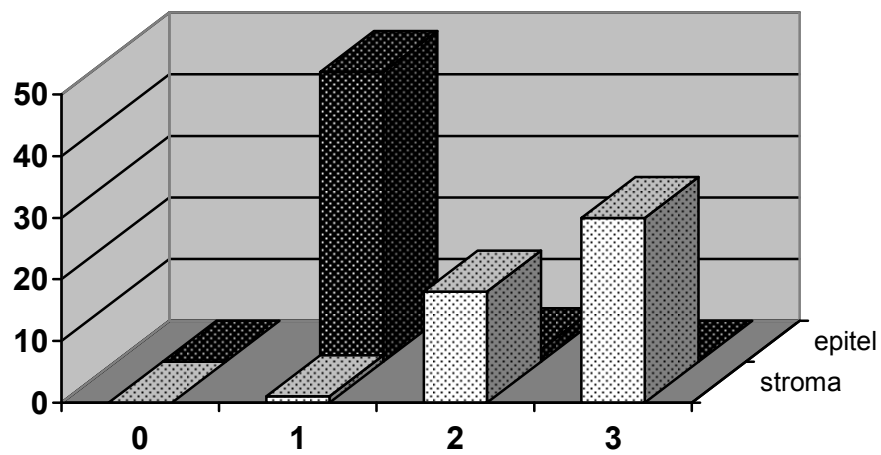
1- Slabo pozitivna reakcija (+) : do uključivo 25% stanica pozitivno.

2- Umjereno pozitivna reakcija (++) : od 25-50% stanica pozitivno.

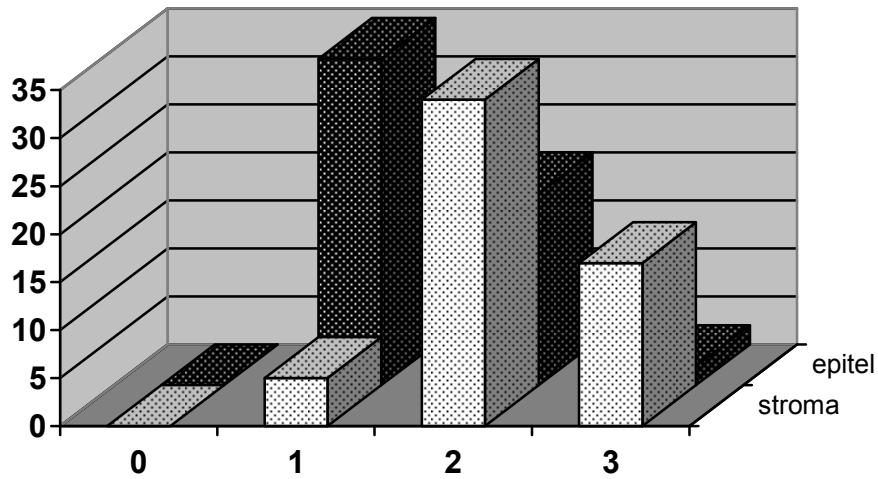
3- Jako pozitivna reakcija (+++) : više od 50% stanica pozitivno.

Slika 6. i 7. grafički prikazuje raspodjelu inteziteta obojenosti c-myca strome i citoplazme u bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate.

**Slika 6.** Grafički prikaz raspodjele izraženosti caveolina u stromi i epitelu tumora u bolesnika s **insignifikantnim** rakom prostate.



**Slika 7.** Grafički prikaz raspodjele izraženosti caveolina u stromi i epitelu tumora u bolesnika sa **signifikantnim** rakom prostate.



Izražajnost caveolina-1 u stromi kod bolesnika s insignifikantnim rakom prostate značajno se razlikuje od izražajnosti u skupini bolesnika sa signifikantnim rakom prostate (Mann-Whitney test,  $p < 0,001$ ).

Izražajnost caveolina-1 u epitelu kod bolesnika s insignifikantnim rakom prostate značajno se razlikuje od izražajnosti u skupini bolesnika sa signifikantnim rakom prostate (Mann-Whitney test,  $p < 0,001$ ).

Deskriptivna statistika bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate prikazana je u Tablicama 8. i 9.

**Tablica 8.** Opis obilježja u ispitanika s **insignifikantnim** rakom prostate nakon operacije.

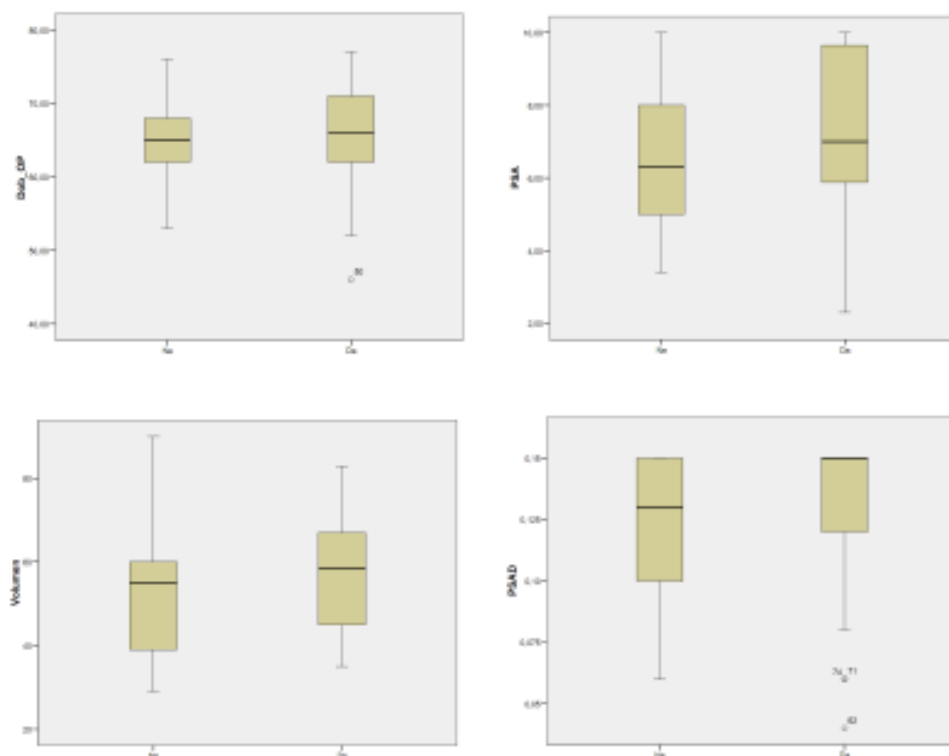
Obilježje	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARD. DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAXIMUM	INTERKVART. RASPON
<b>Dob (god.)</b>	64,94	4,82	65,00	53,00	76,00	6,50
<b>PSA (ng/mL)</b>	6,57	1,87	6,30	3,40	10,00	3,10
<b>Volumen prostate (mL)</b>	52,00	14,57	55,00	29,00	90,00	22
<b>PSA gustoća (ng/mL/mL)</b>	0,12	0,024	0,13	0,06	0,15	0,05
<b>Broj bioptata (N)</b>	8,22	1,42	8,00	6,00	12,00	1
<b>Postotak karcinoma u cilindru (%)</b>	15,82	14,12	10,00	5,00	50,00	15
<b>CAVEOLIN-1 stroma</b>	2,59	0,54	3,00	1	3	1
<b>CAVEOLIN-1 epitel</b>	1,04	0,2	1,00	1	2	0
<b>C-MYC Stroma</b>	0,98	0,38	0,99	0	3	0
<b>C-MYC epitel</b>	2,71	0,50	3,00	1	3	1
<b>Volumen karcinoma (%)</b>	4,61	1,17	5,00	1	5	0
<b>Vrijeme praćenja (mj.)</b>	45,80	22,4	48,00	12,00	84,00	36,00

**Tablica 9.** Opis obilježja u ispitanika sa **signifikantnim** rakom prostate nakon operacije.

<b>Obilježje</b>	<b>SREDNJA VRIJEDNOST</b>	<b>STANDARD. DEVIJACIJA</b>	<b>MEDIJAN</b>	<b>MINIMUM</b>	<b>MAXIMUM</b>	<b>INTERKVART. RASPON</b>
<b>Dob (god.)</b>	65,79	6,44	66,00	46	77	9
<b>PSA (ng/mL)</b>	7,51	1,99	7,00	2,30	10,00	3,89
<b>Volumen prostate (mL)</b>	58,61	13,65	58,50	35	83	22
<b>PSA gustoća (ng/mL/mL)</b>	0,13	0,028	0,15	0,04	0,15	0,03
<b>Broj bioptata (N)</b>	8,14	1,95	8,00	6	12	3
<b>Postotak karcinoma u cilindru (%)</b>	20,89	16,44	15,00	5	50	25
<b>CAVEOLIN-1 stroma</b>	2,21	0,59	2,00	1	3	1
<b>CAVEOLIN-1 epitel</b>	1,43	0,57	1,00	1	3	1
<b>C-MYC Stroma</b>	0,77	0,47	1,00	0	2	1
<b>C-MYC epitel</b>	1,48	0,69	1,00	1	3	1
<b>Volumen karcinoma (%)</b>	15,02	9,36	10,00	1	50	10
<b>Vrijeme praćenja (mj.)</b>	40,92	23,53	36,00	12,00	84,00	33,00

Usporedba (Mann-Whitney test) skupine bolesnika s insignifikantnom bolešću vs. skupine sa signifikantnom bolešću prikazanih u Tablicama 8 i 9. pokazuje da među skupinama nema statistički značajne razlike u dobi ( $p=0,255$ ), broju uzetih bioptata ( $p=0,934$ ) i postotku tumora u cilindru ( $p=0,086$ ). Statistički značajna razlika među skupinama nađena je s obzirom na volumen prostate ( $p=0,030$ ), PSA ( $p=0,014$ ), PSAD ( $p=0,014$ ), volumen karcinoma ( $p<0,001$ ). Grafički prikaz usporedbe bolesnika s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) rakom prostate s obzirom na dob, PSA, volumen prostate, i PSAD prikazan je na Slici 8.

**Slika 8.** Mozaični grafički prikaz (box-plot dijagrami) usporedbe bolesnika s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) rakom prostate s obzirom na dob, PSA, volumen prostate, PSAD, broj bioptata.



#### 4.6. Biopsijski Gleason zbroj kod insignifikantnog i signifikantnog raka prostate.

**Tablica 10.** Tablica frekvencija Gleasonova zbroja na biopsiji u skupinama pacijenata s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) karcinomom prostate.

		SIGNIFIKANTNOST RAKA PROSTATE		Ukupno	FISHEROV EGZAKTNI TEST
		NE	DA		
<b>Biopsijski Gleasonov zbroj</b>	5	10 (20,4%)	6 (10,7%)	16 (15,2%)	<b>p=0,186</b>
	6	39 (79,6%)	50 (89,3%)	89 (84,8%)	
	Ukupno	49 (100%)	56 (100%)	105 (100%)	

#### 4.7. Ukupan broj uzetih bioptata kod insignifikantnog i signifikantnog raka prostate.

**Tablica 11.** Tablica frekvencija ukupnog broja uzetih bioptata u skupinama pacijenata s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) karcinomom prostate.

		SIGNIFIKANTNOST RAKA PROSTATE		Ukupno
		NE	DA	
<b>Ukupan broj uzetih bioptata</b>	6	6	8	14
	7	4	6	10
	8	27	27	54
	9	2	0	2
	10	7	11	18
	11	1	0	1
	12	2	4	6
	Ukupno	49	56	105

#### 4.8. Broj pozitivnih bioptata kod insignifikantnog i signifikantnog raka prostate.

**Tablica 12.** Tablica frekvencija broja bioptata sa tumorom u skupinama pacijenata s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) karcinomom prostate.

		SIGNIFIKANTNOST RAKA PROSTATE		Ukupno	FISHEROV EGZAKTNI TEST
		NE	DA		
<b>Broj pozitivnih bioptata</b>	1	28 (57,1%)	31 (55,4%)	59 (56,2%)	<b>p=1,0</b>
	2	21 (42,9%)	25 (44,6%)	46 (43,8%)	
	Ukupno	49 (100%)	56 (100%)	105 (100%)	

#### 4.9. Lokalizacija tumora na biopsiji kod insignifikantnog i signifikantnog raka prostate.

**Tablica 13.** Tablica frekvencija lokalizacije tumora na biopsiji u skupinama pacijenata s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) karcinomom prostate.

		SIGNIFIKANTNOST RAKA PROSTATE		Ukupno	FISHEROV EGZAKTNI TEST
		NE	DA		
<b>Lokalizacija tumora na biopsiji</b>	Unilateralno	48 (98,0%)	53 (94,6%)	101 (96,2%)	<b>p=0,621</b>
	Bilateralno	1 (2,0%)	3 (5,4%)	4 (3,8%)	
	Ukupno	49 (100%)	56 (100%)	105 (100%)	



**4.10. Stadij tumora (TNM) nakon operacije kod insignifikantnog i signifikantnog raka prostate.**

**Tablica 14.** Tablica frekvencija stadija raka prostate (TNM) u skupinama pacijenata s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) karcinomom prostate.

		SIGNIFIKANTNOST RAKA PROSTATE		Ukupno	FISHEROV EGZAKTNI TEST
		NE	DA		
<b>TNM stadij</b>	T2	48 (100%)	49 (87,5%)	98 (93,3%)	<b>p=0,014</b>
	T3	0 (0%)	7 (12,5%)	7 (6,7%)	
	Ukupno	49 (100%)	56 (100%)	105 (100%)	

**4.11. Gleasonov zbroj nakon operacije kod insignifikantnog i signifikantnog raka prostate.**

**Tablica 15.** Tablica frekvencija Gleasonova zbroja nakon operacije u skupinama pacijenata s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) karcinomom prostate.

		SIGNIFIKANTNOST RAKA PROSTATE		Ukupno	$\chi^2$ test
		NE	DA		
<b>Gleasonov zbroj</b>	5	11 (22,4%)	0 (0%)	11 (10,5%)	<b>p&lt;0,001</b>
	6	38 (77,6%)	10 (17,9%)	48 (45,7%)	
	7	0 (0%)	46 (82,1%)	46 (43,8%)	
	Ukupno	49 (100%)	56 (100%)	105 (100%)	

#### 4.12. Pojava biokemijskog recidiva nakon operacije kod insignifikantnog i signifikantnog raka prostate

Tijekom vremena praćenja biokemijski recidiv je utvrđen kod 9 bolesnika, od kojih 8 sa signifikantnom, a 1 s insignifikantnom bolešću. Vrijeme praćenja bolesnika je 43,2 (12-84) mjeseca. U Tablici 16 prikazana je frekvencija biokemijskog recidiva po skupinama bolesnika.

**Tablica 16.** Tablica frekvencija biokemijskog recidiva nakon operacije u skupinama pacijenata s insignifikantnim (NE) i signifikantnim (DA) karcinomom prostate.

		SIGNIFIKANTNOST RAKA PROSTATE		Ukupno	FISHEROV EGZAKTNI TEST
		NE	DA		
<b>Biokemijski recidiv</b>	NE	48 (98,0%)	48 (85,7%)	96 (91,4%)	<b>p=0,035</b>
	DA	1 (2,0%)	8 (14,3%)	9 (8,6%)	
	Ukupno	49 (100%)	56 (100%)	105 (100%)	

## 4.13. LOGISTIČKA REGRESIJA

### 4.13.1. Univarijatna logistička regresija

Primjenom univarijatne logističke regresije procijenjene su karakteristike imunohistokemijskih markera. Početni model razlikovanja insignifikantnog i signifikantnog raka prostate postiže klasifikacijsku točnost od 53,3% što je prikazano u Tablici 17.

**Tablica 17.** Početni model logističke regresije.

Inicijalni korak		PREDVIĐENA SIGNIFIKANTNOST		Klasifikacijska točnost (%)
		NE	DA	
OPAŽENA SIGNIFIKANTNOST	NE	0 (0%)	49 (46,7%)	0
	DA	0 (0%)	56 (53,3%)	100
	Ukupno			<b>53,3</b>

Tablica 18. prikazuje rezultate univarijatne logističke regresije imunohistokemijskih markera c-myc i caveolina -1.

**Tablica 18.** Rezultati univarijatne logističke regresije imunohistokemijskih markera c-myc i caveolina -1.

Varijable	B	S.E.	Wald	Df	Exp (B)	interval pouzdanosti (95%)		p
						donja	gornja	
<b>Caveolin-1 stroma</b>	-1,169	0,372	9,890	1	0,311	0,150	0,644	0,002
Konstanta	2,950	0,927	10,127	1	19,110	-	-	0,001
<b>Caveolin-1 epitel</b>	-2,642	0,768	11,845	1	14,048	3,119	63,265	0,001
Konstanta	-2,967	0,860	11,896	1	0,051	-	-	0,001
<b>C-MYC stroma</b>	-1,320	0,577	5,242	1	0,267	0,086	0,827	0,022
Konstanta	1,292	0,554	5,440	1	3,640	-	-	0,020
<b>C-MYC stroma</b>	-2,444	0,420	33,798	1	0,087	0,038	0,198	0,000
Konstanta	5,367	0,975	30,314	1	214,260	-	-	0,000

Za caveolin-1 strome utvrđena je klasifikacijska točnost na univarijatnoj razini od 65,7%. Model je statistički značajan ( $p=0,001$ ).

Za caveolin-1 epitela utvrđena je klasifikacijska točnost od 65,7% . Model je statistički značajan ( $p<0,001$ ).

Za c-myc strome utvrđena je na univarijatnoj razini klasifikacijska točnost od 57,1% . Model je statistički značajan ( $p=0,01$ ).

Za c-myc epitela utvrđeno je na univarijatnoj razini klasifikacijska točnost od 81,9%.). Model je statistički značajan ( $p<0,001$ ).

U Tablici 19. prikazane su klasifikacijske karakteristike imunohistokemijskih markera u univarijatnoj logističkoj regresiji.

**Tablica 19.** Klasifikacijske karakteristike imunohistokemijskih markera u univarijatnoj logističkoj regresiji.

	IMUNOHISTOKEMIJSKI MARKERI		PREDVIĐENA SIGNIFIKANTNOST		% TOČNOSTI
			NE	DA	
OPAŽENA SIGNIFIKANTNOST	c-myc stroma	NE	46	3	93,9
		DA	41	15	26,8
		Ukupno	87	18	<b>57,1</b>
	c-myc epitel	NE	36	13	73,5
		DA	6	50	89,3
		Ukupno	42	63	<b>81,9</b>
	caveolin-1 stroma	NE	30	19	61,2
		DA	17	39	69,6
		Ukupno	47	58	<b>65,7</b>
	caveolin-1 epitel	NE	47	2	95,9
		DA	34	22	39,3
		Ukupno	81	24	<b>65,7</b>

#### 4.13.2. Multivarijatna logistička regresija

U početni model multivarijatne logističke regresije uključene su slijedeće varijable: dob, PSA, PSAD, volumen prostate, postotak tumora u cilindru, Gleasonov zbroj na biopsiji, lateralizacija tumora, postotak raka u cilindru, caveolin strome, caveolin epitela, c-myc strome i c-myc epitela kao potencijalni prediktori signifikantnosti tumora. Temeljem početne logističke regresije s kriterijem signifikantnosti varijabli u modelu  $>0,2$  izabrali smo slijedeće varijable za izvedeni model logističke regresije: PSA, volumen prostate, PSAD, postotak karcinoma u cilindru, caveolin epitela, c-myc strome i c-myc epitela. Izvedeni multivarijatni logistički model prikazan je u Tablici 20.

**Tablica 20.** Izvedeni multivarijatni logistički model.

Varijable	B	S.E.	Wald	Df	Exp (B)	interval pouzdanosti (95%)		p
						donja	gornja	
PSA	-0,769	0,460	2,790	1	0,464	0,188	1,143	0,095
Volumen	0,139	0,063	4,853	1	1,149	1,015	1,299	0,028*
PSAD	52,816	27,071	3,806	1	8,7E+022	0,784	9,6E+045	0,051
Postotak karcinoma u cilindru	0,023	0,025	0,865	1	1,024	0,974	1,075	0,352
caveolin-1 epitela	3,847	1,264	9,262	1	46,853	3,933	558,134	0,002*
c-myc strome	-1,741	0,850	4,194	1	0,175	0,033	0,928	0,041*
c-myc epitela	-3,446	0,799	18,622	1	0,032	0,007	0,152	0,000*
Konstanta	-4,580	3,781	1,466	1	0,010	-	-	0,226

Za multivarijantni logistički model utvrđena je klasifikacijska točnost od 86,7%.

Model je statistički značajan ( $p < 0,001$ ).

Temeljem rezultata za konačni logistički model isključene su nesignifikantne varijable, a to su PSA, PSAD, postotak tumora u cilindru. Konačni multivarijantni logistički model prikazan je u Tablici 21.

**Tablica 21.** Konačni multivarijantni logistički model.

Varijable	B	S.E.	Wald	Df	Exp (B)	interval pouzdanosti (95%)		p
						donja	gornja	
Volumen	0,037	0,025	2,149	1	1,038	0,988	1,090	0,143
caveolin-1 epitela	3,846	1,178	10,664	1	46,822	4,654	471,034	0,001
c-myc strome	-1,397	0,799	3,060	1	0,247	0,052	1,183	0,080
c-myc epitela	-3,100	0,660	22,038	1	0,045	0,012	0,164	0,000
Konstanta	1,725	1,9544	0,779	1	5,612	-	-	0,377

Za ovaj multivarijantni logistički model utvrđena je klasifikacijska točnost od 83,8%. Model je statistički značajan ( $p < 0,001$ ).

Konačni model logističke regresije signifikantnosti raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika čine: caveolin epitela, c-myc strome i c-myc epitela i volumen prostate. Utjecaj isključenih varijabli na konačni regresijski model procijenjen je serijom statističkog testiranja za svaku varijablu pojedinačno te njihov doprinos promijene u modelu nije bio viši od 20% vrijednosti statističke značajnosti ( $p$  vrijednosti). Time je otklonjena sumnja o mogućem utjecaju tih varijabli i nije bilo potrebe vraćati ih u konačni model.

## 5. RASPRAVA

Karcinom prostate će uzrokovati smrt 3% muškaraca starijih od 50 godina tijekom jedne godine. Unatoč gotovo epidemijskim proporcijama, ova bolest budi mnoge kontroverze zahvaljujući svom biološkom ponašanju, heterogenoj strukturi, pojavi u starijoj životnoj dobi i sporom rastu tumora. Životni rizik za latentni rak prostate kod 50-godišnjaka je 40%, rizik za obolijevanje od klinički manifestnog raka prostate je 9.5%, a rizik od umiranja od ove bolesti je 2.9%.

Od muškaraca s dijagnozom raka prostate tek će 12% umrijeti od te bolesti, dok će ostali umrijeti s rakom prostate, ali ne od njega (6). Nesklad između incidencije i mortaliteta postaje aktualan od početka 90-ih godina kada u kliničku praksu ulazi uporaba prostata specifičnog antigena (PSA). Otkriju li se svi karcinomi prostate za života, doći do značajnog pretjeranog otkrivanja i posljedičnog pretjeranog liječenja. Opravdana je bojazan da se sve više otkrivaju indolentni, odnosno klinički insignifikantni tumori. Insignifikantni tumor definira se kao tumor koji ne predstavlja rizik od progresije i metastaza, ne ugrožava i ne izaziva smrt bolesnika (12). Danas oko 80% bolesnika otkrivenih na temelju povišenog PSA s rakom prostate ima lokalizirani rak, a oko 50% spada u skupinu niskog rizika. Radikalna terapija primarno je indicirana kod pacijenata s lokaliziranim karcinomom čije je očekivano trajanje života dulje od 10 godina. Niskorizični bolesnici mogu biti podvrgnuti aktivnom nadzoru.



Izazov u liječenju klinički lokaliziranog raka prostate je razlikovati bolesnike koji imaju klinički relevantan rak i mogu imati koristi od liječenja, od bolesnika s indolentnim rakom koji ne trebaju liječenje. Postojeći preoperativni kriteriji (bolesnici s klinički lokaliziranim rakom prostate,  $PSA \leq 10$  ng/mL,  $PSAD \leq 0.15$ , biopsijskog Gleason zbroja  $\leq 6$ ,  $s \leq 2$  cilindra s rakom,  $\leq 50\%$  karcinoma u cilindru) nedovoljno su specifični u razlikovanju bolesnika s insignifikantnim od bolesnika sa signifikantnim rakom prostate.

U našem smo radu na skupini bolesnika niskog rizika definiranoj prema ovim, trenutno najstrožim kriterijima, pokazali da je više od polovice bolesnika (53,3%) nakon operacije imalo signifikantnu bolest. Time smo i na našoj populaciji ispitali spomenute kriterije i utvrdili da su nedovoljno precizni u razlikovanju bolesnika koje treba liječiti od bolesnika koji ne zahtijevaju tretman i bili bi mu suvišno podvrgnuti riskirajući značajan morbiditet radikalnih metoda liječenja lokaliziranog raka prostate. Na univarijatnoj razini nije nađena razlika među skupinama ispitanika s obzirom na dob bolesnika ( $p=0,255$ ), biopsijski Gleasonov zbroj ( $p=0,186$ ), broj pozitivnih cilindara ( $p=1.0$ ) i postotak tumora u cilindru ( $p=0,086$ ), a statistički značajna razlika je nađena s obzirom na volumen prostate ( $p=0,030$ ), PSA ( $p=0,014$ ), PSAD ( $p=0,014$ ).

Ovim smo radom namjeravali pokazati i da rak prostate u svojoj heterogenoj kliničkoj pojavnosti ima različita molekularna obilježja baš kao što se i bolesnici koji boluju od ove bolesti razlikuju u prognostičkom smislu.

U našem smo radu po prvi puta utvrdili ulogu dvaju proteina: caveolina-1 i c-myc u razlikovanju signifikantnog i insignifikantnog raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika. Oba proteina značajna su u karcinogenezi brojnih tumora, ali je njihova imunohistokemijska izraženost i prognostička važnost kod raka prostate predmetom istraživanja tek rijetkih studija. Posebnost našeg istraživanja je i u tome što je provedeno na biopsijskim cilindrima, odnosno materijalu koji je kliničaru dostupan prije operacije te može koristiti u kliničkom odlučivanju o vrsti liječenja (aktivni nadzor vs. radikalna prostatektomija ili zračenje).

U našem smo radu pokazali da porast izraženosti caveolina-1 u stromi u obrnutoj korelaciji sa izraženošću caveolina-1 u epitelnim stanicama tumora. Kod pojačane ekspresije caveolina u epitelu, smanjuje se njegova ekspresija u stromi. Obrnuto, slabu izraženost caveolina-1 u epitelu prati pojačana izraženost u stromi tumora. Postoji statistički značajna razlika u izraženosti proteina caveolina-1 u stromi tumora ( $p < 0,001$ ) i u epitelu tumora među skupinama bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate ( $p < 0,001$ ).

Pojačana izraženost caveolina u stromi sugerira insignifikantan rak, dok je odsutnost ili slaba izraženost ovog markera u stromi povezana sa signifikantnim rakom. Stromalni caveolin, dakle korelira sa progresijom bolesti i kod insignifikantnog raka on je jače izražen u stromi, a slabije u epitelu. Kod progresije karcinogeneze dolazi do porasta izraženosti caveolina-1 u epitelnim

stanicama. Istodobno izostaje pojava ovog markera u stromi. Objašnjenje za ovu opažanje može biti u stromalno-epitelnoj interakciji koja je danas predmetom brojnih istraživanja raka. Većina tumora nastaje u stromalnom mikro okruženju koje uključuje fibroblaste, makrofage, glatkomišićne stanice i stanice endotela. Utvrđeno je da fibroblasti imaju važnu ulogu u inicijaciji i progresiji tumora (174). Nova teorija metastaziranja koju su predložili Gaggioli i sur. sugerira da je mogući mehanizam metastaziranja vezan upravo uz migrirajuće stromalne tumorske fibroblaste za koje adheriraju stanice tumorskog epitela (175).

Međutim, markeri fibroblasta povezanih s rakom nisu dovoljno definirani.

Upravo je gubitak caveolina-1 u stromi mogući marker tumorskih fibroblasta jer je djelovanje mnogih faktora progresije i proliferacije kao što su faktor rasta fibroblasta (FGF), H-ras, faktor rasta trombocitnog podrijetla (PDGF) i drugi, povezano s gubitkom izraženosti caveolina u stromalnim fibroblastima (176).

Interakcija strome i epitela tumora može se odvijati putem parakrine sekrecije faktora rasta u stanicama strome koji potom induciraju epitelijalno-mezenhimsku tranziciju u susjednim epitelnim stanicama pojačavajući njihovu sposobnost invazije. Osim u kulturi stanica, gubitak ekspresije caveolina strome dokazan je u karcinomu dojke i povezan je s uznapredovalim, metastatskim stadijem bolesti (177).

Prva istraživanja ovog biomarkera provedena su tek nedavno i pokazala su da je gubitak caveolina-1 u stromi tumora prostate povezan s uznapredovalom i

metastatskom bolešću (178). Autori su pokazali da je izraženost caveolina-1 u stromi prisutna i u benignoj prostatičnoj hiperplaziji, lokaliziranom karcinomu i metastatskom karcinomu prostate. Izraženost je bila značajno reducirana u metastatskoj bolesti. Nadalje, izraženost caveolina-1 u lokaliziranoj bolesti snažno je povezana s Gleasonovim zbrojem pa su i unutar ove podskupine nađene značajne razlike u izraženosti između bolesnika s Gleasonovim zbrojem 4+3 i višim u usporedbi s bolesnicima s Gleasonovim zbrojem 3+4 i nižim. Time je sugerirano da je upravo caveolin-1 potencijalni marker koji može rano razlučiti bolesnike s agresivnom bolešću u ranoj fazi od onih čija bolest je indolentnijeg tijeka. Naime, razlika u riziku umiranja od raka prostate 3 puta je veća za bolesnike s Gleasonovim zbrojem 4+3 u odnosu na one s 3+4 (179). Di Vizio i sur. ustanovili su da je izraženost caveolina-1 u stromi u obrnutoj korelaciji s njegovom izraženošću u epitelu tumora (178). Ovi su rezultati također u skladu s našim nalazima. Stoga je gubitak stromalnog caveolina-1 prediktivan za njegovu pojačanu izraženost u epitelu.

Naše istraživanje sugerira da s porastom izraženosti caveolina-1 u epitelnim stanicama tumora raste vjerojatnost agresivne, a samim tim i signifikantne bolesti. Iako je velik broj bolesnika u obje skupine naših ispitanika imao slabu izraženost caveolina-1 u epitelnim tumorskim stanicama, umjerenu izraženost ovog markera su imala samo dva bolesnika u insignifikantnoj skupini bolesnika u usporedbi sa dvadeset u skupini bolesnika sa signifikantnim rakom.

Uloga caveolina epitela u prognostičkom smislu još uvijek nije jasno definirana i rezultati su kontroverzni. Naime, u nekim tumorima utvrđena je njegova suprimirajuća, a u nekima promotorska uloga (180). Satoh i sur. našli su pojačanu izraženost caveolina-1 u karcinomu prostate (181). Kliničko-patološka analiza pokazala je redukciju preživljena u bolesnika s pojačanom izraženošću caveolina u tumorskim stanicama kod karcinoma dojke, pluća, gušterače i prostate (180). No, snižena ekspresija ovog proteina zamijećena je u osteosarkomu, a kod karcinoma crijeva, bubrega i nekih oralnih karcinoma rezultati su proturječni (180). Moguća poveznica ovih suprotstavljenih teza je dihotomna uloga caveolina koja je ovisna o vrsti i o stadiju tumora. Lisovitch i sur. su predložili interesantan model u kojem je izraženost caveolina slaba u nediferenciranim epitelnim stanicama, dozvoljavajući staničnu proliferaciju. Izraženost je pojačana nakon indukcije stanične diferencijacije. Dakle, u početku tumorigeneze epitelne stanice se pod utjecajem onkogeno transformiraju što vodi smanjenju caveolina, porastu mitogenih signala i brzom proliferaciji. Tako nastaju preneoplastične i neoplastične lezije niskog gradusa. Daljnja progresija ovisi o nizu genetskih promjena kojima stanice raka dobivaju metastatski potencijal. U ovom stadiju je ekspresija caveolina pojačana pridonoseći gubitku apoptoze, produljenom preživljenju tumorskih stanica, invazivnosti i motilitetu (182). Osim tkivne izraženosti i serumske vrijednosti caveolina-1 su povišene u bolesnika s rakom prostate. Tahir i sur. pokazali da je u muškaraca s klinički

lokaliziranim rakom prostate njegova razina značajno viša nego u zdravih kontrola i muškaraca sa benignom prostatičnom hiperplazijom (183). Uz mogućnost korištenja caveolina-1 kao biomarkera agresivnosti raka prostate, postoji i mogućnost njegova korištenja kao terapijskog objekta. Naime, razvoj antitijela na caveolin i njegovo korištenje u mišjim karcinomskim modelima pokazala je redukciju rasta primarnog tumora i metastaza (184).

U našem radu smo istražili i ulogu onkoproteina c-myc u razlikovanju signifikantnog od insignifikantnog raka prostate. Rezultati našeg istraživanja upućuju da je c-myc značajno izraženiji u insignifikantnih tumora. Izraženost ovog onkoproteina određena je i u stromi i u epitelnim stanicama raka prostate. Utvrđena je statistički značajna razlika u izraženosti proteina c-myc u stromi tumora ( $p=0,013$ ) i u epitelu tumora ( $p<0,001$ ) među skupinama bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate.

Iako je u stromi slaba izraženost ovog markera, značajno više signifikantnih tumora nije pokazivalo nikakvu ekspresiju c-myca dok je slaba izraženost bila prisutnija u insignifikantnim tumorima. Umjerena i jaka izraženost c-myca u stromi gotovo je zanemariva. Epitelne stanice tumora pokazale su ukupno bolju izraženost u odnosu na stromu, a s porastom ekspresije rasla je i vjerojatnost insignifikantnog tumora. Dok su kod većine signifikantnih tumora epitelne stanice pokazivale slabu izraženost c-myca, izraženost kod insignifikantnih tumora bila je dijametralno suprotna i prisutna u većine

tumorskih stanica.

Iako je ovaj onkoprotein izražen u stanicama raka dojke, jednjaka i crijeva, Non Hodgkinova limfoma i Burkittova limfoma, istraživanja izraženosti c-myc onkoproteina kod raka prostate rijetka su i proturječna (30). Osim u karcinogenezi pretpostavlja se da c-myc ima važnu ulogu u progresiji raka prostate. Naime, iako je gen c-myc je amplificiran u lokalno uznapredovalim i metastatskim tumorima, a amplifikacija myc gena je prediktivna za sistemsku progresiju i smrt od raka prostate, izraženost onkoproteina ne mora s njom korelirati (32, 33). Gurelova i sur pokazali su da pojačana ekspresija onkoproteina myc nije nužno u korelaciji s amplifikacijom gena c-myc, sugerirajući da postoje alternativni načini njegove ekspresije (37). Sličnu pojavu našli su Chun i sur. kod hepatocelularnog karcinoma kod kojega je unatoč amplifikaciji c-myc gena imunohistokemijska izraženost proteina c-myc bila manja nego u noromalnom tkivu (185). Važno je naglasiti različitost amplifikacije gena c-myc i ekspresije c-myc proteina. Izraženost c-myc *proteina* u prognostičke svrhe malo se proučavala i samo mali broj studija u svijetu bavio ovim problemom (186, 187). Gurelova i sur. su pokazali prisutnost pojačane ekspresije c-myc proteina u HGPN, primarnom i metastatskom karcinomu. Utvrđena je značajno veća izraženost c-myca kod svih stadija karcinoma u odnosu na zdravi prostatični epitel. Ipak, kod karcinoma prostate je c-myc bio značajno manje izražen u lezijama visokog Gleasonova gradusa 4 i 5 i u

metastatskom raku u usporedbi sa lezijama Gleasonova gradusa 3. Mogući odgovor na fenotipski manju izraženost c-myca u lezijama visokog gradusa karcinoma prostate je genetska amplifikacija na lokusu 8q24. Razlog supresije c-myca u lezijama visokog gradusa do sada je slabo istraživana i za sada neobjašnjena. Uloga c-myca u apoptozi mogući je razlog njegove deregulacije u slabo diferenciranim karcinomima.

Prowatke i sur. su našli negativnu korelaciju izraženosti c-myc onkoproteina sa stadijem (pTNM) i gradusom bolesti (Gleasonov sustav) (36). Postavili su hipotezu da je smanjena ekspresija c-myc proteina odraz njegove uloge u indukciji apoptoze. Apoptoza je u uznapredovalim tumorima smanjenjem prisutnosti c-myca poremećena te stanice postižu besmrtnost - jednu od ključnih osobina nastanka i progresije tumora. Njihova studija upućuje da imunohistokemijska izraženost ima prognostičku vrijednost u pogledu stadija i gradusa bolesti. Ovi rezultati u skladu su s našim nalazima. Dodatno, naše istraživanje pokazuje da c-myc u lokaliziranom raku prostate može poslužiti u svrhu razlikovanja bolesnika sa značajnim rakom prostate u skupini bolesnika niskog rizika. S obzirom da c-myc gen regulira i staničnu proliferaciju i apoptozu, dva temeljno suprotna procesa, važno su stanično okruženje i regulatorni mehanizmi koji definiraju vrstu i ulogu c-myca u tumoru. Spojevi koji interferiraju sa signalnim putevima uključenim u ove procese, temelj su nove onkološke terapije. Zbog toga c-myc postaje atraktivna osnova za



primjenu imunoterapije u liječenju raka prostate.

U našem smo radu utvrdili i biokemijski recidiv kod 9 bolesnika, od kojih 8 sa signifikantnom (14,3%), a 1 s insignifikantnom bolešću (2,0%). Statistički značajna razlika nađena je u pojavi biokemijskog relapsa nakon operacije u bolesnika s insignifikantnim u odnosu na bolesnike sa signifikantnim rakom prostate ( $p=0,035$ ). Obzirom na razlike u izraženosti c-myc i caveolina-1 među skupinama, moguće je posredno zaključiti da ovi markeri mogu biti prediktivni i za biokemijski relaps bolesti

Zaključno, moguće je reći da postojeći kriteriji temeljeni na Epsteinovim i drugim studijama ne osiguravaju dovoljnu pouzdanost za klasificiranje bolesnika s rakom prostate niskog rizika u podskupine podobne za aktivni nadzor ili za radikalno liječenje. Aktivni nadzor je atraktivan pristup bolesnicima koji imaju insignifikantnu bolest i kod kojih bi radikalniji pristup predstavljao pretjerano liječenje te izlaganju značajnom morbiditetu koji prati takav pristup. Ipak, spoznaja da mnogi bolesnici u skupini niskog rizika imaju bolest koja je agresivna i, ne bude li liječena, predstavlja opasnost za bolesnika, nalaže visoku razinu opreza. Iako je oprez u samom poimanju aktivnog nadzora predmnijevajući da čestim kontrolama PSA i ponovnim biopsijama eventualna progresija bolesti može biti rano uočena i to u još izlječivoj fazi treba naglasiti da kriteriji praćenja još nisu jedinstveno definirani i opće prihvaćeni (188). Upravo zbog toga razumijevanje molekularne biologije raka prostate, osobito

njegove progresije, poboljšava naše mogućnosti specifičnog pristupa bolesnicima. Mnoge genetske promjene kao što su TMPRSS2:ERG fuzija, epigenetske promjene kao što je DNA hipermetilacija povezane su s agresivnijim fenotipom raka. Molekularna biologija niskorizičnog raka također je predmetom novijih istraživanja. Naše istraživanje također je na tom tragu. U našoj smo studiji po prvi puta pokazali različiti molekularni potpis insignifikantnog i signifikantnog raka prostate temeljenom na različitoj izraženosti onkoproteina c-myc i caveolina-1. Model koji smo razvili logističkom regresijom pokazuje klasifikacijsku točnost od čak 83,3 % što je bolje čak i od Steyerbergova nomograma. Budućnost svakako stavlja naglasak na molekularna istraživanja pred postojećim kliničko-patološkim obilježjima. Bolje razumijevanje molekularnih zbivanja kod inicijacije i progresije raka prostate omogućit će bolji izbor prikladnog pristupa bolesnicima s promptnim liječenjem bolesnika s agresivnim oblikom raka prostate i aktivnim nadzorom u bolesnika s insignifikantnim rakom.

Nedostatak ove studije je relativno mali uzorak pacijenata pa klinička primjena ovih nalaza zahtijeva daljnja istraživanja. Smatramo da je u većini nalaza pokazana tendencija vrijednosti pojedinih parametara koja je u suglasju i s navodima iz literature. Koliko nam je poznato niti jedna dosadašnja studija nije analizirala prediktivnost proteina c-myc i caveolina na biopsijskom materijalu u određivanju signifikantnosti raka prostate. Nalazi ove i svih budućih sličnih

studija koje će nastojati primijeniti molekularna obilježja raka prostate temelj su budućeg individualnog savjetovanja pacijenta o vrsti liječenja, prognozi i mogućem ishodu.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U skupini bolesnika niskog rizika definiranoj prema najstrožim preoperativnim kriterijima, 53,3% bolesnika ispitanika je imalo signifikantan rak prostate i time nisu bili podobni za aktivni nadzor. Postojeći preoperativni kriteriji (bolesnici s klinički lokaliziranim rakom prostate, PSA  $\leq$  10 ng/mL, PSAD  $\leq$  0.15, biopsijskog Gleason zbroja  $\leq$  6, s  $\leq$  2 cilindra s rakom,  $\leq$ 50% karcinoma u cilindru) nedovoljno su specifični u razlikovanju bolesnika s insignifikantnim od bolesnika sa signifikantnim rakom prostate.
2. Imunohistokemijsku izraženost proteina c-myc i caveolina-1 moguće je odrediti na biopsijskim cilindrima bolesnika sa rakom prostate. U ukupnoj populaciji ispitanika onkoprotein c-myc je u stromi bio slabo izražen ili neizražen, dok je u epitelu u ukupnoj populaciji podjednak broj ispitanika imao c-myc slabo, umjereno i jako izražen. Caveolin -1 je u stromi bio pretežito umjereno i jako izražen, dok je u epitelu bio slabo izražen.
3. Postoji statistički značajna razlika u izraženosti proteina c-myc u stromi tumora među skupinama bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate ( $p=0,013$ ). Postoji statistički značajna razlika u izraženosti proteina c-myc u epitelu tumora među skupinama bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate ( $p<0,001$ ).
4. Postoji statistički značajna razlika u izraženosti proteina caveolina-1 u stromi tumora među skupinama bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate ( $p<0,001$ ). Postoji statistički značajna razlika u izraženosti proteina caveolina-1 u epitelu tumora među skupinama bolesnika s insignifikantnim i signifikantnim rakom prostate

( $p < 0,001$ ).

5. Postojeći preoperativni kriteriji nedovoljno su specifični u razlikovanju bolesnika s insignifikantnim od bolesnika sa signifikantnim rakom prostate. Na univarijantnoj razini nije nađena razlika među skupinama ispitanika s obzirom na dob bolesnika ( $p=0,255$ ), biopsijski Gleasonov zbroj ( $p=0,186$ ), broj pozitivnih cilindara ( $p=1.0$ ) i postotak tumora u cilindru ( $p=0,086$ ), a statistički značajna razlika je nađena s obzirom na volumen prostate ( $p=0,030$ ), PSA ( $p=0,014$ ), PSAD ( $p=0,014$ ).
6. Biokemijski recidiv je utvrđen kod 9 bolesnika, od kojih 8 sa signifikantnom (14,3%), a 1 s insignifikantnom bolešću (2,0%). Postoji statistički značajna razlika u pojavi biokemijskog relapsa nakon operacije u bolesnika s insignifikantnim u odnosu na bolesnike sa signifikantnim rakom prostate ( $p=0,035$ ).
7. Izraženost c-myc i caveolina-1 na biopsijskim cilindrima u skupini bolesnika niskog rizika može se primijeniti u otkrivanju bolesnika sa signifikantnim rakom prostate. Pojačana izraženost caveolina-1 u stromi te c-myca u stromi i epitelnim stanicama tumora sugerira prisutnost insignifikantnog tumora. Pojačana izraženost caveolina-1 u epitelnim stanicama tumora govori u prilog signifikantnog tumora.
8. Model razvijen multivarijantnom analizom statistički je značajan na našem uzorku ( $p < 0,001$ ), a uključuje izraženost c-myc strome i epitela te caveolina-1 epitela i volumen prostate. Pouzdanost modela je 83,8%. Osnovni model prema trenutno važećim preoperativnim kriterijima ima klasifikacijsku točnost od samo 53,3%.

## 7. SAŽETAK

**CILJ:** U retrospektivnoj studiji na uzorku od 105 pacijenata ispitivali smo prediktivnu snagu imunohistokemijske izraženosti onkoproteina c-myc i caveolina -1 u tkivu raka prostate na biopsijskim cilindrima u predviđanju signifikantnosti bolesti u skupini bolesnika niskog rizika.

**BOLESNICI I METODE:** U studiju je uključeno 873 pacijenta s klinički lokaliziranim rakom prostate koji su od 01.01.1998.-31.12.2007. podvrgnuti radikalnoj prostatektomiji u našoj ustanovi. Među njima je identificirano 105 bolesnika s preoperativnim karakteristikama niskorizičnog odnosno insignifikantnog raka prostate prema trenutno najstrožim kriterijima (PSA  $\leq$  10 ng/ml, Gleasonov zbroj  $\leq$  6,  $\leq$  33% pozitivnih cilindara, u cilindru manje od 50% tumorskog tkiva).

Arhivski materijal bioptata prostate ovih bolesnika korišten je za analizu imunohistokemijske izraženosti c-myc i caveolina-1. Imunohistokemijska izraženost c-myc proteina i caveolina-1 analizirana je pomoću primarnih protutijela na c-myc (C-MYC, klon 9E10, AB 32); Abcam Plc, Cambridge, United Kingdom), razrjeđenje 1:250 u PBS i caveolin-1 (N-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), razrjeđenje 1:300 korištenjem LSAB metode kao vizualizacijskog sistema na Dako TechMate TM automatiziranom stroju. Izraženost ovih proteina uspoređena je s karakterom raka nakon operacije (signifikantni vs. insignifikantni). Insignifikantnim karcinomom nakon operacije je smatran lokalizirani rak prostate ( $\leq$ pT2), volumena tumora u  $<$ 5% preparata i Gleasonova zbroja  $\leq$  6 na konačnom preparatu. Preoperativni parametri i izraženost c-myca i caveolina-1 korelirani su sa signifikantnošću bolesti nakon operacije.

**REZULTATI:** Poslije operacije je 49 (46,7%) pacijenata je imalo

insignifikantan, a 56 (53.3%) ih je imalo signifikantan rak prostate. Primjenom Mann-Whitneyeva neparametrijskog testa dobili smo statistički značajnu razliku među dvjema skupinama pacijenata (signifikantni vs. insignifikantni) u imunohistokemijskoj izraženosti c-myc u epitelu ( $p < 0,001$ ) i stromi ( $p = 0,013$ ) tumora kao i caveolina-1 u epitelu ( $p < 0,001$ ) i stromi ( $p = 0,001$ ). Primjenom Fisherova egzaktnog testa nađena je statistički značajna razlika među skupinama s obzirom na volumenu prostate ( $p = 0,030$ ), PSA ( $p = 0,014$ ), PSAD ( $p = 0,014$ ), volumen karcinoma ( $p < 0,001$ ). Nije utvrđena razlika u dobi ( $p = 0,255$ ), broju uzetih bioptata ( $p = 0,934$ ) i postotku tumora u cilindru ( $p = 0,086$ ) među skupinama. Logističkom regresijom razvili smo model za predviđanje signifikantnosti raka prostate u skupini bolesnika niskog rizika koji uključuje caveolin epitela, c-myc strome i c-myc epitela i volumen prostate. Prediktivna točnost našeg modela iznosi 83,8%. Imunohistokemijski markeri pokazali su oprečan prediktivni značaj: caveolin-1 epitela je faktor rizika, a c-myc strome i c-myc epitela su protektivni faktori za signifikantni rak prostate.

## 8. SUMMARY

### IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF C-MYC AND CAVEOLIN-1 ON BIOPSY CORES IN DETECTION OF SIGNIFICANT PROSTATE CANCER IN LOW RISK PATIENTS

In this retrospective non-randomized study we examined utility of immunohistochemical expression of c-myc and caveolin-1 proteins on biopsy cores in detection of significant prostate cancer in low risk patients.

873 patients who underwent radical prostatectomy from 01.01.1998. till 31.12.2007. in our institution were included in the study. 105 patients fulfilled the most stringent preoperative criteria for insignificant prostate cancer (PSA  $\leq$  10 ng/ml, Gleason sum  $\leq$  6,  $\leq$  33% positive biopsy cores,  $\leq$  50% of tumor in a core). Archival paraffin wax embedded prostatic biopsy cores were immunostained for c-myc and caveolin-1 proteins. Preoperative clinicopathological parameters and IHC expression of c-myc and caveolin-1 on tumor tissue in biopsy cores were correlated with tumor significance on postprostatectomy surgical specimens. Insignificant tumor was considered if  $<$  5% of final specimen contained tumor and Gleason sum was  $\leq$  6.

Postoperatively, 49 (46,7%) patients had insignificant and 56 (53.3%) had significant prostate cancer. Mann-Whitney non parametric test showed statistically significant difference in epithelial (p  $<$  0,001) and stromal (p = 0,013) IHC expression of c-myc as well as of epithelial (p  $<$  0,001) and stromal (p = 0,001) IHC expression of caveolin-1 between two groups of patients (insignificant vs. significant). Fisher's exact test showed statistically significant difference between the groups in prostate volume (p=0.030), PSA (p=0,014), PSAD (p=0,014), cancer volume (p $<$ 0,001). No difference was found in age



( $p=0.255$ ), number of biopsy cores ( $p=0,934$ ) and tumor percentage in the core ( $p=0.086$ ) between two groups. A statistically significant predictive model was created using logistic regression. It included epithelial IHC expression of c-myc, stromal IHC expression of c-myc, epithelial IHC expression of caveolin-1 and prostate volume as the most appropriate parameters with the overall reliability of 83,8%. Immunohistochemical markers showed opposite predictive value: epithelial expression of caveolin-1 appeared to be a risk factor while, both epithelial and stromal expression of c-myc were protective factors for significant prostate cancer in low risk patients.

## 9. LITERATURA

1. Reiter RE, deKernion JB. Epidemiology, ethiology and prevention of prostate cancer. U: Walsh PC, ur. Campbell's urology. Philadelphia (PA): Saunders; 2002, str. 3003-5.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Registar za rak. Godišnji bilten za 2001. Medicinska naklada, Zagreb, 2002.
3. Sarma AV, Schottenfeld D. Prostate cancer Incidence, Mortality, and Survival Trends in United States: 1981-2001. Sem Urol Oncol 2002; 20: 3-9.
4. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer –part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 1017-25.
5. Dong F, Reuther AM, Magi-Galluzzi C, Zhou M, Kupelian PA, Klein EA. Pathologic stage migration has slowed in the late PSA era. Urology 2007; 70(5): 839-42.
6. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics 2001. CA Cancer J Clin 2001; 51:15-36.
7. Presti JC Jr. Carcinoma of the prostate. Incidence and Epidemiology. U: Tanagho EA, McAninch JW, ur. Smiths' General Urology. New York: McGraw-Hill Co; 2000. str. 406-7.
8. Merrill RM, Browley OW. Prostate cancer incidence and mortality rate among black and white men. Epidemiology 1997; 8: 126-31.
9. Landis SH, Muray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics 1999. CA Cancer J Clin 1999; 49: 8-11.
10. Coussenot O, Valeri A. Hereditary prostate cancer and other genetic predispositions to prostate cancer . Urol Int 1998; 60 (2): 30-4.

11. Simard J, Dumont M, Soucy P, Labrie F. Perspective: Prostate Cancer susceptibility genes. *Endocrinology* 2002; 143(6): 2029-40.
12. Shirai T, Asamoto M, Takahashi S, Imaida K. Diet and prostate cancer. *Toxicology* 2002; 181: 89-94.
13. Duffield-Lillico AJ, Dalkin BL, Reid ME i sur. Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: An analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *BJU Int* 2003; 91(7): 608-12.
14. Klein EA, Thompson IM, Lippman SM. SELECT: The selenium and vitamin E prevention trial. *Urol Oncol* 2003; 21: 59-65.
15. Rubin MA, Bassiy N, Sanda M, Montie J, Strawdermn MS, Wojno K. Relationship and signficance of greatest percentage of tumor and perineural invasion on needle biopsy in prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(2): 183-9.
16. American Joint Committee on Cancer Prostate. U: Green FL, ur. *AJCC Cancer Staging Manual*, šesto izdanje. New York: Springer-Verlag; 2002, str. 309-16.
17. Steinberg MD, Sauvageot J, Piantadosi S, Epstein JI. Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and in community settings. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 566-76.
18. Che M, Sakr W, Grignon D. Pathologic features the urologist should expect on prostate biopsy. *Urol Oncol* 2003; 21: 153-61.
19. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol* 2007; 25: 398-400.
20. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1985-92.
21. Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative

- inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2000;56:828-32.
22. Bostwick DG. Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* 1996; 78: 330-6.
  23. Veltri RW, Miller MC, Mangold LA, O'Dowd GJ, Epstein JI, Partin AW. Prediction of pathological stage in patients with clinical stage T1c prostate cancer: the new challenge. *J Urol* 2002; 168: 100-4.
  24. Badalment RA, Miller MC, Peller PA i sur. An algorithm for predicting non organ confined prostate cancer using results from sextant core biopsies and PSA level. *J Urol* 1996; 156: 1375-9.
  25. Wills ML, Sauvageot J, Partin AW, Gurganus R, Epstein JI. Ability of sextant biopsies to predict radical prostatectomy stage. *Urology* 1998; 52: 759-64.
  26. Sebo TJ, Bock BJ, Chevillie JC. The percent of cores positive for cancer in prostate needle biopsy is strongly predictive of tumor stage and volume at radical prostatectomy. *J Urol* 2000; 163: 174-9.
  27. Peller PA, Young DC, Marmaduke DP, Marsh WL, Badalment RA. Sextant prostate biopsies: a histopathologic correlation with radical prostatectomy specimens. *Cancer* 1995; 75: 530-6.
  28. Grossklaus DJ, Coffey CS, Shapell SB, Jack GS, Chang SS, Cookson MS. Percent of cancer in the biopsy set predicts pathological findings after prostatectomy. *J Urol* 2002; 167: 2032-5.
  29. Freedland SJ, Csathy GS, Dorey F, Aronson WJ. Clinical utility of percent prostate needle biopsy tissue with cancer cutpoints to risk stratify patients before radical prostatectomy. *Urology* 2002; 60: 84-8.
  30. Bostwick DG, Quian J, Bergstralh E i sur. Prediction of the capsular perforation and seminal vesicle invasion in prostate cancer. *J Urol* 1996;

- 155: 1361-5.
31. Ravery V, Schmid HP, Toublanc M, Baccon-Gibod L. Is the percentage of cancer in biopsy cores predictive of extracapsular disease in T1-T2 prostate carcinoma? *Cancer* 1996; 78: 1079-86.
  32. Narayan P, Gajendran V, Taylor SP i sur. The role of transrectal ultrasound guided biopsy-base staging, preoperative PSA and biopsy Gleason score in prediction of final pathological diagnosis in prostate cancer. *Urology* 1995; 46: 205-10.
  33. Partin AW, Yoo J, Pearson JD, Chan DW, Epstein JI, Walsh PC. The use of PSA, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* 1993; 150: 110-4.
  34. Partin AW, Kattan MW, Subong EN i sur. Combination of PSA, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage localized prostate cancer. a multiinstitutional update. *JAMA* 1997; 277: 1445-51.
  35. Narain V, Bianco FJ, Grignon DJ i sur. How accurately does prostate biopsy Gleason score predict pathological findings and disease free survival? *Prostate* 2001; 49: 185-9.
  36. Bastacky SI, Walsh PC, Epstein JI. Relationship between perineural tumor invasion on needle biopsy and radical prostatectomy capsular penetration in clinical stage B adenocarcinoma of the prostate. *Am J Sur Pathol* 1993; 17: 336-41.
  37. De la Taille A, Katz A, Bagiella E i sur. Perineural invasion on prostate needle biopsy: an independent predictor of final pathologic stage. *Urology* 1999; 54: 1039-43.
  38. De la Taille A, Rubin MA, Bagiella E i sur. Can perineural invasion on prostate needle biopsy predict PSA recurrence after radical prostatectomy? *J Urology* 1999;162: 103-6.
  39. Stone NN, Stock RG, Parkh D, Yeghiayan P, Unger P. Perineural

- invasion and seminal vesicle involvement predict lymph node metastases in men with localized carcinoma of the prostate. *J Urol* 1998; 160: 1722-30.
40. Egan AJ, Bostwick DG. Prediction of extraprostatic extension of prostate cancer based on needle biopsy findings: perineural invasion lacks significance on multivariate analysis. *Am J Surg Pathol* 1997; 21:1496-500.
  41. Humphrey PA. Tumor amount in prostatic tissues in relation to patient outcome and management. *Am J Clin Patol* 2009; 131: 7-10.
  42. Vollmer RT. Percentage of tumor in prostatectomy specimens: a study of American Veterans. *Am J Clin Pathol* 2009;131:86-91.
  43. Egevad L, Algaba F, Berney DM i sur. Handling and reporting of radical prostatectomy specimens in Europe: a Web-based survey by the European Network of Uro-pathology. *Histopathology* 2008;53:333-9.
  44. Romero Selas E, Gómez Veiga F, Ponce Díaz-Reixa JI, Pertega Díaz S, González Martín M. Insignificant prostate cancer. Analysis of our series. *Actas Urol Esp* 2008; 32(5): 475-84.
  45. Stamatiou K, Alevizos A, Mariolis A i sur. Do clinically insignificant tumors of the prostate exist? *Urol Int* 2008; 81(4): 379-82.
  46. Klein EA. What is 'insignificant' prostate carcinoma? *Cancer* 2004; 101(9): 1923-5.
  47. Pienta KJ. Etiology, epidemiology, and prevention of carcinoma of prostate. U: Walsh PC, Retik AB, Vaughan EDJr, Wein AJ, ur. *Campbell's Urology* (7.izdanje). Philadelphia: WB Saunders; 1998, str. 2489-561.
  48. Selman SH. 'Latent' carcinoma of the prostate: a medical misnomer? *Urology* 2000; 56:708-11.
  49. Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD i sur. High grade prostatic

- intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 1994; 8(3): 439-43.
50. Bangma CH, RoobolMJ, Steyerberg EW. Predicting models in diagnosing indolent cancer. *Cancer* 2009; 115(13): 3100-6.
  51. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M; Colombert M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-92.
  52. Strnad M, Znaor A. Epidemiologija raka prostate. U: Šamija M, Orešić V, Solarić M i sur., ur. Rak prostate. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str.10-20.
  53. Bangma CH, Roemling S, Schroder FH. Overdiagnosis and overtreatment of early detected prostate cancer. *World J Urol* 2007; 25: 3-9.
  54. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 2008; 15(1): 3866-71.
  55. Penson DF, Rossignol M, Sartor AO, Scardino PT, Abenhaim LL. Prostate cancer: epidemiology and health-related quality of life. *Urology* 2008; 72(6 Suppl): S3-11.
  56. Jemal A, Siegel R, Ward E i sur. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:43–66.
  57. Roemeling S, Roobol MJ, Kattan MW, van der Kwast TH, Steyerberg EW, Schröder FH. Nomogram use for the prediction of indolent prostate cancer: impact on screen-detected populations. *Cancer* 2007; 110(10): 2218-21.
  58. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA* 1994; 271: 368–374.

59. Winkler MH, Livni N, Mannion EM, Hrouda D, Christmas T. Characteristics of incidental prostatic adenocarcinoma in contemporary radical cystoprostatectomy specimens. *BJU Int* 2007; 99(3): 554-8.
60. Ohori M, Wheeler TM, Dunn JK, Stamey TA, Scardino PT. The pathological features and prognosis of prostate cancer detectable with current diagnostic tests. *J Urol* 1994; 152(5 Pt 2): 1714-20.
61. Allan RW, Sanderson H, Epstein JI. Correlation of minute (0.5 MM or less) focus of prostate adenocarcinoma on needle biopsy with radical prostatectomy specimen: role of prostate specific antigen density. *J Urol* 2003; 70: 370–372.
62. Boccon-Gibod LM, Dumonceau O, Toublanc M, Ravery V, Boccon-Gibod LA. Micro-focal prostate cancer: a comparison of biopsy and radical prostatectomy specimen features. *Eur Urol* 2005; 48: 895–899.
63. Barber T, Pansare V, Nikolavsky D, Pontes JE, Sakr W, Cher ML. Pathologic characteristics of contralateral prostate cancer among patients with a single positive core biopsy. *J Urol* 2006; 175: S507.
64. Johnstone PAS, Rossi PJ, Jani AB, Master V. « Insignificant» Prostate Cancer on Biopsy: Pathologic Results from Subsequent Radical Prostatectomy. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2007; 10: 237-41.
65. Kattan MW, Eastham JA, Wheeler TM i sur. Counseling men with prostate cancer: a nomogram for predicting the presence of small, moderately differentiated, confined tumors. *J Urol* 2003; 170(5): 1792-7.
66. Roemeling S, Roobol MJ, Kattan MW, van der Kwast TH, Steyerberg EW, Schröder FH. Nomogram use for the prediction of indolent prostate cancer: impact on screen-detected populations. *Cancer* 2007 Nov 15;110(10):2218-21.
67. Bastian PJ, Mangold LA, Epstein JI, Partin AW. Characteristics of insignificant clinical T1c prostate tumors. A contemporary analysis.



- Cancer 2004; 101(9): 2001-5.
68. Jeldres C, Suardi N, Walz J, Hutterer GC i sur. Validation of the contemporary epstein criteria for insignificant prostate cancer in European men. *Eur Urol*. 2008; 54(6): 1306-13.
  69. Tomašković I, Trnski D, Kraus O i sur. Patohistološki nalazi bolesnika s rakom prostate liječenih radikalnom prostatektomijom koji su bili podobni za aktivni nadzor. 4. Hrvatski urološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem 23-27.09.2009, Split, Hrvatska
  70. Samaratunga H, Epstein JI. What is the molecular pathology of low-risk prostate cancer? *World J Urol* 2008; 26(5): 431-6.
  71. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd i sur. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009; 26; 360(13): 1310-19.
  72. Eckersberger E, Finkelstein J, Sadri H i sur. Screening for Prostate Cancer: A Review of the ERSPC and PLCO Trials. *Rev Urol* 2009; 11(3): 127-33.
  73. Sokoll LJ, Chan DW. Prostate specific antigen: its discovery and biochemical characteristics. *Urol Clin North Am* 1997; 24: 253-9.
  74. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology* 1979. 17(2): 159-63.
  75. Haese A, Huland H, Ljilja H. Diagnostic markers for prostate cancer detected in serum, plasma and blood: PSA forms and hK2 for early detection and staging. U: Bangma CH i Newling DWW, ur. The proceedings of the 7<sup>th</sup> Congress on progress and controversies in Oncological urology 2002; Rotterdam, Netherlands. London: The Parthenon publishing group; 2003, str. 206-22.
  76. Ellis WJ, Chetner MP, Preston SD. Diagnosis of prostatic carcinoma: the

- yield of serum PSA, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. *J Urol* 1994; 152: 1520-5.
77. Smith DS, Catalona WJ. Rate of change in serum PSA levels as a method for prostate cancer detection. *J Urol* 1994; 152: 1163-7.
  78. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guessi sur. Serum PSA in community- based population of healthy men. *JAMA* 1993; 270: 860-4.
  79. Partin AW, Criley SR, Subong ENP, Zincke H, Walsh PC, Oesterling JE. Standard versus age-specific prostate specific antigen reference ranges among men with clinically localized prostate cancer: a pathological analysis. *J Urol* 1995; 155: 1336-40.
  80. Reissigl A, Pointner J, Horninger W i sur. Comparison of differenet prostate-specific antigen cutpoints for early detection of prostate cancer: resulsts of a large screening study. *Urology* 1995; 46: 662-7.
  81. Catalona WJ, Hudson MA, Scardino PT i sur. Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs of early detection of prostate cancer: Receiver operating characteristic curve. *J Urol* 1994; 2037-42.
  82. Littrup PJ, Kane RA, Mettlin CJ i sur. Investigators of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project: Cost-effective prostate cancer detection. Reduction of low-yield biopsies. *Cancer* 1994; 74: 3146-52.
  83. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: A Decade of Discovery - What We have Learned and Where We are going. *J Urol* 1999; 162: 293-306.
  84. Djavan B, Zlotta AR, Byttebier G i sur. Prostate specific antigen density of the transitional zone for early detection of prostate cancer. *J Urol* 1998; 160: 411-9.
  85. Stephan C, Jung K, Diamandis EP, Rittenhouse HG, Lein M, Loening A. Prostate specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein

- markers for detection of prostate cancer. *Urology* 2002; 59: 2-8.
86. Allard WJ, Zhou Z, Yeung KK. Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate specific antigen in serum. *Clin Chem* 1998; 44: 1216-22.
  87. Jung K, Elegeti U, Lein M i sur. Ratio of free or complexed PSA to total PSA: which ratio improves differentiation between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Clin Chem* 2000; 46: 55-62.
  88. Partin AW, Carter HB, Chan DW i sur. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol* 1990; 143: 747-52.
  89. Hodge KK, McNeal JJ, Terris MK, Stamey TA. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol* 1989; 142: 71-5.
  90. McNeal JJ, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma: correlation of histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 897-906.
  91. Rabbani F, Stroumbakis N, Kava BR i sur. Incidence and clinical significance of false negative sextant prostate biopsies. *J Urol* 1998; 1247-50.
  92. Norberg M, Egevad L, Homberg L. The sextant protocol for ultrasound guided biopsies underestimates the presence of cancer. *Urology* 1997; 50: 562-6.
  93. Devis M, Sofer M, Kim SS i sur. The procedure of transrectal ultrasound guided biopsy of the prostate: a survey of patient preparation and biopsy technique. *J Urol* 2002; 167: 566-570.
  94. Eskew LA, Bare RL, Mc Cullough DL. Systematic 5-region prostate biopsy is superior to sextant method for diagnosing carcinoma of the prostate. *J Urol* 1997; 157: 199-203.

95. Presti JC Jr, Chang JJ, Bhargava V, Shinoshara K. The optimal systematic prostate biopsy scheme should include 8 rather than 6 biopsies: results of a prospective clinical trial . J Urol 2000; 163: 163-6.
96. Babaian RJ, Toi A, Kamoi K i sur. A comparative analysis of sextant and extended 11-core multisite directed biopsy strategy. J Urol 2000; 163: 152-7.
97. Gore JL, Shariat SF, Miles BJ i sur. Optimal combinations of systematic sextant and laterally directed biopsies for the detection of prostate cancer. J Urol 2001; 165: 1554-9.
98. Presti JC Jr, O'Dowd G, Miller MC, Mattu R, Veltri RW. Extended peripheral zone biopsy schemes increase cancer detection rates and minimize variance in PSA and age related cancer rates: results of community multi-practice study. J Urol 2003; 169: 125-9.
99. Stewart CS, Leibovich BC, Weaver AL, Lieber M. Prostate cancer diagnosis using a saturation needle biopsy technique after previous negative sextant biopsies. J Urol 2001; 166: 86-92.
100. Horninger W, Reissgl A, Fink K. Results of prospective randomised study comparing the prostate cancer detection rates in PSA screening volunteers undergoing 10 vs. 14 transrectal ultrasound guided biopsies . J Urol 1998; 159: 180-3.
101. Levine MA, Ittmann M, Melamed J. Two consecutive sets of transrectal ultrasound guided prostate biopsies for the detection of prostate cancer. J Urol 1998; 159: 471-3.
102. Beurton D, Barthelemy Y, Fontaine E. Twelve systematic prostate biopsies are superior to sextant biopsies for diagnosing carcinoma : a prospective randomized study. BJU 1997; 80: 239-43.
103. Djavan B, Zlotta A, Remzi NI i sur. Total and transition zone prostate volume and age: How do they affect the utility of PSA based diagnostic

- parameters for early prostate cancer detection? *Urology* 1999; 54: 846-52.
104. Djavan B, Waldert M, Zlotta A i sur. Safety and morbidity of first and repeat transrectal ultrasound guided biopsies: results of a prospective European prostate cancer detection study. *J Urol* 2001; 166(3): 856-60.
  105. Presti JC Jr. Prostate biopsy : how many cores are enough? *Urol Oncol* 2003; 21: 135-40.
  106. Djavan B, Zlotta AR, Ekane S i sur. Is one set of sextant biopsies enough to rule out prostate cancer? Influence of transition zone and total prostate volume on prostate cancer yield. *Eur Urol* 2000; 38: 218-24.
  107. Remzi M, Djavan B, Wammack R i sur. Can total and transition zone volume of the prostate determine whether to perform a repeat biopsy. *Urology* 2003; 61: 161-6.
  108. Djavan B, Ravery V, Zlotta A i sur. Prospective evaluation of prostate cancer detected on biopsies 1,2,3 and 4: When should we stop? *J Urol* 2001; 166: 1679-83.
  109. Krantz JD, Allaan CH, Shaikh AA, Epstein JI: Predicting cancer following a diagnosis of high grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy: Data on men with more than one follow up biopsy. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1079-85.
  110. Carter HB, Partin A. Diagnosis and staging of prostate cancer. U: Walsh PC, ur. Campbell's urology. Philadelphia (PA): Saunders; 2002, str. 3068-70.
  111. Epstein JI, Pizov G, Walsh PC. Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer* 1993; 150: 135-41.
  112. Epstein JI, Pound CR, Partin AW, Walsh PC. Disease progression following radical prostatectomy in men with Gleason score 7 tumor. *J Urol* 1998; 160: 97-102.

113. The European Urology Association. Prostate Cancer Guidelines. Arnheim: EAU Health Office, 2010.
114. WHO Classification of Tumours. Tumours of The Urinary System And Male Genital Organs. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesteheim IA, editors. Lyon: IARC Press; 2004. France.
115. Epstein JI. Assessment of needle biopsies. U: Walsh PC, ur. Campbell's urology. Philadelphia (PA): Saunders; 2002, str. 3029-30.
116. Tomašković I, Bulimbašić S, Čustović Z, Reljić A, Krušlin B, Kraus O. Correlation of Gleason grade in preoperative prostate biopsy and prostatectomy specimens. Acta Clin Croat 2003; 42: 225-7.
117. Manyak MJ, Jawitt MC. The role of CT, MRI, bone scan and monoclonal antibody nuclear scan for prognosis prediction in prostate cancer. Semin Urol Oncol 1998; 16: 145-9.
118. Oesterling JE, Suman VJ, Zincke H, Bostwick DG. PSA detected (Clinical stage T1c) prostate cancer: pathologically significant tumors. Urol Clin North Am 1993; 20:687-90.
119. Eastham JA, Scardino PT. Radical prostatectomy. U: Walsh PC, ur. Cambell's Urology. Philadelphia PN: Saunders; 2002, str. 3080-106.
120. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB i sur. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. JAMA 1998; 280: 969-74.
121. Patel MI, DeConcini DT, Lopez-Corona E, Ohori M, Wheeler T, Scardino PT. An analysis of men with clinically localized prostate cancer who deferred definitive therapy. J Urol 2004;171(4):1520-4.
122. Soloway MS, Soloway CT, Williams S i sur. Active surveillance; a reasonable management alternative for patients with prostate cancer: the Miami experience. BJU Int 2008; 101: 165-9.

123. Van den Bergh CN, Roemeling S, Roobol MJ, Roobol W, Schröder FH, Bangma CH. Prospective validation of active surveillance in prostate cancer: the PRIAS study. *Eur Urol* 2007; 52: 1560-3.
124. Van As NJ, Norman AR, Thomas K i sur. Predicting the probability of deferred radical treatment for localised prostate cancer managed by active surveillance. *Eur Urol* 2008; 54: 1297-305.
125. Dall’Era MA, Cooperberg MR, Chan JM i sur. Active surveillance for early-stage prostate cancer: review of the current literature. *Cancer* 2008; 112 :1650-9.
126. Van den Ouden D, Hop W, Schroder FH. Progression and survival of patients with locally advanced prostate cancer (T3) treated with radical prostatectomy as monotherapy. *J Urol* 1998; 160: 1392-7.
127. Van Popel H, Goethuys H, Callewaert P, Vanuytsel L, Van de Voorde WM, Baert L. Radical prostatectomy can provide cure for well-selected clinical stage T3 prostate cancer. *Eur Urol* 2000; 38: 372-9.
128. Lerner SE, Blute ML, Iocca AJ, Zincke H. Primary surgery for clinical stage T3 adenocarcinoma of the prostate. U: Vogelzang NJ, Scardino PA, Shipley WU, ur. *Coprehensive textbook of genitourinary oncology*, drugo izdanje. Philadelphia: Lippincot and Wilkins; 2000, str. 789-99.
129. Wolf JS, Marshall LS. Laparoscopisc surgery. U: Tanagho EA, McAninch JW, ur. *Smith’s General Urology*. New York: McGraw-Hill Co; 2004. str. 141-62.
130. Noldus J, Palisaar J, Huland H. Treatment of prostate cancer- The Clinical Use of Radical Prostatectomy. *EAU Update Series*: 1 (2003); 16-22.
131. Quinlan DM, Epstein JI, Carter BS, Walsh PC. Sexual function following radical prostatectomy: influence of preservation of neurovascular bundles. *J Urol* 1991; 145: 998-1102.
132. Catallona WJ, Carvalhal GF, Mager DE, Mager DE, Smith DS. Potency,

- continence and complication rates in 1870 radical retropubic prostatectomies. *J Urol* 1999; 162: 433-8.
133. Paulson DF, Lin GH, Hinshaw W. Radical surgery versus radiotherapy for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1992; 128: 502-4.
134. Blasko JC. Brachytherapy for carcinoma of the prostate: Techniques, patient selection and clinical outcomes. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12:81-5.
135. Byar DP, Corle DK. Hormone therapy for prostate cancer : Results of the Veteran Administration Cooperative Urological Research Group studies. *J Natl Inst Monogr* 1988;7: 167-70.
136. Hedlund PO, Henriksson P. The Scandinavian Prostatic Cancer Group (SPCG)-5 Trial Study. Parenteral estrogen vs. androgen ablation in the treatment of advanced prostatic carcinoma: effects on overall survival and cardiovascular mortality. *Urology* 2000; 55: 328-33.
137. Bruchofsky N, Goldenberg SL, Akkakra K, Rennie PS. LHRH agonists in prostate cancer. Elimination of flare reaction by pretreatment with cyproterona acetate and low dose diethylstilbestrol. *Cancer* 1993; 72: 1685-91.
138. Iversen P, Melezinek I, Schmidt A. Nonsteroidal antiandrogens: a therapeutic option for patients with advanced prostate cancer who wish to retain sexual interest and function. *BJU Int* 2001; 87: 47-56.
139. McLeod DG. Tolerability of nonsteroidal antiandrogens in the treatment of advanced prostate cancer. *Oncologist* 1997; 2: 18-27.
140. Crawford ED, Eisenberger MA, McLeod DG i sur. A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med* 1989; 321: 419-24.
141. Eisenberger MA, Blumenstein BA, Crawford ED i sur. Bilateral orchiectomy with or without flutamide for prostate cancer. *N Engl J Med*



- 1998; 339: 1036-43.
142. Medical Research Council Prostate Cancer Working Party Investigators Group. Immediate versus deferred treatment for advanced prostatic cancer: Initial results of the Medical Research Council Trial. *BJU* 1997; 79: 235-46.
  143. Savarese D. Phase II Study of docetaxel, estramustine and low dose hydrocortisone in men with hormone refractory prostate cancer: A final report of CALGB 9780. *J Clin Oncol* 2002; 19: 2509-16.
  144. Levanat S, Levačić-Cvok M. Stanična i molekularna biologija raka prostate. U: Šamija M, ur. *Rak prostate- najvarijabilniji zloćudni tumor*. Zagreb; Medicinska naklada 2010, str. 51-63.
  145. Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-Myc. *Arch Biochem Biophys* 2003; 416:129-36.
  146. Pelengaris S, Khan M, Evan G. C-Myc, more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 764-76.
  147. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16: 653-99. Review.
  148. Meyer N, Kim SS, Penn LZ. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 2006;16(4): 275-87.
  149. Mo H, Vita M, Crespin M, Henriksson M. Myc overexpression enhances apoptosis induced by small molecules. *Cell Cycle* 2006; 5(19): 2191-4.
  150. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(4): 318-30.
  151. Ponzelli R, Katz S, Barsyte-Lovejoy D, Penn LZ. Cancer therapeutics: Targeting the dark side of Myc. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2485-501.
  152. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ

- hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999; 59: 803-6.
153. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1997; 57: 524-531.
  154. Sato K, Qian J, Slezak JM. Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, non metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1574-80.
  155. Yang G, Timme TL, Frolov A, Wheeler TM, Thomson TC. Combined c-myc and caveolin-1 expression in human prostatic carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer* 2005; 103(6): 1186-94.
  156. Qian J, Hirasawa K, Bostwick DG i sur. Loss of p53 and c-myc overrepresentation in stage T(2-3)N(1-3)M(0) prostate cancer are potential markers for cancer progression. *Mod Pathol* 2002; 15(1): 35-44.
  157. Prowatke I, Devens F, Benner A i sur. Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer* 2007; 15: 82-8.
  158. Gurel B, Iwata T, Koh CM, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. Molecular alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets. *Adv Anat Pathol* 2008; 15(6): 319-31.
  159. Hansen CG, Nichols BJ. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 2010; 20(4): 177-86.
  160. Goetz J, Lajoie GP, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 715-35.
  161. Salanueva IJ, Cerezo A, Guadamillas MC, del Pozo MA. Integrin regulation of caveolin function. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 969-80.
  162. Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation,

- cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C494-C506.
163. Lee SW, Reimer CL, Oh P, Campbell DB, Schnitzer JE. Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 1998; 16(11): 1391–7.
  164. Moon KC, Lee GK, Yoo SH i sur. Expression of caveolin-1 in pleomorphic carcinoma of the lung is correlated with a poor prognosis. *Anticancer Res* 2005; 25(6C): 4631-7.
  165. Park DS, Razani B, Lasorella A i sur. Evidence that Myc isoforms transcriptionally repress caveolin-1 gene expression via an INR-dependent mechanism. *Biochemistry* 2001; 20; 40(11): 3354-62.
  166. Suzuoki M, Miyamoto M, Kato K i sur. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer* 2002; 87(10): 1140-4.
  167. Yang G, Truong LD, Wheeler TM, Thompson TC. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: A novel prognostic marker. *Cancer Research* 1999; 59(22): 5719-23.
  168. Satoh T, Yang G, Egawa S i sur. Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients. *Cancer* 2003; 97(5): 1225-33.
  169. Yang G, Truong LD, Timme TL i sur. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1873-80.
  170. Wu D, Terrian DM. Regulation of caveolin-1 expression and secretion by a protein kinase cepsilon signaling pathway in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277(43): 40449-55.
  171. Tahir SA, Yang G, Goltsov AA i sur. Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68(3): 731-9.

172. Timme TL, Goltsov A, Tahir S. Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppresses c-myc-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19:3256-65.
173. Yang G, Timme TL, Frolov A, Wheeler TM, Thompson TC. Combined c-Myc and caveolin-1 expression in human prostate carcinoma predicts prostate carcinoma progression. *Cancer* 2005; 103(6): 1186-94.
174. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(1): 46-54.
175. Gaggioli C. Collective invasion of carcinoma cells: when the fibroblasts take the lead. *Cell Adh Migr* 2008; 2(1): 45-7.
176. Williams TM, Lee H, Cheung MW i sur. Combined loss of INK4a and caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis: role of INK4a/CAV-1 in mammary epithelial cell hyperplasia. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 24745-69.
177. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Nguyen KH i sur. Stromal caveolin-1 levels predict early DCIS progression to invasive breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(11): 1071-9.
178. Di Vizio D, Morello M, Sotgia F, Pestell RG, Freeman MR, Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation. *Cell Cycle* 2009; 8(15): 2420-4.
179. Stark JR, Perner S, Stampfer MJ i sur. Gleason score and lethal prostate cancer: does  $3 + 4 = 4 + 3$ ? *J Clin Oncol* 2009; 27(21): 3459-64.
180. Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(4): 715-35.
181. Satoh, T, Yang, G, Egawa S i sur. Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients. *Cancer* 2003; 97(5); 1225–33.

182. Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, Ravid D, Shatz M, Tencer L. Caveolin and cancer: A complex relationship. U: Mattson M, ur. Membrane microdomain signaling lipid rafts in biology and medicine Totowa, NY: Human Press; 2005, str. 161-90.
183. Tahir SA, Ren C, Timme TL i sur. Development of an immunoassay for serum caveolin-1: a novel biomarker for prostate cancer. Clin Cancer Res 2003; 9(10): 3653-9.
184. Watanabe M, Yang G, Cao G i sur. Functional analysis of secreted caveolin-1 in mouse models of prostate cancer progression. Mol Cancer Res 2009; 7(9): 1446-55.
185. Chan KL, Guan XY, Ng IO. High-throughput tissue microarray analysis of c-myc activation in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. Hum Pathol 2004; 35(11): 1324-31.
186. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. Cancer Res 1997; 57(3): 524-31.
187. Royuela M, de Miguel MP, Ruiz A, Fraile B, Arenas MI, Romo E. Interferon-gamma and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression. Eur Cytokine Netw 2000; 11(1): 119-27.
188. Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A i sur. Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. Eur Urol 2009; 55(6): 1321-30.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1973. u Vinkovcima gdje sam pohađao osnovnu i dio srednje škole. Maturirao sam u inozemstvu, u Rimokatoličkoj srednjoj školi Sv. Ignacije Lojolski, Oakville, Kanada.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 1992. i na istom diplomirao 1998. godine s prosjekom ocjena 4,6. Stažirao sam u Općoj bolnici Vinkovci 1999.-2000. nakon čega sam položio državni ispit i stekao odobrenje za samostalan rad. Specijalizaciju iz urologije započeo sam 2001. a specijalistički ispit položio 2006. godine. Od tada radim kao specijalist urolog na Klinici za urologiju KB "Sestre milosrdnice". Magistrirao sam 2005. godine s temom „Razlikovanje lokaliziranog i uznapredovalog raka prostate temeljem morfoloških parametara dobivenih biopsijom prostate širokom iglom i vrijednosti serumskog kompleksa za prostatu specifičnog antigena-alfa(1)-antikimotripsina” na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Engleskim jezikom vladam aktivno. 2010. godine položio sam u Bruxellesu usmeni ispit pred povjerenstvom Europskog Urološkog Povjerenstva (*European Board of Urology*) i stekao naslov *Fellow of European Board of Urology*.

Član sam Hrvatskog urološkog društva (HUD), Europskog urološkog društva (*European Association of Urology-EAU*) i Europskog endourološkog društva (*European Association of Endourology*).

Objavio sam 63 rada - znanstvene i stručne radove, kongresna priopćenja te edukacijske tekstove. Od 16 radova objavljenih u domaćim i inozemnim indeksiranim časopisima, prvi sam autor u četiri, a koautor u 12 radova objavljenih u indeksiranim časopisima (CC, SCI, EM, IM). Dobitnik sam triju Nagrada za najbolji poster na Srednjeeuropskim urološkim kongresima (2nd Central European Meeting, Bratislava, Slovačka 2002, 5<sup>th</sup> Central European Meeting, 2005. Budimpešta, Mađarska, 7<sup>th</sup> Central European Meeting, 2007. Zagreb, Hrvatska) Autor i koautor sam poglavlja u tri objavljene knjige: "Rak prostate-najvarijabilniji zloćudni tumor", urednik M. Šamija, Medicinska naklada Zagreb 2010.g., te u «Bolesti prostate», Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi. Logopress, Zagreb, 2006, te «Potporno i palijativno liječenje onkoloških bolesnika», urednik M. Šamija, Medicinska naklada Zagreb, 2010. Od 2009. sam viši predavač na Visokoj zdravstvenoj školi u Zagrebu.