



## Središnja medicinska knjižnica

**Benko, Goran (2013) *Prognostička vrijednost izraženosti EpCAM-a i connexina 43 u adenokarcinomu prostate [Prognostic value of EpCAM and connexin 43 expression in prostate cancer]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1889>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Goran Benko**

**Prognostička vrijednost izraženosti EpCAM-a i  
connexina 43 u adenokarcinomu prostate**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2013.**

Disertacija je izrađena na Klinici za urologiju i Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“ Kliničkoga bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu.

Voditelji rada: doc. dr. sc. Davor Tomas i  
doc. dr. sc. Borislav Spajić

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Davoru Tomasu i doc. dr. sc. Borislavu Spajiću, dvojici izuzetnih mentora uz koje sam imao prilike učiti i profesionalno se razvijati. Njihova pristupačnost, korisni savjeti i veliko iskustvo uvelike su pomogli u provođenju istraživanja i izradi ovog rada.

Ovaj rad posvećujem supruzi Željki i svojim roditeljima koji su uvijek vjerovali u mene i čija podrška i strpljivost nikad nisu izostale. Malom Filipu hvala za radost koju je unio u moj život svojim dolaskom na svijet.

# SADRŽAJ

## POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD .....	1
1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma prostate.....	1
1.2. Prekurzori karcinoma prostate .....	4
1.2.1. Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN) .....	4
1.2.2. Atipična proliferacija malih acinusa (ASAP) .....	5
1.2.3. Proliferacijska inflamatorna atrofija (PIA) .....	5
1.2.4. Atipična adenomatozna hiperplazija (AAH).....	6
1.3. Patologija i patohistologija karcinoma prostate .....	7
1.4. Klinička slika i širenje karcinoma prostate.....	11
1.5. Dijagnostika karcinoma prostate .....	13
1.5.1. Digitorektalni pregled (DRP) .....	13
1.5.2. Specifični antigen prostate (PSA) .....	14
1.5.2.1. Dobno specifičan PSA (engl. „age specific PSA“)	16
1.5.2.2. Brzina porasta PSA (engl. „PSA velocity“)	17
1.5.2.3. Gustoća PSA (engl. „PSA density“)	17
1.5.2.4. Omjer slobodnog i ukupnog PSA (f/t PSA).....	18
1.5.2.5. Antigen karcinoma prostate 3 (PCA3, engl. „prostate cancer antigen 3“)	18
1.5.3. Transrektalni ultrazvuk (TRUZ) .....	19
1.5.4. Biopsija prostate .....	19
1.5.5. Rano otkrivanje karcinoma prostate - probir (screening).....	23
1.6. Liječenje lokaliziranog karcinoma prostate.....	25
1.6.1. Radikalna prostatektomija .....	25
1.6.2. Radikalna radioterapija .....	27
1.6.2.1. Konformalna radioterapija.....	27
1.6.2.2. Brahiterapija .....	28
1.6.3. Postoperativna radioterapija .....	29
1.6.3.1. Adjuvantna radioterapija .....	29
1.6.3.2. „Salvage“ radioterapija.....	30
1.6.4. Aktivno praćenje .....	30
1.7. Biokemijski relaps (BCR) .....	31
1.8. Adhezivna molekula epitelnih stanica (EpCAM, od engl. „Epithelial cell adhesion molecule“)	32
1.9. Connexin 43 (Cx43).....	36
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	39
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	40
4. BOLESNICI I METODE ISTRAŽIVANJA .....	41
4.1. Bolesnici .....	41
4.2. Metode .....	43
4.3. Statistička obrada podataka.....	44
5. REZULTATI .....	45
6. RASPRAVA .....	68
7. ZAKLJUČCI .....	76
8. SAŽETAK .....	78
9. SUMMARY .....	80
10. LITERATURA .....	81
11. ŽIVOTOPIS.....	99

## POPIS OZNAKA I KRATICA

PSA – specifični antigen prostate

PIN – prostatična intraepitelna neoplazija

ASAP – atipična proliferacija malih acinusa (od engl. „atypical small acinar proliferation“)

PIA – proliferacijska inflamatorna atrofija

AAH – atipična adenomatozna hiperplazija

DRP – digitorektalni pregled

BPH – benigna prostatična hiperplazija

TRUZ – transrektalni ultrazvuk

PCA 3 – antigen karcinoma prostate 3 (od engl. „prostate cancer antigen 3“)

PLCO – Projekt probira za karcinom prostate, pluća, kolorektuma i jajnika (od engl. „Prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial“)

ERSCP – Europska randomizirana studija za probir karcinoma prostate (od engl. „European randomized study of screening for prostate cancer“)

RP – radikalna prostatektomija

CT – kompjutorizirana tomografija

BCR – biokemijski relaps

EpCAM – adhezivna molekula epitelnih stanica (od engl. „epithelial cell adhesion molecule“)

Cx43 – connexin 43

Cx32 – connexin 32

HE – hemalaun-eozin

LSAB – od engl. „labeled streptavidin biotin“

TMA – tkivna postrojba (od engl. „tissue microarray“)

ING-1 – protein inhibitor rasta 1 (od engl. „inhibitor of growth protein 1“)

Cx26 – connexin 26

# 1. UVOD

## 1.1. Epidemiologija i etiologija karcinoma prostate

Karcinom prostate je velik zdravstveno-socijalni problem u razvijenim zemljama koje imaju sve stariju populaciju. U Europi je karcinom prostate najčešće dijagnosticirani karcinom kod muškaraca s 382.300 novootkrivenih slučajeva tijekom 2008. godine, dok ih je u istom razdoblju od karcinoma prostate umrlo 89.300 (1).

Nadalje, karcinom prostate trenutačno je drugi najčešći uzrok smrti muške populacije od karcinoma (2). Od 1985. godine bilježi se blagi porast smrtnosti od tog karcinoma u većini zemalja pa čak i u onim zemljama ili regijama u kojima karcinom prostate nije čest (3). Od karcinoma prostate najčešće obole stariji muškarci te je to razlog za veću zabrinutost u razvijenim zemljama, koje imaju velik udio starije muške populacije. Karcinom prostate čini oko 15% svih karcinoma kod muškaraca u razvijenim zemljama, dok u nerazvijenim zemljama na njega otpada 4% svih karcinoma (4).

Prema izvještaju Registra za rak za 2010. godinu, u Hrvatskoj je karcinom prostate sa 16% udjela drugi po učestalosti, odmah nakon karcinoma pluća i bronha (5).

Rizični čimbenici za razvoj kliničkog karcinoma prostate nisu dovoljno poznati. Dobro poznati čimbenici jesu dob, rasa i nasljeđe. Ako rođak u prvom koljenu ima karcinom prostate, rizik obolijevanja se udvostručuje. Ako dva ili više rođaka u prvom koljenu boluju od karcinoma, rizik se povećava za 5 do 11 puta (6, 7).

Mali broj bolesnika, njih oko 9%, ima nasljedni karcinom prostate. Bolest se smatra nasljednom ako od nje obole tri ili više rođaka ili se bolest kod najmanje dvojice rođaka pojavi rano, prije 55. godine (8). Bolesnici s nasljednim oblikom bolesti najčešće obole šest-sedam godina ranije od

ostalih, ali se ni u čemu drugom ne razlikuju od bolesnika kod kojih se bolest ne smatra nasljednom (9).

Incidencija karcinoma i stopa mortaliteta za crnu populaciju Amerike viša je nego za bijelu populaciju. Tijekom 2000. godine crna populacija imala je u odnosu prema bijeloj populaciji 1,6 puta veću incidenciju karcinoma te 2,5 puta veći mortalitet, a ukupno gledano imala je najvišu incidenciju i mortalitet od karcinoma prostate u svijetu (1, 2, 10).

U Aziji je incidencija karcinoma prostate znatno niža nego u zapadnim zemljama. No nedavni rezultati istraživanja pokazuju trendove porasta incidencije i na područjima niskog rizika kao što su Japan i Singapur. Unatoč porastu incidencije i mortaliteta od karcinoma prostate u posljednjih 20 godina, u Aziji su te stope i dalje niske. Međutim, globalizacija i promjena načina života dovode do gubitka protektivnih kulturoloških čimbenika i povećanja rizika za razvoj karcinoma prostate (11).

Kod karcinoma prostate opisane su različite kromosomske abnormalnosti. Najčešće se javljaju dobici na sljedećim kromosomskim lokusima: 2p, 3q, 7q, 8q, 17q, 20q i Xq. Delecije se javljaju na 2q, 5q, 6q, 8p, 10q, 12p, 13q, 16q, 17p, 17q, 21q i 22q, a dolazi i do aneusomije kromosoma 7 i 17 (12).

Delecije u karcinomu prostate se najčešće pojavljuju na kromosomu 8p21-22. Gubici na 8p22 koji se pojavljuju istodobno s dobicima u broju kopija na kromosomu 8, mogu uspješno predvidjeti povrat bolesti. U deleciju na kromosomu 8p22 najčešće je uključen gen za lipoprotein lipazu koja se smatra odgovornom za inicijaciju karcinogeneze u prostati. Druga važna genska alteracija javlja se na 8q24, a ta se alteracija najčešće nalazi kod uznapređovalog, metastatskog i androgen-neovisnog karcinoma prostate. Ta regija sadržava MYC onkogen koji regulira staničnu proliferaciju i apoptozu (13).

Zbog razvoja ciljanih molekularnih terapija somatske mutacije koje se nakupljaju tijekom transformacije karcinoma prostate predmet su velikog interesa stručnjaka. Osobito su zanimljive mutacije koje zahvaćaju onkogene, tumor-supresorske gene i stabilizacijske gene. Reaktivacija gena za androgeni receptor je ključni događaj u razvoju hormon-refraktornog

karcinoma prostate. Mehanizmi reaktivacije receptora uključuju amplifikaciju gena, somatske mutacije i epigenetske modifikacije. Somatske mutacije gena za androgeni receptor mnogo su češće u uzorcima metastaza. Mutacije tumor-supresorskog gena p53 javljaju se u 20 do 30% karcinoma prostate. Te mutacije su češće kod uznapredovalih i hormon-refraktornih karcinoma prostate (14).

Učestalost otkrivanja karcinoma prostate na obdukciji mnogo se ne razlikuje u različitim dijelovima svijeta (15). Tijekom obdukcije karcinom prostate pronađe se u 80% obduciranih u devetom desetljeću života (16). To je u suprotnosti s incidencijom kliničkog karcinoma prostate, koja se razlikuje u različitim geografskim područjima. Primjerice, visoka je u SAD-u i sjevernoj Europi, a niska u jugoistočnoj Aziji (3). Međutim, za Japance koji se dosele na Havaje postoji veći rizik da obole od te bolesti; a dosele li se u Kaliforniju, rizik se još više povećava i približava se onome Amerikanaca (17). Sve to upućuje na postojanje vanjskih čimbenika koji utječu na progresiju od tzv. latentnog karcinoma u klinički karcinom prostate.

Istraživani su različiti vanjski etiološki čimbenici, primjerice prehrana, seksualno ponašanje, konzumacija alkohola, izloženost ultraljubičastom zračenju i profesionalna izloženost (18). Zbog toga je karcinom prostate idealan kandidat za preventivne mjere kao što su dijeta i farmakološke prevencije. Prehrambeni čimbenici koji utječu na razvoj bolesti uključuju ukupan unos energije, što se reflektira na indeksu tjelesne mase, unos masnoća, kuhana mesa, mikronutrijenata i vitamina (karotenoida, retinoida, vitamina C, D i E), voća i povrća, minerala (kalcija, selena) i fitoestrogena (flavonoida, lignana) (19).

Porast incidencije karcinoma prostate u razvijenim zemljama tijekom posljednjih 20 godina posljedica je određivanja vrijednosti PSA i tehnološkog napretka u dijagnostici, ponajprije u ultrazvučno vođenoj biopsiji prostate. Procjenjuje se da se u Europi od 23 do 42% karcinoma prostate otkrije samo na temelju određivanja vrijednosti PSA. U tom broju novootkrivenih karcinoma prostate mnogo je nesignifikantnih karcinoma koji bi u velikom broju slučajeva ostali neotkriveni. Ta činjenica otežava interpretaciju i usporedbu stvarnih rezultata preživljenja od te bolesti (20).



## **1.2. Prekurzori karcinoma prostate**

Nekoliko lezija prostate smatra se potencijalnim prekurzorima karcinoma prostate: prostatična intraepitelna neoplazija (PIN), atipična proliferacija malih acinusa (ASAP), proliferacijska inflamatorna atrofija (PIA) i atipična adenomatozna hiperplazija (AAH).

### **1.2.1. Prostatična intraepitelna neoplazija (PIN)**

Prostatična intraepitelna neoplazija sastoji se od arhitektonski benignih prostatičnih acinusa ili duktusa s citološki atipičnim stanicama i klasificira se kao PIN niskog i visokog stupnja (21, 22). Dijagnostički izvještaji ne smiju donositi nalaz PIN-a niskog stupnja prije svega zato što ga patolozi ne mogu sa sigurnošću razlikovati od benignog tkiva prostate. S druge strane, kada se PIN niskog stupnja (PIN 1) dijagnosticira biopsijom s pomoću igle, ti bolesnici nemaju veći rizik za karcinom na ponovljenoj biopsiji od onih s urednim nalazom biopsije. Dokaz da je PIN visokog stupnja (PIN 2 i 3) prekurzor nekih karcinoma prostate jest to da je u većoj mjeri prisutan u prostatama zahvaćenima karcinomom. Sama prisutnost PIN-a ne povećava vrijednost PSA (21).

PIN visokog stupnja i karcinom najčešće zahvaćaju perifernu zonu prostate, a biomarkeri i molekularne promjene pokazuju sličnosti između PIN-a visokog stupnja i karcinoma (21, 23). Oko 20% PIN-a visokog stupnja posjeduje TMPRSS2-ERG fuzijski gen koji je česta abnormalnost u oko 50% karcinoma prostate (21).

Incidencija PIN-a visokog stupnja u prosjeku na biopsiji iznosi 7,6% u 38 provedenih istraživanja s medijanom 5,2%. PIN visokog stupnja razlikuje se od PIN-a niskog stupnja prema prominentnim jezgricama. Prisutnost PIN-a visokog stupnja povećava rizik od pronalaska karcinoma na sljedećoj biopsiji od 16 do 44% (21).

S obzirom na to da se ne zna postotak bolesnika kod kojih se razvije invazivni karcinom tijekom vremena praćenja, kada se u bioptatu nađe PIN

visokog stupnja, ne upotrebljava se termin karcinoma *in situ* prostate. Izgleda da je PIN visokog stupnja prekursorska lezija za mnoge periferno smještene adenokarcinome prostate srednjeg do visokog gradusa (21).

No PIN nije nužan da bi se razvio karcinom. Karcinom niskog stupnja, osobito onaj smješten u prijelaznoj zoni, nije blisko povezan s PIN-om visokoga stupnja. Naprotiv, intraduktalni karcinom prostate, prema nekim istraživanjima, često je povezan s PIN-om visokog stupnja i nepovoljan je prognostički čimbenik za daljnji razvoj bolesti (21).

### **1.2.2. Atipična proliferacija malih acinusa (ASAP)**

Atipičnu proliferaciju malih acinusa čine mala žarišta atipičnih žlijezda suspektnih na karcinom, ali nedostaje kriterija - u smislu arhitekturne i citološke atipije - za definitivnu dijagnozu karcinoma. ASAP se dijagnosticira u manje od 5% istraživanih preparata u velikim serijama. Vrlo je važno dijagnosticirati ASAP u bioptatu prostate zbog njegove povezanosti s karcinomom na ponovljenoj biopsiji. ASAP je rizični faktor za razvoj karcinoma jer se nakon njegove dijagnoze u bioptatu prostate na ponovljenoj biopsiji u prosjeku dijagnosticira 40,2% karcinoma (24, 25).

### **1.2.3. Proliferacijska inflamatorna atrofija (PIA)**

Prostatična inflamatorna atrofija je termin koji je predložen za opis malih žarišta proliferativnoga žljezdanog epitela s morfološkim izgledom jednostavne atrofije ili prostatrofične hiperplazije uz prisutnost upale (26). Naziv PIA predložili su 1999. godine De Marzo i sur. (27). Ključna je prisutnost mononukleara i/ili polimorfonukleara u epitelu i stromi same lezije te stromalna atrofija uz varijabilan postotak fibroze (28).

Ovisno o prisutnosti kroničnih upalnih stanica, upotrebljava se termin PIA ili termin proliferativna atrofija (29).

Prostatična atrofija manifestira se smanjenjem volumena žlijezda i može se podijeliti na difuznu i žarišnu. Difuzna prostatična atrofija nastaje

kao rezultat smanjene razine cirkulirajućih androgena i zahvaća cijelu prostatu. Žarišnu atrofiju čine mala žarišta atrofičnog epitela okružena normalnim epitelom (30). Kod žarišne proliferativne atrofije atrofični epitel ima povećani proliferacijski indeks i smanjenu stopu apoptoze u odnosu na normalni epitel (29). Primarno nastaje u perifernoj zoni prostate, koja je najčešće mjesto pojave karcinoma. Većinu tih lezija čini jednostavna atrofija (30).

Žarišna atrofija klasificira se u nekoliko podtipova: jednostavna atrofija, jednostavna atrofija s formiranjem cista, prostatotrofična hiperplazija, parcijalna atrofija i miješane lezije. Prostatična atrofija na obdukcijama je prisutna u 85% slučajeva. Kod karcinoma prostate PIA je učestalija od prostatične atrofije (29).

Žarišna žljezdana atrofija smatra se prekurzorom adenokarcinoma prostate. Molekularna istraživanja dokazala su promjene na kromosomu 8 u atrofičnom epitelu, a one su u istoj mjeri zamijećene i kod karcinoma prostate. Mnoge proliferirajuće stanice imaju fenotip nezrelih sekretornih stanica, što je slučaj i kod PIN-a i karcinoma prostate (30).

De Marzo i sur. (27) te Putzi i sur. (31) predložili su i objasnili dvije teorije prelaska PIA-e u karcinom, bilo izravni ili neizravni. PIA može prelaziti u adenokarcinom prostate izravno ili preko PIN-a visokog stupnja. (26).

Novije spoznaje pokazuju da PIA i PIN mogu biti jedna od međufaza u razvoju karcinoma prostate (32).

#### **1.2.4. Atipična adenomatozna hiperplazija (AAH)**

Atipična adenomatozna hiperplazija je lokalizirana proliferacija malih acinusa unutar prostate koja se često može zamijeniti s karcinomom. Morfološke karakteristike proliferacije malih acinusa vrlo se malo razlikuju od morfoloških karakteristika benigne proliferacije s minimalnom citološkom atipijom do takvog stupnja da se može zamijeniti s dobro diferenciranim adenokarcinomom (33, 34, 35, 36). Najteže je razlikovati AAH od karcinoma kod lezija s jezgričicom koja je veličinom na granici između benigne i maligne (34).

Incidencija AAH varira od 19,6% (u transuretralnim resekcijama) do 24% (u serijama obduciranih muškaraca u dobi od 20 do 40 godina) (37, 34).

AAH se može naći u bilo kojem dijelu prostate, no najčešće je smješten u području apeksa, prijelaznoj zoni i periuretralnom području (34). Najčešće se nalazi u prijelaznoj zoni kao dobro ograničeni čvor zbijenih malih žlijezda lobularnog rasta (38, 35).

Za razlikovanje AAH od karcinoma od velike je pomoći imunohistokemijska analiza (34). Bazalni sloj stanica je kod AAH karakteristično diskontinuiran i fragmentiran, a kod karcinoma ga nema (34,37). Zbog toga su u razlikovanju AAH od karcinoma od velike pomoći specifična protutijela koja u preparatu obilježavaju upravo te stanice u žlijezdama (37).

AAH je svrstan u prekurzore karcinoma prostate zbog svoje povezanosti s karcinomom (incidencija 15% u 100 prostata bez karcinoma i 31% u 100 prostata s karcinomom kod obduciranih muškaraca), topografske povezanosti s malim karcinomom acinusa i zbog višeg staničnog proliferacijskog indeksa (34).

Iako biološka važnost AAH još nije poznata, zbog mikroskopskog izgleda i imunofenotipa razdvaja se od karcinoma te za sada nema dovoljno čvrstih dokaza koji bi povezali AAH i karcinom prostate (39, 34).

### **1.3. Patologija i patohistologija karcinoma prostate**

Adenokarcinomi prostate su najčešći tumori prostate, na njih otpada više od 95% tumora prostate. Osim adenokarcinoma prostate važno je spomenuti karcinom prijelaznog epitela prostate koji se pojavljuje u 1 do 3% karcinoma prostate (40). Karcinom prijelaznog epitela može nastati iz stanica urotela periuretralnih žlijezda prostatičnog dijela uretre ili urotelnom metaplazijom duktusa i acinusa (41).

Urotelijalni karcinom zahvaća prostatične kanale i acinuse kod bolesnika s karcinomom *in situ* mokraćnog mjehura koji su liječeni intravezikalnom kemoterapijom. U 35 do 45% uzoraka prostate dobivenih nakon cistoprostatektomije zbog urotelijalnog karcinoma pronalazi se i

karcinom prostate. Intraduktalni urotelijalni karcinom prostate nastaje izravnim širenjem iz prostatične mokraćne cijevi i zamijećen je kod urotelijalnih karcinoma visokog gradusa (21).

Čisti planocelularni karcinom prostate vrlo je rijedak i povezan je s lošom prognozom. Taj karcinom stvara osteolitičke metastaze i ne odgovara na estrogensku terapiju (21). Još je rjeđi adenoskvamozni karcinom (0,5%). On je samo inačica karcinoma prijelaznog epitela koji kao i endometrioidni karcinom potječe iz središnjih kanalića prostate. Navedeni karcinomi su vrlo agresivni i prognoza za njihovo liječenje je loša (42).

Sarkom prostate, s udjelom u ukupnom broju od 0,1 do 0,2%, vrlo je agresivan tumor prostate i prosječno petogodišnje preživljenje je oko 40% (21, 41). Rabdomiosarkomi su najčešći mezenhimalni tumori prostate i prisutni su gotovo samo kod djece. Leiomiosarkomi su najčešći sarkomi koji zahvaćaju prostatu odraslih. Za sarkomatoidne karcinome prostate prognoza liječenja je loša (21).

Mucinozni adenokarcinom prostate je najrjeđa morfološka varijanta. Nije agresivniji od nemucinoznog adenokarcinoma, a ponaša se kao i nemucinozni adenokarcinom s tendencijom razvoja koštanih metastaza u uznapredovaloj fazi bolesti. I kod uobičajenih adenokarcinoma polovica ih ima znakove neuroendokrine diferencijacije (21).

Tumori malih stanica prostate identični su onima u plućima. U oko 50% slučajeva tumori su mješavina tumora malih stanica i adenokarcinoma prostate. Iako kod većine tumora malih stanica nije klinički vidljiva hormonska aktivnost, oni proizvode adrenokortikotropni i antidiuretski hormon. Ti bolesnici u prosjeku žive manje od godinu dana. Tumorima malih stanica ne dodjeljuje se Gleasonov gradus (21).

Primarni prostatični limfom kod kojeg nisu zahvaćeni limfni čvorovi mnogo je rjeđi od sekundarne infiltracije prostate. Najčešća leukemična infiltracija javlja se kod kronične limfocitne leukemije iako se može naći monocitna, granulocitna i limfoblastična leukemija (21).

Prema McNealu (43) prostata se može podijeliti na četiri zone: perifernu zonu, centralnu zonu, prijelaznu ili tranzicijsku zonu i anteriornu

fibromuskularnu stromu. Važnost te podjele je u prikazu zastupljenosti karcinoma prostate po zonama.

Adenokarcinomi prostate najčešće nastaju u perifernoj zoni (do 75%), 20% pojavljuje ih se u prijelaznoj zoni, a samo 5% u centralnoj, odnosno periuretralnoj zoni. Multifokalnost tumora zapažena je u oko 50% slučajeva, dok je apikodorzalno područje najčešće mjesto dijagnosticiranja drugoga manjeg karcinoma (44).

Za određivanje stupnja diferenciranosti adenokarcinoma prostate upotrebljava se Gleasonov uzorak, odnosno zbroj. Gleasonov sustav određivanja diferenciranosti je prvi put objavljen 1974. godine (45).

Gleasonov zbroj može se upotrijebiti samo za bioptirani materijal (cilindri nakon biopsije ili operacijski uzorak), a nikako za citološke preparate. Zbrajanjem vrijednosti Gleasonovih uzoraka primarne i sekundarne komponente dobije se Gleasonov zbroj (46).

Postoji pet stupnjeva diferenciranosti adenokarcinoma prostate prema Gleasonu, odnosno pet uzoraka. Gleasonov uzorak 1 označava najbolje diferencirani tumor, dok je Gleasonov uzorak 5 oznaka za najslabije diferencirani tumor. Budući da postoji pet stupnjeva Gleasonova uzorka, vrijednosti Gleasonova zbroja su od 2 do 10. Dobro diferencirani tumori imaju Gleasonov zbroj od 2 do 4, srednje diferencirani 5 i 6, a slabo diferencirani od 8 do 10. Tumori Gleasonova zbroja 7 smatraju se srednje do slabo diferenciranim, a ovisno o prevladavajućoj komponenti mogu biti svrstani u jednu od te dvije kategorije (47).

Kod biopsije iglom preporučuje se uvijek uključiti i najgori stupanj diferenciranosti, čak i u slučajevima kada je tumor zastupljen u manje od 5% bioptiranog materijala (46).

Ako je prisutan samo jedan Gleasonov uzorak, Gleasonov zbroj dobije se dupliciranjem uzorka. Kad je određeni stupanj diferenciranosti prisutan u manje od 5% volumena karcinoma, taj stupanj se ne uključuje u Gleasonov zbroj (pravilo 5%). Tercijarni stupanj diferenciranosti 4 ili 5, ako prelazi 5% volumena, smatra se nepovoljnim prognostičkim čimbenikom za biokemijski relaps. Prisutnost tercijarnog gradusa i njegov volumni udio u karcinomu treba obavezno spomenuti uz Gleasonov zbroj (48).

Određivanje Gleasonova zbroja kao i proširenosti tumora u trenutku dijagnoze imaju važnu ulogu u određivanju načina liječenja i izravno utječu na prognozu bolesti (47).

Za određivanje stadija karcinoma prostate najviše se primjenjuje sustav TNM za klasifikaciju tumora, limfnih čvorova i metastaza. Klasifikacija se redovito revidira, a posljednja revizija učinjena je 2009. godine (49). Prikaz u tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija karcinoma prostate TNM iz 2009. godine (49)

	STADIJ	KARAKTERISTIKE
<b>Klinički primarni tumor (cT)</b>	TX	Primarni tumor se ne može procijeniti
	T0	Ne postoji primarni tumor
	T1	Klinički nedetektabilni tumor
	T1a	Tumor je slučajan nalaz u manje od 5% reseciranog tkiva
	T1b	Tumor je slučajan nalaz u više od 5% reseciranog tkiva
	T1c	Tumor je detektiran biopsijom prostate (samo zbog povišenoga PSA)
	T2	Palpabilni tumor unutar prostate*
	T2a	Tumor zahvaća polovinu jednog lobusa prostate ili manje
	T2b	Tumor zahvaća više od polovine jednog lobusa prostate, ali ne oba lobusa
	T2c	Tumor zahvaća oba lobusa
	T3	Ekstrakapsularno širenje tumora prostate
	T3a	Ekstrakapsularno širenje tumora, unilateralno ili bilateralno s mikroskopskim širenjem na vrat mokraćnog mjehura
	T3b	Tumor zahvaća sjemenne mjehuriće
	T4	Tumor je fiksiran ili se infiltrira u okolne organe, osim sjemenih mjehurića; zahvaća vanjski sfinkter, rektum, levatore i/ili zdjelični zid

<b>Patološki primarni tumor (pT)</b>	pT2 <sup>†</sup>	Lokaliziran unutar prostate
	pT2a	Jednostrano
	pT2b	Obostrano
	pT3	Ekstraprostatično širenje
	pT3a	Ekstraprostatično širenje
	pT3b	Invazija sjemenih mjehurića
	pT4	Invazija mjehura, rektuma
<b>Regionalne metastaze u limfne čvorove</b>	NX	Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
	N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
	N1	Regionalne metastaze
<b>Udaljene metastaze</b>	MX	Udaljene metastaze se ne mogu procijeniti
	M0	Nema udaljenih metastaza
	M1	Udaljene metastaze
	M1a	Metastaze u neregionalnim limfnim čvorovima
	M1b	Metastaze u kostima
	M1c	Metastaze u ostalim sijelima
*Tumor koji je pronađen u jednom ili u oba lobusa prostate biopsijom, ali nije palpabilan i ne može se radiološki evidentirati, klasificira se kao T1a.		
† Invazija tumora u apeks ili u prostatičnu kapsulu (ali ne izvan nje) klasificira se kao T2.		

#### 1.4. Klinička slika i širenje karcinoma prostate

Većina bolesnika nema smetnje koje bi upozoravale na karcinom prostate. Najčešće su simptomi povezani uz donji urotrakt, primjerice uz subvezikalnu opstrukciju. Ti simptomi karakteristični su i za benignu prostatičnu hiperplaziju (BPH). Kod velikog broja bolesnika kirurški liječenih zbog subvezikalne opstrukcije karcinom se otkrije slučajno u materijalu dobivenom transuretralnom resekcijom prostate. Tako otkriveni karcinomi najčešće su dobro diferencirani, dok se umjereno do slabo diferencirani te prošireni tumori pronalaze mnogo rjeđe (50).



S vremenom simptomi karcinoma prostate postaju sve uočljiviji. Najčešće komplikacije povezane uz razvoj karcinoma prostate jesu kompletna retencija urina, urinarne infekcije, konkrementi i renalna insuficijencija. Za terminalnu fazu bolesti karakteristični su simptomi uzrokovani metastazama (bolovi u zdjelici i kostima), razvojem anemije te gubitkom tjelesne težine (51, 52).

Karcinom prostate se najčešće širi limfogenim, a zatim i hematogenim rasapom. Izravno širenje u susjedne organe javlja se vrlo rijetko. Limfogeni rasap podrazumijeva zahvaćanje opturatornih, hipogastričnih, ilijakalnih, a na kraju i periaortalnih te perikavalnih limfnih čvorova (52).

Metastaze u limfnim čvorovima kod bolesnika s klinički lokaliziranim karcinomom prostate loš su prognostički pokazatelj. Važno je što prije ih otkriti jer se tako i prije počinje s adjuvantnom terapijom (21).

Hematogenim putem karcinom prostate najčešće metastazira u kosti (52). Tumor koji metastazira u kosti kod 85% bolesnika koji umiru od karcinoma prostate zahvaća aksijalni skelet (53).

Plućne metastaze su druge po učestalosti, a slijede hematogene metastaze, koje zahvaćaju jetru, mozak i bubrege (52). Plućne metastaze česte su na obdukciji, a gotovo svi bolesnici kod kojih su pronađene imaju metastaze i u kostima. Metastaze u plućima najčešće su asimptomatske (21).

Hematogene metastaze lošiji su prognostički pokazatelj nego limfogene metastaze (52).

Prostata nema histološku kapsulu pa se kao termin za širenje tumora izvan prostate umjesto „prodor kapsule“ upotrebljava ekstraprostatična ekstenzija. Periferno smješteni karcinomi prostate skloni su širiti se perineuralnom invazijom. Za razliku od vaskularne invazije perineuralna invazija tumora ne pogoršava prognozu bolesti. Ekstraprostatično širenje tumora najčešće se javlja posteriorno i posterolateralno, što je u skladu s najčešćom lokalizacijom adenokarcinoma prostate. Zahvaćanje sjemenih mjehurića nastaje širenjem karcinoma u mišićni zid sjemenog mjehurića. To se najčešće događa prodorom tumora izvan prostate na bazi i širenjem u perivezikalno tkivo. Izravno širenje kroz ejakulatorne kanale je mnogo rjeđe (21). Zbog zapreke

koju čini Denonvillierova kapsula karcinom prostate se vrlo rijetko izravno širi u rektum pa se takvo lokalno širenje u rektum teško razlikuje od primarnog karcinoma rektuma (21).

Ekstrakapsularno širenje tumora u prognozi je manje važno za nastanak lokalnog recidiva od pozitivnog kirurškog ruba, a prema nekim istraživanjima zamijećena je veća učestalost lokalnog relapsa i nastanka metastaza te kraće preživljenje tih bolesnika (54, 55).

Najvažniji čimbenik rizika za pojavu udaljenih metastaza i smrti od karcinoma prostate je izravno zahvaćanje sjemenih mjehurića (56).

## **1.5. Dijagnostika karcinoma prostate**

Glavni dijagnostički postupci u otkrivanju karcinoma prostate jesu: digitorektalni pregled (DRP), određivanje serumskog specifičnog antigena prostate (PSA), transrektalni ultrazvuk (TRUZ) i biopsija prostate uz kontrolu ultrazvukom.

Definitivna dijagnoza ovisi o nalazu adenokarcinoma u bioptatu prostate ili operativnom materijalu (57).

### **1.5.1. Digitorektalni pregled (DRP)**

Iako se određivanje PSA pokazalo važnijim od DRP-a u probiru karcinoma prostate, prema istraživanjima DRP otkriva i do 25% bolesnika s karcinomom prostate kod vrijednosti PSA manjim od 4 ng/ml (58).

Kako bi se mogao dijagnosticirati DRP-om, minimalni volumen karcinoma mora biti 0,2 ml (59).

Zbog toga prije obavljenih drugih pretraga, kao što su određivanje PSA i TRUZ s biopsijom prostate, ne možemo ni postaviti sumnju na karcinom prostate u prijelaznoj i centralnoj zoni, gdje je oko 25% karcinoma (43).

Suspektan nalaz na DRP-u je apsolutna indikacija za biopsiju prostate. Bolest se otkrije samo DRP-om neovisno o vrijednostima PSA kod 18% svih muškaraca koji boluju od karcinoma prostate. Suspektan nalaz kod bolesnika

s vrijednostima PSA do 2 ng/ml ima pozitivnu prediktivnu vrijednost od 5 do 30% (59).

S obzirom na to da DRP i određivanje PSA ne otkrivaju uvijek iste karcinome, oba testa su komplementarna i trebaju se kod dijagnosticiranja karcinoma prostate provesti u kombinaciji (21).

### **1.5.2. Specifični antigen prostate (PSA)**

Specifični antigen prostate je biljeg koji je prvi put otkriven 1970. godine, ali do njegove kliničke primjene u urologiji prošlo je čitavo desetljeće. PSA je glikoprotein od 33 kd koji se ponaša kao serin proteaza te pripada kalikreinskoj obitelji (humani kalikrein 3) (21, 60). No o PSA se zbog praktičnih razloga govori kao o organ-specifičnom biljegu koji proizvode luminalne epitelne stanice prostate. Iako je PSA organ-specifičan, nije karcinom-specifičan (21).

U prilog nespecifičnosti govori i to da se PSA može naći u periuretralnim i perianalnim žlijezdama, kod cistitisa, u endometriju i u nekim tumorima (npr. uretre, mjehura, penisa, parotidnih žlijezda, bubrega, nadbubrežnih žlijezda, kolona, jajnika, pluća, jetre i dojke) (61).

Uloga ove androgen ovisne proteaze je likvefakcija sjemena nakon ejakulacije. PSA se u serumu normalno nalazi u niskim koncentracijama koje se mjere u ng/ml, a u serumu cirkulira u vezanom i slobodnom obliku. Većina PSA vezana je ili tvori komplekse s antiproteazama alfa 1-antikimotripsinom i makroglobulinom. Vezivanje slobodnog PSA za alfa 1-antikimotripsin uzrokuje inaktivaciju proteaze, ali taj kompleks ostaje imunodetektabilan. Za razliku od prethodnoga, kompleks PSA i makroglobulina ne može se otkriti postojećim testovima. Slobodni PSA nema proteolitičku aktivnost i imunodetektabilan je na testove koji se danas rabe. Koncentracija PSA u spermi je od 0,5 do 5,0 mg/ml, a normalne serumske koncentracije kod muškaraca u dobi od 50 do 80 godina su između 1 i 4 ng/ml. Stanice karcinoma prostate ne proizvode nužno više PSA od normalnih stanica

prostata. Porast vrijednosti PSA kod karcinoma vjerojatno je uzrokovan progresijom karcinoma i destabilizacijom histološke arhitekture prostate (21). Specifičnost u kliničkoj praksi jest to da se vrijednosti PSA mijenjaju ovisno o dobi bolesnika, BPH, dijagnostičkim i terapijskim postupcima, upali i retenciji urina (60).

Vrijednosti PSA povećavaju se oko 0,3 ng/ml po gramu tkiva kod BPH, dok je vrijednost PSA po gramu karcinoma 3 ng/ml (62, 63).

S obzirom na to da PSA nije karcinom-specifičan biljeg, visoka je stopa lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata testiranja PSA. U prilog nespecifičnosti PSA idu i rezultati prema kojima od 20 do 30% muškarca s karcinomom prostate ima vrijednost PSA manju od 4 ng/ml. U istraživanoj skupini od 2950 bioptiranih muškaraca praćenih na temelju vrijednosti PSA tijekom sedam godina, njih 15% imalo je karcinom prostate s vrijednošću PSA manjom od 4 ng/ml. Kod onih čija je vrijednost PSA bila od 2 do 3 ng/ml i od 3 do 4 ng/ml, incidencija karcinoma prostate bila je 23,9%, odnosno 26,9% (64).

Unatoč tome PSA kao neovisna varijabla bolje upozorava na postojanje karcinoma nego suspektan DRP ili TRUZ (60).

Što je vrijednost PSA veća, i vjerojatnost postojanja karcinoma prostate je veća, dok općeprihvaćene gornje granice normalne vrijednosti za PSA još nema (65, 66).

Tablica 2 upozorava na važnost spuštanja praga za normalnu vrijednost PSA (65).

Tablica 2. Rizik za karcinom prostate kod niskih vrijednosti PSA (65)

<b>Vrijednost PSA (ng/ml)</b>	<b>Rizik za karcinom prostate (%)</b>
0-0,5	6,6
0,6-1	10,1
1,1-2	17,0
2,1-3	23,9
3,1-4	26,9

Praćenje vrijednosti PSA ima najvažnije mjesto u uspješnosti liječenja karcinoma prostate. Te vrijednosti daju informacije o učinkovitosti liječenja, pomažu u utvrđivanju vjerojatnosti postojanja rezidualne bolesti, upozoravaju na biokemijski relaps i pojavu metastatske bolesti prije nego što je to moguće utvrditi drugim dijagnostičkim metodama (67, 68).

Unatoč brojnim prednostima PSA nije savršen tumorski biljeg. Radi povećanja specifičnosti PSA danas se još određuju: dobno specifični PSA (engl. „age specific PSA“), brzina porasta PSA (engl. „PSA velocity“), gustoća PSA (engl. „PSA density-PSAD“), gustoća PSA prijelazne zone (engl. „transition zone PSA density“), omjer slobodnog i ukupnog PSA (engl. „free/total PSA“, f/t PSA) (64).

#### **1.5.2.1. Dobno specifičan PSA (engl. „age specific PSA“)**

Radi definiranja donje granice za biopsiju prostate i kako bi se povećala osjetljivost PSA testa kod mlađih muškaraca (radi otkrivanja izlječivog karcinoma u ranoj fazi bolesti) te specifičnost PSA testa kod starijih muškaraca (radi sprečavanja nepotrebnog liječenja), Oesterling i sur. (69) predložili su određivanje vrijednosti PSA specifičnih za određenu dob.

Na temelju tog zaključka određene su normalne vrijednosti PSA prema dobnim skupinama (tablica 3.).

Tablica 3. Normalne vrijednosti PSA za određenu dob (69)

<b>Dob</b>	<b>Granične vrijednosti PSA (ng/ml)</b>
40-49	2,5
50-59	3,5
60-69	4,5
70-79	6,5

### **1.5.2.2. Brzina porasta PSA (engl. „PSA velocity“)**

Brzina porasta PSA definira se kao apsolutni godišnji porast vrijednosti serumskog PSA (ng/ml/godina) (70).

Carter i sur. (21) pokazali su da je brzina porasta PSA veća od 0,75 ng/ml/godina specifičan pokazatelj postojanja karcinoma prostate kod muškaraca s vrijednostima PSA između 4 i 10 ng/ml.

Vrijeme udvostručenja vrijednosti PSA mjeri eksponencijalni porast vrijednosti serumskog PSA tijekom vremena te odražava tako njegovu relativnu promjenu (71).

Ove dvije metode, vrijeme udvostručenja vrijednosti PSA i brzina porasta PSA, imaju prognostičku vrijednost kod bolesnika liječenih zbog karcinoma prostate (72).

U dijagnostici karcinoma prostate učinkovitost tih metoda ograničena je zbog utjecaja ukupnog volumena prostate, postojanja BPH te porasta i smanjenja vrijednosti PSA tijekom vremena. Prospektivna istraživanja pokazala su da mjerenje tih vrijednosti ne daje više informacija u dijagnostici nego sam PSA (73-76).

### **1.5.2.3. Gustoća PSA (engl. „PSA density“)**

Zbog nespecifičnosti PSA i visoke učestalosti BPH teško je razlikovati je li porast PSA uzrokovao BPH ili karcinom. Zbog toga se određuju i gustoća PSA (omjer PSA i volumena prostate) te gustoća PSA tranzicijske zone (omjer PSA i volumena tranzicijske zone) (21).

Promatranjem vrijednosti PSA i veličine prostate pokušala se doznati razlika između porasta PSA koji uzrokuje BPH od porasta PSA koji uzrokuje karcinom. Otkriveno je da se kod vrijednosti gustoće PSA od 0,15 naviše preporučuje biopsija za muškarce kod kojih je vrijednost PSA od 4 do 10 ng/ml, a DRP uredan (21).

Djavan i sur. (21) objavili su 1999. godine rezultate istraživanja kojim su pokazali da određivanje gustoće PSA tranzicijske zone ima najveću

senzitivnost i specifičnost u otkrivanju karcinoma prostate kod vrijednosti PSA između 4 i 10 ng/ml.

Mjerenje gustoće PSA korisna je dodatna metoda u procjeni rizika od karcinoma prostate (21).

#### **1.5.2.4. Omjer slobodnog i ukupnog PSA (f/t PSA)**

Za razlikovanje BPH od karcinoma prostate u kliničkoj se praksi najviše istražuje i primjenjuje omjer slobodnog i ukupnog PSA (f/t PSA). Tim omjerom određuje se rizik za postojanje karcinoma kod muškaraca koji imaju vrijednosti PSA između 4 i 10 ng/ml uz negativan DRP. U prospektivnom, multicentričnom istraživanju karcinom prostate potvrđen je biopsijom kod 56% muškaraca s vrijednošću f/t PSA manjom od 0,10, a samo kod 8% onih s vrijednošću f/t PSA većom od 0,25 (77).

U praksi omjer slobodnog i ukupnog PSA treba primjenjivati oprezno zbog mnogih čimbenika koji na njega utječu. Slobodni PSA nije stabilan na 4 °C i sobnoj temperaturi. Prisutnost BPH može uzrokovati tzv. dilucijski efekt (efekt razrjeđivanja) (78). Nadalje, određivanje tog omjera posve je beskorisno u slučaju kada su vrijednosti PSA veće od 10 ng/ml te u praćenju bolesnika kod kojih je dijagnosticiran karcinom prostate (78).

#### **1.5.2.5. Antigen karcinoma prostate 3 (PCA3, engl. „prostate cancer antigen 3“)**

Za razliku od serumskih biljega, specifičan biljeg prostate za nekodirajući mRNA (PCA3) određuje se u sedimentu urina dobivenom nakon masaže prostate. Glavne prednosti PCA3 u odnosu na PSA jesu njegova veća senzitivnost i specifičnost. Na vrijednost PCA3 ne utječu ni volumen prostate ni prostatitis (79-81). Iako PCA3 ima potencijalnu važnost u otkrivanju karcinoma prostate kod muškaraca s inicijalno negativnom biopsijom, takva njegova uloga za sada ostaje eksperimentalna. U skoroj budućnosti u primjeni bi se moglo naći nekoliko molekularnih testova za

otkrivanje karcinoma prostate, primjerice test za karcinom prostate specifičnih TMPRSS2-erg fuzijskih gena u sedimentu urina nakon masaže prostate (82, 83).

### **1.5.3. Transrektalni ultrazvuk (TRUZ)**

Transrektalni ultrazvuk su prvi put opisali Watanabe i sur. (21), a u kliničku rutinu, uz tehničko usavršavanje aparata, kao sekstant biopsiju uveli su ga Hodge i sur. (21).

Fučkar i sur. (84) iznijeli su 1985. godine prvi put svoja iskustva u radu transrektalnim ultrazvukom u urologiji na našim prostorima.

Visoka rezolucija transrektalne sonde omogućuje prikaz zona prostate, osobito starijih bolesnika kod kojih prijelazna zona zbog hiperplazije prostate potiskuje perifernu zonu i tako može činiti i 90% volumena prostate. Ta činjenica vrlo je važna u slučaju eventualne biopsije prostate kada se u obzir uzima učestalost karcinoma po zonama. U perifernoj zoni je oko 75% karcinoma, u centralnoj 5%, a u prijelaznoj zoni karcinom je zastupljen u gotovo 20% slučajeva (43).

Uloga TRUZ-a nije samo u jasnom prikazu i ciljanom uzimanju bioptata iz zona s najčešćim sijelom karcinoma već i u vizualizaciji žarišnih lezija u prostatičnom tkivu kao potencijalnih karcinoma prostate (85-87).

Karcinom prostate prikazuje se kao hipoehogena lezija u 60 do 70% slučajeva, a izoehogen je u 30 do 40% slučajeva. Iznimno rijetko karcinomi prostate spominju se kao hiperehogene lezije, i to najviše u 1,5% slučajeva (85, 86). No najnovije istraživanje pokazalo je da hiperehogeni karcinomi nisu slučajan nalaz, već se pojavljuju u 7,6% ukupno dijagnosticiranih karcinoma (87).

### **1.5.4. Biopsija prostate**

Odluka o biopsiji prostate donosi se na temelju razine PSA i/ili suspektnog DRP-a. U obzir treba uzeti i biološku dob bolesnika, potencijalni komorbiditet i terapijske posljedice.



Prvi nalaz povišenih vrijednosti PSA nije indikacija za promptnu biopsiju prostate. PSA treba ponovno provjeriti za nekoliko tjedana istim testom, pod istim uvjetima i u istom laboratoriju te isključiti mogući utjecaj kateterizacije, cistoskopije ili transuretralne resekcije te infekcije mokraćnog sustava (88, 89).

Biopsija prostate pod kontrolom ultrazvuka danas je standardna dijagnostička metoda. Iako se najčešće primjenjuje transrektalni pristup, neki urolozi preferiraju perinealni pristup. Rezultati otkrivanja karcinoma prostate perinealnim pristupom mogu se usporediti s transrektalnim pristupom (90, 91).

Indikacije za ponovljenu biopsiju prostate jesu povišena vrijednost PSA ili vrijednost PSA koja se stalno povećava, suspektan DRP i prisutnost ASAP-a u prethodnoj biopsiji. Optimalno vrijeme za ponavljanje biopsije nije definirano. Biopsija se ponavlja ovisno o histološkom nalazu prethodne biopsije (npr. ASAP) i stalnoj sumnji za postojanje karcinoma prostate (visoka vrijednost PSA, suspektan DRP, pozitivna obiteljska anamneza). Što se biopsija kasnije ponovi, veća je stopa otkrivanja karcinoma (92).

PIN visokog stupnja kao izolirani histološki nalaz u bioptatu više nije indikacija za ponavljanje biopsije (93). Ako je PIN prisutan u više bioptata uz porast vrijednosti PSA, može biti razlog za ranije ponavljanje biopsije zbog blago povećanog rizika od karcinoma prostate (94).

Magnetska rezonancija preporučuje se ako sumnja na karcinom prostate postoji unatoč tome što je nalaz biopsije negativan. Tada se može ponoviti TRUZ-om ili magnetskom rezonancijom vođena biopsija prostate iz suspektnih područja (95).

Incidencija karcinoma prostate na ponovljenoj saturacijskoj biopsiji je između 30 i 43% te ovisi o broju cilindara uzetih u prethodnim biopsijama (96).

Prva biopsija treba zahvatiti stražnje i što lateralnije dijelove u periferiji žlijezde. Dodatni cilindri mogu se uzeti iz suspektnih područja na DRP-u i TRUZ-u. Kod volumena prostate od 30 do 40 ml uzima se najmanje osam cilindara (97). Uzimanje više od 12 cilindara znatnije ne povećava otkrivanje karcinoma. Britanski stručnjaci predlažu uzimanje 10 cilindara (98).

Dijagnostička transuretralna resekcija prostate nema prednosti pred ponovljenom biopsijom. Stopa otkrivanja karcinoma na taj način manja je od 8% (99).

Biopsija sjemenih mjehurića indicirana je samo ako utječe na odluku o liječenju (odustajanje od radikalne prostatektomije ili radioterapije). Kod vrijednosti PSA većih od 15 ili 20 ng/ml vjerojatnost za tumorsku zahvaćenost sjemenih mjehurića je 20-25% (100).

Stopa otkrivanja karcinoma prijelazne zone biopsijom, ako je riječ o prvoj biopsiji, vrlo je mala i treba je uključiti tek kod ponovljenih biopsija (101).

Za antibiotsku profilaksu prije biopsije preporučuju se fluorokinoloni (najčešće ciprofloksacin), dok se za lokalnu anesteziju preporučuje ultrazvučno vođeni periprostatični blok jer se pokazao boljim od intrarektalne primjene lokalnog anestetika (102, 103).

Komplikacije nakon biopsije su rijetke i prikazane su u tablici 4 (104). Manjim komplikacijama smatraju se makrohemorurija i hematospermija, a postproceduralne infekcije pojavljuju se u manje od 1% slučajeva (104).

Tablica 4. Komplikacije nakon biopsije neovisno o broju bioptata (104)

<b>KOMPLIKACIJE</b>	<b>% BIOPSIJA</b>
Hematospermija	37,4
Hematurija > 1 dan	14,5
Krvarenje iz rektuma < 2 dana	2,2
Prostatitis	1,0
Vrućica > 38,5 °C	0,8
Epididimitis	0,7
Krvarenje iz rektuma > 2 dana i/ili zahtijeva kiruršku intervenciju	0,7
Retencija urina	0,2
Ostale komplikacije koje zahtijevaju hospitalizaciju	0,3

Povećanjem broja bioptata po biopsiji ne povećava se stopa težih komplikacija, a niske doze salicilata više nisu apsolutna kontraindikacija za biopsiju (105).

Cilindri dobiveni biopsijom prostate šalju se na patohistološku analizu u zasebnim posudicama i komorama za uzorke. Potrebno je zabilježiti broj, dužinu svakog cilindra te mjesto odakle je uzet bioptat. Zamijećena je velika povezanost između dužine uzorka tkiva prostate na histološkom prerezu i stope otkrivanja karcinoma prostate (106).

Kako bi se postignula optimalna dužina i debljina cilindara, potrebno je po komori smjestiti najviše tri cilindra uz upotrebu spužvi ili papira koji održavaju cilindre rastegnutima i spljoštenima (107, 108), a da bi se optimiralo otkrivanje malih lezija, blokovi se trebaju rezati u tri razine (101).

Dijagnoza karcinoma prostate temelji se na histološkom pregledu, no često je potrebna pomoć imunohistokemije (109, 110). Zamijete li se suspektne žljezdane promjene, mogu se upotrijebiti i dodatne tehnike bojenja (npr. bojenje bazalnih stanica) te dodatni (dublji) rezovi (110, 111). Sve dijagnostičke nejasnoće razjašnjavaju se konzultacijama s kolegama u timu unutar patohistološkog laboratorija ili traženjem drugog mišljenja u nekoj vanjskoj ustanovi (109). U patohistološkim izvještajima treba izbjegavati termine kao što su „atipija“, „atipične žlijezde“ ili „suspektan malignitet“ (108). Za svako mjesto biopsije u izvještaju treba navesti postotak bioptata s dokazanim karcinomom i Gleasonovim zbrojem prema sustavu prihvaćenom 2005. godine (112). Prema međunarodnom dogovoru koji se sada primjenjuje, modificirani Gleasonov zbroj za karcinome otkrivene biopsijom prostate sastoji se od Gleasonova zbroja dominantne komponente karcinoma i onoga najvišeg gradusa neovisno o njegovoj zastupljenosti (bez pravila od 5%). Kada uzorak karcinoma ima većinom gradus 4/5, zanemaruje se nalaz malog postotka (<5%) Gleasonova gradusa 2 ili 3. U nalazu biopsije ne dodjeljuje se Gleasonov zbroj 4 ili manji (112). Postotak i dužina karcinoma koji zahvaća bioptat koreliraju s volumenom tumora, ekstraprostatičnom ekstenzijom i prognozom nakon prostatektomije i zato trebaju biti navedeni u izvještaju patologa (113, 114). Dužina karcinoma i postotak karcinoma u bioptatu imaju jednaku prognostičku važnost (115). Postojanje jednoga

malog žarišta adenokarcinoma u samo jednom bioptatu treba jasno navesti u nalazu (npr. <1 mm ili <1%) jer to može biti indikacija za daljnju dijagnostičku obradu prije konačnog odabira terapije. U nekim istraživanjima postojanje karcinoma manjeg od 3 mm u jednom bioptatu s Gleasonovim zbrojem 5 ili 6 smatra se nesignifikantnim karcinomom (116, 117).

#### **1.5.5. Rano otkrivanje karcinoma prostate - probir (screening)**

Mortalitet od karcinoma prostate u zemljama u razvoju drukčiji je od onoga u industrijaliziranim zemljama (118). U SAD-u, Austriji, Velikoj Britaniji i Francuskoj smanjen je mortalitet od karcinoma prostate. U Švedskoj je od 1960. do 1988. godine povećano petogodišnje preživljenje, najvjerojatnije zbog povećanja dijagnostičkih aktivnosti i otkrivanja većeg broja klinički neznčajnih tumora (119), no taj trend nije potvrđen u istraživanju provedenom u Nizozemskoj (120). Nedavno potvrđeno smanjenje mortaliteta u SAD-u pripisuje se agresivnijoj politici probira, ali još ne postoji siguran dokaz da probir PSA smanjuje mortalitet od karcinoma prostate (121).

Nerandomizirani projekt probira u Tirolu (Austrija) podržava hipotezu o utjecaju probira na smanjenje mortaliteta od karcinoma prostate. Zbog programa ranog otkrivanja i besplatnog liječenja koji se provodio u Tirolu mortalitet od karcinoma prostate bio je 33% manji u toj pokrajini nego u ostalim dijelovima Austrije (122).

Dugoočekivani rezultati dviju prospektivnih, randomiziranih studija objavljeni su 2009. godine. Tijekom projekta probira za karcinom prostate, pluća, kolorektuma i jajnika (engl. „Prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial“, PLCO) nasumično su na godišnji probir za određivanje vrijednosti PSA i DRP-a odabrana 76.693 muškarca iz 10 američkih centara. Nakon 7 godina praćenja incidencija karcinoma prostate na 10.000 osoba bila je 116 na godišnjoj razini (2820 karcinoma) u skupini s probirom i 95 (2322 karcinoma) u kontrolnoj skupini. Incidencija smrti na 10.000 osoba godišnje bila je 2,0 (50 smrtnih slučajeva) u skupini s probirom te 1,7 (44 smrtna slučaja) u kontrolnoj skupini (123).

Europska randomizirana studija za probir karcinoma prostate (engl. „European randomized study of screening for prostate cancer“, ERSPC) obuhvatila je ukupno 162.243 muškarca iz 7 zemalja u dobi od 55 do 69 godina. Muškarci su nasumično odabrani u skupinu kojoj je određivana vrijednost PSA u prosjeku jednom svake četiri godine te u kontrolnu skupinu koja nije podvrgnuta probiru. Tijekom 9 godina praćenja kumulativna incidencija karcinoma prostate bila je 8,2% u skupini podvrgnutoj probiru za razliku od 4,8% u kontrolnoj skupini. Stopa smrtnosti od karcinoma bila je 0,80 za skupinu podvrgnutu probiru. Zaključeno je da je potrebno 1410 muškaraca podvrgnuti probiru te još 48 dodatnih muškaraca podvrgnuti liječenju kako bi se spriječila jedna smrt od karcinoma prostate. Stručnjaci koji su sudjelovali u tom istraživanju zaključili su da je probir koji se temeljio na određivanju vrijednosti PSA smanjio stopu smrtnosti čak 20%, ali je bio povezan s visokim rizikom predijagnosticiranja (124).

Prema navodima iz tih dviju velikih studija, većina velikih uroloških centara zaključila je da masovni probir karcinoma prostate trenutno nije primjereno rješenje. Preporučuje se rano otkrivanje (oportunistički probir) koje treba ponuditi dobro informiranim muškarcima (125).

Dva pitanja ipak ostaju otvorena: u kojoj dobi započeti rano otkrivanje te koji su preporučeni intervali za vrijednosti PSA. Preporuka je da se s 40 godina života odredi bazična vrijednost PSA i prema njoj odredi interval daljnjih kontrola (126). Muškarcima s vrijednošću PSA manjom od 1 ng/ml preporučuje se interval probira od 8 godina (127). Za muškarce starije od 75 godina i uz bazičnu vrijednost PSA manju od 3 ng/ml nije potrebno daljnje određivanje PSA zbog toga što postoji mali rizik da će umrijeti od karcinoma prostate (128).

## **1.6. Liječenje lokaliziranog karcinoma prostate**

Klinički lokalizirani karcinom prostate liječi se na tri načina: radikalnom prostatektomijom, radioterapijom i aktivnim praćenjem uz terapiju ako je potrebno.

### **1.6.1. Radikalna prostatektomija**

Radikalna prostatektomija (RP) podrazumijeva odstranjenje cijele prostate i sjemenih mjehurića s dovoljno okolnog tkiva kako bi se postignuli negativni kirurški rubovi te obostranu zdjeličnu limfadenektomiju. Kod muškaraca s lokaliziranom bolesti i očekivanim životnim vijekom duljim od 10 godina cilj radikalne prostatektomije potpuna je eradikacija bolesti uz očuvanje kontinencije i kada je to moguće očuvanje potencije (129).

Radikalnu prostatektomiju u liječenje karcinoma prostate uveo je Young (130) početkom 20. stoljeća i to perinealnim pristupom, dok su Memmelaar i Millin (131) prvi izveli zahvat retropubičnim pristupom. Tek 1982. godine su Walsh i Donker (132) opisali anatomiju dorzalnog venskog pleksusa i neurovaskularnog snopa, što je rezultiralo znatnim smanjenjem intraoperativnog gubitka krvi te poboljšanjem kontinencije i potencije.

Perinealni pristup je manje invazivan pristup u kojem se gubi minimalna količina krvi. Nedostatak tog pristupa jest nemogućnost istodobne regionalne limfadenektomije (133).

Danas se sve više primjenjuju minimalno invazivni zahvati poput laparoskopskog RP-a i robotom asistiranog RP-a.

Zahvat laparoskopskim RP-om najviše se približio standardima retropubičnog RP-a zbog bolje vizualizacije operacijskog polja te eventualno bržeg oporavka bolesnika. No nedostaci ovog zahvata su gubitak neposrednog određivanja eventualnog proširenja tumora i nešto veći postotak pozitivnih rubova (134).

Uspoređivanjem retropubičnog i laparoskopskog ili robotom asistiranog RP-a zaključeno je da je gubitak krvi mnogo manji kod minimalno

invazivnih zahvata, dok između otvorenih i minimalno invazivnih zahvata nema razlika u funkcionalnim i onkološkim rezultatima (135).

Radikalna prostatektomija jedini je način liječenja lokaliziranog karcinoma prostate za koji je karakteristično značajno, za karcinom specifično, preživljenje u svim prospektivnim istraživanjima kada se uspoređuje s konzervativnim tretmanom (136).

Kvaliteta života pacijenta bit će nakon dobro obavljenog zahvata zadovoljavajuća, a iskustvo pridonosi smanjenju stope pozitivnih kirurških rubova (137). Liječenje karcinoma prostate radioterapijom daje dobre rezultate, ali su oni u usporedbi s RP-om još nešto lošiji (136).

Impotencija nakon RP-a posljedica je ozljede autonomnih kavernoznih živaca tijekom zahvata. Walsh i Donker su prvi opisali anatomiju neurovaskularnih snopova i na taj način omogućili razvoj kirurške metode očuvanja potencije kod spolno aktivnih i potentnih muškaraca kod kojih je lokalizirana bolest (138).

Povezanost između broja očuvanih neurovaskularnih snopova i oporavka potencije nakon operacijskog zahvata pokazuje da je za očuvanje potencije ključan neurogeni faktor. Potencija ostaje očuvana kod 31-86% spolno aktivnih muškaraca kojima su očuvana oba neurovaskularna snopa (138).

Na razlike u postotku erektilne disfunkcije unutar pojedinih istraživanih skupina ne utječe samo kvaliteta izvedbe kirurškog zahvata već i dob bolesnika, odabir bolesnika te preoperativna očuvanost spolne funkcije (139).

Danas postoje različita mišljenja o izboru odgovarajuće terapije lokaliziranog karcinoma prostate te o učinkovitosti i komplikacijama tih terapija. Zbog toga je od iznimne važnosti dobra procjena rizika od povrata bolesti, odnosno biokemijskog relapsa bolesti (BCR) nakon RP-a, glavnog načina liječenja lokalizirane bolesti. Petogodišnje preživljenje bolesnika bez BCR-a je od 70 do 87%, dok deset godina živi od 52 do 77% bolesnika (140-142).

## **1.6.2. Radikalna radioterapija**

Radikalna radioterapija karcinoma prostate alternativa je radikalnoj prostatektomiji i indicirana je kod bolesnika sa stadijem bolesti T1 ili T2. Može se podijeliti na vanjsku (konformalnu) radioterapiju i brahiterapiju (143).

Zbog tehnološkog napretka liječenje radioterapijom tijekom posljednjih godina daje rezultate koji se mogu usporediti s kirurškim liječenjem. Odnos kontrole bolesti i oštećenja zdravih okolnih organa ključan je kod ovog načina liječenja karcinoma prostate. Nakon pojave linearnog akceleratora 1960. godine u liječenju se počela primjenjivati megavoltna radioterapija, što je olakšalo liječenje duboko smještenih zdjelčnih tumora. Prije uvođenja kompjutorizirane tomografije (CT) plan liječenja sadržavao je neizravnu vizualizaciju veličine i položaja prostate upotrebom cistouretrografije i ortogonalnog filma na kojemu se mogao iscrtati volumen ciljnog organa. Precizno određivanje granica nije bilo moguće zbog mobilnosti prostate i zbog toga njezina različitog položaja u zdjelici u odnosu na terapijski uređaj. Polje zračenja u velikoj je mjeri zahvaćalo i zdravo tkivo pa se nije mogla povećavati terapijska doza zračenja. Istraživanja su potvrdila da doze zračenja primijenjene konvencionalnom metodom nisu bile terapijski primjerene (144).

### **1.6.2.1. Konformalna radioterapija**

Trodimenzionalna konformalna radioterapija unijela je radikalne promjene u praksu onkologa radioterapeuta. Cilj 3D konformalne metode jest precizno određivanje doze zračenja, čime se zapravo omogućuje povećanje doze zračenja na tumor bez većeg utjecaja na okolno, zdravo tkivo (144, 145).

Prvi korak u primjeni 3D konformalnog zračenja je simulacijski proces koji uključuje određivanje kontura ciljnog organa i okolnih organa izloženih riziku od zračenja. U tu svrhu primjenjuje se CT kao slikovna metoda uz primjenu 3D rekonstrukcija. Osim što se tako preciznije zrači ciljni organ, štite



se stražnji zid rektuma, analni kanal, tanko crijevo, dio mokraćnog mjehura koji nije zahvatio tumor i mokraćna cijev.

Točnim anatomskim definiranjem volumena u trodimenzionalnom prostoru izloženom zračenju omogućuje se točno izračunavanje doze koju će primiti svaka ciljna točka, a na taj način i izloženi okolni organi (146).

Konformalna metoda uz primjenu CT-a točno lokalizira ciljni organ tako da se sigurnosne granice mogu reducirati. Upotrebom kolimatora u polju zračenja oblikuje se volumen ciljnog organa i tako smanjuje volumen zdravog tkiva uključenog u područje najvećeg zračenja za 40-50%. Trenutačno se u liječenju povećava doza zračenja u ciljnom organu uz prihvatljive kasne nuspojave zračenja (144).

CT se pokazao kao suboptimalna metoda za određena anatomska mjesta, primjerice apeks prostate i zdjelične mišiće. Taj problem riješen je primjenom magnetske rezonancije u simulacijskom procesu prije zračenja (146).

Rezultati dvaju nedavno objavljenih randomiziranih istraživanja u kojima se uspoređivala stopa morbiditeta kod konvencionalnih doza zračenja s upotrebom ili bez upotrebe kolimatora i mortaliteta kod konformalne metode potvrdili su smanjenje akutne toksičnosti za područje anusa sa 16% na 8% i smanjenje morbiditeta povezanog uz probavni sustav s 15% na 5%. Kod 3D konformalne radioterapije smanjene su i kasne komplikacije povezane uz probavni sustav (144, 145).

#### **1.6.2.2. Brahiterapija**

Brahiterapija se može primijeniti u obliku trajnih, niskodoznih, radioaktivnih implantata (u upotrebi su radioizotopi joda 125, paladija 103 i cezija 137) ili u obliku privremenih visokodoznih implantata (iridija 192). Razvoj transrektalnog ultrazvuka omogućio je precizno postavljanje izvora zračenja na željeno područje ciljnog organa. Naglo opadanje doze zračenja s udaljenošću od nekoliko milimetara štedi okolne organe i strukture koje nisu cilj radioterapije. Rezultat je, nažalost, nedostatna terapijska pokrivenost periprostatskog prostora. Zbog toga se kod primjene niskodozne brahiterapije liječenje kombinira s vanjskom radioterapijom. Brahiterapija s

niskom i visokom dozom zračenja primjenjuje se u liječenju karcinoma prostate niskog, srednjeg i visokog rizika. Kod karcinoma niskog rizika može se primijeniti niskodozna brahiterapija kao monoterapija uz postizanje nedetektabilnih vrijednosti PSA unutar 4 do 7 godina. Kod karcinoma srednjeg rizika visokodozna brahiterapija može se kombinirati s vanjskim zračenjem. Androgena blokada se često preporučuje radi smanjenja volumena prostate. Kod karcinoma prostate visokog rizika kombiniraju se visokodozna brahiterapija, vanjsko zračenje i androgena blokada. U usporedbi s vanjskom, konformalnom radioterapijom brahiterapija omogućuje primjenu većih, učinkovitijih doza zračenja na ciljni organ (147).

### **1.6.3. Postoperativna radioterapija**

Radioterapija nakon primarnog liječenja karcinoma prostate dijeli se na:

1. adjuvantnu radioterapiju
2. "salvage" radioterapiju (radioterapiju spašavanja).

#### **1.6.3.1. Adjuvantna radioterapija**

Cilj adjuvantne radioterapije jest uništiti rezidualne tumorske stanice u prostatičnoj loži nakon kirurškog liječenja. Primjenom adjuvantne radioterapije prije razvoja BCR-a smanjuje se rizik od razvoja sistemske bolesti.

Adjuvantna radioterapija se danas preporučuje u slučaju izvanprostaticnog širenja bolesti (stadij pT3a), zahvaćanja sjemenih mjehurića (stadij pT3b) ili pozitivnih kirurških rubova. Unatoč tehničkom dosegom 3D konformalne radioterapije i radioterapije s prilagodbom intenziteta, još postoji rizik od ranih i kasnih toksičnih učinaka terapije.

Adjuvantna radioterapija uspoređivala se sa „salvage“ radioterapijom u mnogim retrospektivnim istraživanjima u koja su bili uključeni bolesnici s visokim rizikom za progresiju bolesti, a rezultati su potvrdili njezinu veću učinkovitost u lokalnoj i biokemijskoj kontroli bolesti (148, 149).

### **1.6.3.2. „Salvage“ radioterapija**

„Salvage“ radioterapija primjenjuje se u liječenju bolesnika koji razviju BCR nakon RP-a. Kod „salvage“ radioterapije preporučene doze zračenja su od 64 do 68 Gy uz mogućnost povećanja doze do 70 Gy. Taj oblik radioterapije jedini je potencijalno kurativni način liječenja za bolesnike kojima se nakon kirurškog liječenja povećava PSA. Rezultati novijih istraživanja pokazali su da „salvage“ radioterapija najbolji učinak ima kada se primijeni pri vrijednostima PSA manjim od 1 ng/ml ili čak manjim od 0,5 ng/ml.

Tijekom jednogodišnjeg praćenja bolesnika liječenih „salvage“ radioterapijom njih 18 do 64% imalo je nedetektibilne vrijednosti PSA.

Sva istraživanja jasno pokazuju da uspjeh „salvage“ radioterapije primarno ovisi o dozi zračenja i vrijednostima PSA prije započinjanja zračenja (150, 151).

### **1.6.4. Aktivno praćenje**

Za neke bolesnike koji imaju bolest niskog rizika radikalne terapijske metode često nisu primjerene jer ih izlažu nepotrebnim traumama koje proizlaze iz kirurškog zahvata, radioterapije i drugih načina liječenja te njihovih komplikacija. Tako su bolesnici kojima je predložena radikalna prostatektomija izloženi riziku razvoja erektilne disfunkcije i inkontinencije, a nakon eventualne radioterapije postoji uz navedeno i rizik od oštećenja crijeva. Činjenica da se karcinom prostate sporo razvija omogućuje da se pojedini bolesnici s lokaliziranom bolesti aktivno prate.

Radi sprečavanja nepotrebnog liječenja bolesnika s nesignifikantnim karcinomom, a osiguravanja liječenja onima kojima je ono potrebno, aktivno praćenje prvi je put kao mogući pristup liječenju lokaliziranog karcinoma prostate opisano 2001. godine i podrazumijeva redovite šestomjesečne kontrole vrijednosti PSA uz DRP. Aktivno liječenje provodi se nakon razvoja simptoma ili objektivizacije progresije bolesti na temelju radioloških kriterija ili prema vrijednosti PSA te u slučaju bolesnikove odluke da se liječi.

Opravdanost primjene aktivnog praćenja bolesnika u ranom stadiju bolesti temelji se na rezultatima retrospektivnih istraživanja, među kojima je i ono provedeno u Švedskoj. U tom istraživanju 81% bolesnika u stadiju bolesti T1-T2 imalo je ukupno preživljenje od 15 godina. Većina bolesnika koja se odluči za aktivno praćenje pripada starijoj dobnoj skupini s osjetnim komorbiditetom (152, 153).

## **1.7. Biokemijski relaps (BCR)**

Unatoč tehničkom napretku i smanjenju komplikacija povezanih uz radikalnu prostatektomiju i radioterapiju, postoji znatan rizik od povrata karcinoma nakon provedene terapije. Od svih bolesnika koji su podvrgnuti radikalnoj prostatektomiji ili radioterapiji, njih 27-53% razvit će lokalni ili udaljeni povrat bolesti 10 godina od početne terapije, dok će njih 16-35% primiti drugu liniju terapije pet godina od početne terapije (154-156).

Neuspjeh primarne terapije definira se porastom vrijednosti PSA. Istraživanje Pounda i sur. (157) pokazalo je da nijedan bolesnik praćen dulje od pet godina nije razvio povrat bolesti bez porasta vrijednosti PSA.

Svaka detektabilna vrijednost PSA nakon radikalne prostatektomije ili porast vrijednosti PSA nakon razdoblja nedetektabilnog PSA naziva se biokemijskim relapsom. Vrijednosti PSA nakon radikalne prostatektomije određuju se u određenim vremenskim intervalima i osnovna su metoda postoperativnog praćenja bolesnika i otkrivanja ponovne pojave bolesti (158).

Biokemijskim relapsom nakon radikalne prostatektomije smatraju se dvije uzastopne vrijednosti PSA veće od 0,2 ng/ml (159).

Biokemijski relaps nakon radioterapije definira se kao porast  $PSA \geq 2$  ng/ml od najniže vrijednosti („nadir“ vrijednost) nakon zračenja (160).

Kad se biokemijski relaps jednom dijagnosticira, najvažnije je razlikovati lokaliziranu bolest od proširene bolesti (161).

Čimbenici koji pomažu razlikovati lokalni relaps od udaljenoga jesu: vrijeme porasta PSA nakon operacije, ubrzanje PSA, vrijeme udvostručenja PSA, patohistološki stadij i Gleasonov zbroj nakon prostatektomije (160).

Istraživanja su pokazala da je vrijeme udvostručenja  $PSA \leq 4$  mjeseca povezano s udaljenom bolesti, dok su povećane vrijednosti  $PSA \geq 12$  mjeseci povezane s lokalnim relapsom (162). Ubrzanje  $PSA < 0,75$  ng/ml/godina javlja se kod 94% bolesnika s lokalnim relapsom bolesti, a 56% bolesnika s udaljenom bolesti ima ubrzanje  $PSA > 0,75$  ng/ml/godina (163).

Prema današnjim spoznajama, nema indikacije za TRUZ vođenu biopsiju vezikoureteralne anastomoze radi dijagnosticiranja lokalnog relapsa zbog njezine male osjetljivosti i male prediktivne vrijednosti kod  $PSA < 1,0$  ng/ml (125).

### **1.8. Adhezivna molekula epitelnih stanica (EpCAM, od engl. „Epithelial cell adhesion molecule“)**

Adhezivnu molekulu epitelnih stanica (EpCAM) prvi put opisali su 1979. godine Koprowski i sur. (164). EpCAM je glikoprotein od 40 kd izvorno identificiran kao tumorski biljeg zbog svoje visoke izraženosti u brzo proliferativnim tumorima epitelnog porijekla. Normalne epitelne stanice različito izražavaju EpCAM, ali u manjoj mjeri od karcinomskih stanica (204). EpCAM je transmembranski protein koji se sastoji od 232 aminokiseline, a kodira ga gen GA733 (165, 166).

EpCAM ima različite uloge, a uključuje adheziju, migraciju, diferencijaciju i proliferaciju stanica, morfogenezu (organogeneza i regeneracija), signalnu ulogu, ulogu u metastaziranju, utjecaj na stanični ciklus i stanični metabolizam (164).

Usto, važna je molekula za održavanje integriteta epitela te ima veliku ulogu u normalnom embrionalnom razvoju i homeostazi zrelih tkiva. Reaktivacija embrionalnog modela njegove izraženosti prati procese regeneracije i popravka epitelnog tkiva odraslih (165).

EpCAM je izražen na bazolateralnoj strani većine kubičnog ili cilindričnog epitela, pseudovišeslojnom cilindričnom epitelu i prijelaznom epitelu (167). Normalni višeslojni pločasti epitel ne izražava EpCAM (168).

Pojačana izraženost EpCAM-a u normalnim okolnostima povezana je s pojačanom proliferacijom i smanjenom diferencijacijom epitelnih stanica. U proliferativnoj fazi izraženost EpCAM-a povezana je s remodeliranjem epitelnog tkiva. Nakon proliferacije stanica pada izraženost EpCAM-a i započinje proces diferencijacije. Sve to čini EpCAM morforegulatornim proteinom (169). EpCAM je uključen u benignu i malignu staničnu proliferaciju, a dokazano je da utječe i na pojačanu izraženost protoonkogeno c-myc i ciklina A/E te da smanjuje stupanj stanične diferencijacije (170).

Sastoji se od dvije domene slične epitelnom faktoru rasta. Stvaranje adhezija posredovanih EpCAM-om ima negativan regulatorni učinak na adhezije kojima posreduju klasični kaderini, što snažno utječe na diferencijaciju i rast epitelnih stanica (166).

Izvanstanična domena EpCAM-a u interakciji je s drugom molekulom EpCAM-a, što uzrokuje homotipsku adheziju između dviju stanica. Iz toga proizlazi i sam naziv molekule. EpCAM je u izravnoj interakciji s kladinom 7, proteinom koji je važan za stvaranje čvrstih veza, što upozorava na ulogu EpCAM-a u adherenciji. Izravna interakcija  $\alpha$ -aktinina s unutarstaničnom domenom povezuje EpCAM s citoskeletnom organizacijom stanice. EpCAM modulira izraženost nuklearnog faktora kB (NK-kB) i c-myc. Na taj način EpCAM utječe na migraciju stanica, metastaziranje i signalizaciju između stanica (164).

Citoplazmatska, unutarstanična domena EpCAM-a ima dva vezna mjesta za  $\alpha$ -aktinin, a preko njih ostvaruje vezu s citoskeletom. Tako EpCAM sudjeluje u formiranju i regulaciji dinamične stromalne mreže (164).

Nedavna spoznaja da je EpCAM u izravnoj interakciji sa staničnom adhezivnom molekulom, promotorom tumorskog metastaziranja (CD44v4-v7), upozorava da taj kompleks, u koji je uključen i kladin 7, utječe na adheziju stanica, otpornost prema apoptozi i time pridonosi karcinogenezi i metastaziranju. Tetraspanini su integralni membranski proteini i povezani su

s metastaziranjem. EpCAM stvara komplekse s CD9 u tetraspaninskoj mreži, što može objasniti potencijalnu ulogu EpCAM-a u metastaziranju (164).

Prema istraživanju Litvinova i sur. (164), EpCAM je funkcionalni antagonist E-kaderinu. EpCAM negativno modulira staničnu adheziju posredovanu kaderinom i na taj način slabi čvrste veze između stanica. Takvo slabljenje veza u karcinomu omogućava odvajanje stanica i njihovo metastaziranje (164).

Ovisno o mikrokolišu i izraženosti EpCAM-a, on kod normalnog epitela može spriječiti migraciju stanica i jačati njihovu vezu, dok kod karcinoma potiče migraciju, a time i metastaziranje (164).

EpCAM funkcionira kao homotipska međustanična adhezivna molekula. Njegova sposobnost za regulaciju transkripcijskih gena, kao što su oni za enzime gušterače, upućuje na to da ta molekula ima signalnu ulogu važnu za epitelnu morfogenezu (171).

EpCAM je prisutan i u embrionalnim matičnim stanicama. Tijekom embriogeneze izraženost EpCAM-a inducirana je u procesima sazrijevanja i diferencijacije nekih struktura. Potpuno diferencirane i specijalizirane stanice prestaju izražavati EpCAM (164).

U zrelim tkivima EpCAM je virtualno izražen u svim jednostavnim epitelima i njegova izraženost u pravilu se ne mijenja. No njegova izraženost može se promijeniti u progenitorskim epitelnim stanicama. Gubitak izraženosti EpCAM-a povezan je sa smanjenjem progenitorske aktivnosti, što upućuje na to da stupanj diferencijacije i specijalizacije stanice barem djelomično ovisi o njegovoj izraženosti (164).

U upalnom odgovoru dolazi do pojačane ili *de novo* izraženosti EpCAM-a. Isto se događa i kod oštećenja epitela te tako EpCAM sudjeluje u procesima regeneracije (164).

Epitelne stanice su najvažnije stanice u razvoju karcinoma kod ljudi. Iako je EpCAM antigen izražen u većini tumora epitelnog porijekla, neke stanice ga uopće ne izražavaju (keratinociti odraslih, parijetalne stanice želuca, mioepitelne stanice i hepatociti) (167). Metaplazija, displazija i maligna proliferacija praćene su pojačanom izraženošću EpCAM-a (165).

EpCAM je tipično pojačano izražen u većini karcinoma. Nije izražen u tumorima mezodermalnog i ektodermalnog porijekla, primjerice neurogenih tumora, sarkoma, melanoma i limfoma. Njegova je pojačana izraženost najčešće povezana sa smanjenjem preživljenja (karcinom dojke i jajnika). Iznimka je karcinom bubrežnih stanica, gdje je pojačana izraženost EpCAM-a pozitivno povezana s preživljenjem. Za razliku od normalnog epitela, gdje je EpCAM najčešće izražen na bazolateralnoj strani stanične membrane, njegova distribucija kod karcinoma promjenjiva je i ovisi o tipu karcinoma. Tako je kod dobro diferenciranog karcinoma kolona EpCAM homogeno izražen na bazolateralnoj strani membrane, a kod umjereno diferenciranog karcinoma vidljiva je membranozna, citoplazmatska i luminalna izraženost (164).

Danas se malo zna o molekularnim mehanizmima regulacije izraženosti EpCAM-a. Gires i sur. (164) pokazali su da faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ) može smanjiti izraženost EpCAM-a, što je kontradiktorno spoznajama povezanima uz kroničnu upalnu bolest jetre.

Dobro je poznata izraženost EpCAM-a u različitim karcinomima, primjerice kolona, rektuma, jetre, pluća, glave i vrata te dojke (212). Mnoge studije dokazale su povezanost izraženosti EpCAM-a s lošom prognozom bolesti, primjerice kod karcinoma dojke, mokraćnog mjehura i jednjaka (168, 173, 174).

Spizzo i sur. (171, 175) u dva istraživanja proučavali su povezanost izraženosti EpCAM-a s prognozom bolesti i utvrdili da njegova jača izraženost kod karcinoma dojke i jajnika upozorava na smanjenje preživljenja.

Prema istraživanju Osta i sur. (164), smanjena izraženost EpCAM-a uzrokuje smanjenje proliferacije stanica karcinoma dojke. Pojačana izraženost EpCAM-a povezana je s metastaziranjem u limfne čvorove, povratom bolesti i mortalitetom kod karcinoma dojke (164).

Samo u jednom istraživanju proučavana je povezanost izraženosti EpCAM-a u stanicama karcinoma prostate s prognozom bolesti, ali nije potvrđena (176).



Zbog svega navedenog protein EpCAM jedan je od kandidata koji bi mogli biti od pomoći u dijagnostici tumora i terapiji. Mnoge studije navode da je EpCAM poželjan cilj tumorske terapije preko monoklonalnih protutijela ili vakcinacije (164).

## **1.9. Connexin 43 (Cx43)**

Connexini su proteini i sastavni su dio kanala koji povezuju stanice u spojevima pod imenom „gap junctions“ (pukotinski spojevi) (177). Pripadaju obitelji transmembranskih proteina koji omogućuju međustaničnu komunikaciju (178).

Takvi kanali propuštaju male molekule i ione veličine do 1 kd, uključujući i druge glasnike (179). U normalnim stanicama prostate, connexin 43 (Cx43) pojavljuje se u tri molekularna oblika: nefosforiliranom obliku od 41 kd te u dva fosforilirana oblika od 43 do 45 kd (179). Fosforilirani oblik Cx43 ključan je za formiranje funkcionalnog pukotinskog spoja (179). Gubitak komunikacije između tumorskih stanica povezan je s tri tipa abnormalnosti connexina: smanjenom izraženosti connexina, tirozin-fosforilacijom connexina i oštećenjem u posttranslacijskoj obradi connexina, što uzrokuje kompletni nedostatak pukotinskih spojeva u karcinomskim stanicama prostate (179). Šest connexinskih monomera čini polovicu pukotinskog spoja ili tzv. connexon (180, 181).

Do sada je klonirano 16 različitih gena za connexin. Iako slično raspoređeni, različito su izraženi u tkivima, stvaraju kanale različite propusnosti i pokazuju specifičnosti u spajanju s drugim connexinima. Tako različiti pukotinski spojevi građeni od različitih connexina različito reguliraju međustaničnu komunikaciju (182).

Pukotinski spojevi imaju ulogu u tkivnoj homeostazi i sinkronizaciji stanične aktivnosti te se pretpostavlja da bi izraženost connexina mogla biti

jedna od genetskih promjena uključenih u inicijaciju i progresiju neoplazmi (181).

Mnoge karcinomske stanice pokazuju promjene ili gubitak međustanične komunikacije (180).

Olakšavajući prolazak toksičnih metabolita lijekova ili signala koji induciraju apoptozu, pukotinski spojevi utječu i na odgovor karcinomskih stanica na liječenje (180, 181).

Mnoge *in vitro* i *in vivo* studije pokazale su da vraćanje gena za connexin genskom terapijom u tumorske stanice smanjuje njihov rast i inducira epitelnu diferencijaciju (182).

Pukotinski spojevi sudjeluju u kontroli stanične proliferacije i ta je funkcija vidljiva u razvoju karcinoma (179). Destabilizacija međustaničnih spojeva omogućava invazivno ponašanje epitelnih stanica (177).

Da Cx43 djeluje kao supresor tumorskog rasta, dokazuje njegova uloga u regulaciji staničnog rasta, staničnoj diferencijaciji i smrti stanice (177, 178, 183). Geni za proteine connexine pripadaju obitelji tumor-supresorskih gena (184).

Mesnil i sur. (185) proučavali su međustanične spojeve u karcinogenezi i dokazali ulogu connexina i razlike u njihovoj izraženosti kod različitih karcinoma. Xu i sur. (183) zamijetili su znatno smanjenje izraženosti Cx43 u karcinomima pluća, a pojačana izraženost Cx43 inhibirala je proliferaciju stanica, što samo potvrđuje već spomenutu tvrdnju o njegovu tumor-supresorskom učinku. Li i sur. (186) proučavali su karcinom dojke i otkrili da je u njemu smanjena prisutnost Cx43, dok njegova izraženost smanjuje metastatski potencijal karcinoma. Istraživanje Brehma i sur. (184) dokazalo je da je izostanak sinteze Cx43 uzrokovao progresiju karcinoma *in situ* testisa u seminom.

U epitelnim stanicama ljudske prostate prisutni su Cx32 i Cx43 (182). Connexini koji se nalaze u području međustaničnog spoja kod dobro diferenciranih adenokarcinoma prostate počinju se akumulirati intracelularno kako tumor postaje manje diferenciran, a kod uznapredovalih tumora zamijećen je gubitak njihove ekspresije (181). U adenokarcinomu prostate zamijećena je smanjena ekspresija Cx32 i Cx43 u usporedbi s benignim

stanicama prostate uz postupni gubitak Cx32 i Cx43 u uznapredovalom karcinomu (182). Zasad ne postoje istraživanja prognostičke vrijednosti Cx43 u adenokarcinomu prostate.

## **2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Hipoteza ovog istraživanja jest da su EpCAM i connexin 43 izraženi u adenokarcinomu prostate te da je pojačana izraženost EpCAM-a povezana s lošijom prognozom za oboljele od adenokarcinoma prostate, a pojačana izraženost connexina 43 s boljom prognozom za oboljele.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na temelju postavljene hipoteze ciljevi ovog istraživanja jesu:

1. Imunohistokemijski odrediti izraženost EpCAM-a i connexina 43 u adenokarcinomu i benignom tkivu prostate.
2. Usporediti imunohistokemijsku izraženost EpCAM-a i connexina 43 u adenokarcinomu prostate s priznatim prognostičkim čimbenicima (preoperativni PSA, Gleasonov zbroj, TNM i vrijeme biokemijskog relapsa).
3. Odrediti postoji li povezanost između izraženosti EpCAM-a i connexina 43 u adenokarcinomu prostate.
4. Odrediti koji od dva ispitivana biljega ima veću prognostičku vrijednost u adenokarcinomu prostate.

## 4. BOLESNICI I METODE ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Bolesnici

U retrospektivnom istraživanju upotrijebljen je arhivski materijal o 102 bolesnika kojima je učinjena radikalna prostatektomija zbog klinički lokaliziranog karcinoma prostate na Klinici za urologiju Kliničkoga bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ između 1. siječnja 2002. i 31. prosinca 2004. godine. U istraživanje su uključeni samo oni bolesnici koji zadovoljavaju sljedeće uvjete:

1. da o bolesniku postoje svi klinički podaci i adekvatni patohistološki nalaz
2. da su bolesnici kod kojih se nije pojavio biokemijski relaps bolesti praćeni najmanje 60 mjeseci
3. da bolesnik preoperativno nije dobivao dodatnu hormonsku terapiju i/ili radioterapiju
4. da uz karcinom prostate bolesnik nema još neki maligni visceralni tumor.

Klinički podaci o bolesnicima dobiveni su iz osobnih kartona bolesnika na Klinici za urologiju, a podaci o patohistološkom nalazu iz kompjutorizirane baze podataka „Thanatos“ Kliničkoga zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“. Identitet bolesnika uključenih u istraživanje zaštićen je tako da se kao identifikacijski parametar rabio broj protokola biopsije.

U trenutku operativnog zahvata bolesnici su bili u dobi između 52 i 74 godine (medijan 65, interkvartilni raspon 61,0-68,0). Nakon operativnog zahvata bolesnici su praćeni najmanje 60 mjeseci, tijekom kojih su dolazili na pregled i određivao im se serumski PSA. Na pregled su dolazili svaka tri mjeseca tijekom prve godine nakon operativnog zahvata, potom dva puta godišnje tijekom druge godine te konačno jednom na godinu. Ako je serumska vrijednost PSA u dva uzastopna mjerenja pokazala porast od 0,2 ng/ml ili više, smatralo se da je nastupio biokemijski povrat bolesti te se taj bolesnik više nije pratio u istraživanju.

Vrijeme praćenja do povrata bolesti bilo je od 6 do 84 mjeseca (medijan 63, interkvartilni raspon 49,5-70,0). Tridesetorica bolesnika (29,4%) imala su biokemijski povrat bolesti najranije 6 mjeseci nakon operacije, a najkasnije

nakon 63 mjeseca (medijan 18,5, interkvartilni raspon 9,0-31,0). Vrijeme praćenja 72 bolesnika bez biokemijskog relapsa bilo je od 60 do 84 mjeseca (medijan 67, interkvartilni raspon 62,0-70,0).

Preoperativna serumska vrijednost PSA bila je od 3,2 do 38,4 ng/ml (medijan 8,5, interkvartilni raspon 6,5-11,8). Vrijednost PSA biokemijskog povrata bolesti bila je od 0,3 do 3,2 ng/ml (medijan 0,9, interkvartilni raspon 0,6-1,7).

Klinički stadij bolesnika određen je u skladu s kriterijima koje je odredilo Međunarodno udruženje za borbu protiv raka (International Union against Cancer) (187).

Konačni patohistološki nalaz nakon radikalne prostatektomije pokazao je da je 27 bolesnika od njih 102 (26,5%) imalo izvanprostatično širenje bolesti (stadij T3) i to: kod 15 bolesnika (55,6%) tumor je probio kapsulu prostate, kod petorice bolesnika (18,5%) tumor je infiltrirao u sjemene mjehuriće, a kod sedmorice bolesnika (25,9%) uz proboj kapsule prostate tumor je zahvatio i sjemene mjehuriće. Samo trojica bolesnika (2,9%) imala su metastaze u limfnim čvorovima. Dvadeset dvojica bolesnika (21,6%) imala su pozitivne kirurške rubove. Petnaestorica bolesnika (14,7%) primila su postoperativno adjuvantnu hormonsku terapiju. Od njih 15 trinaestorica su bila u stadiju bolesti T3 s visokim Gleasonovim zbrojem [7(4+3) ili više], dok su dvojica bila u stadiju bolesti T2 s visokim Gleasonovim zbrojem [7(4+3) ili više] i s pozitivnim kirurškim rubovima.

Raspodjelu Gleasonova zbroja s Gleasonovim uzorcima prikazuje tablica 5.

Tablica 5. Raspodjela Gleasonova zbroja s Gleasonovim uzorcima kod 102 bolesnika s adenokarcinomom prostate

Gleasonov zbroj	Preoperativni (%)	Postoperativni (%)
6 (3+3)	57 (55,8)	34 (33,3)
6 (4+2)	1 (1)	0 (0)
7 (3+4)	22 (21,6)	41 (40,2)
7 (4+3)	22 (21,6)	25 (24,5)
8 (3+5)	0 (0)	1 (1)
8 (5+3)	0 (0)	1 (1)
Ukupno	102 (100)	102 (100)

## 4.2. Metode

Iz arhive Kliničkoga zavoda za patologiju „Ljudevit Jurak“ izdvojena je po jedna parafinska kocka od svakog bolesnika koji zadovoljava prethodno navedene kriterije.

Uzorci prostate s adenokarcinomom za imunohistokemijsku analizu na EpCAM i Cx43 odabrani su tako da uz adenokarcinom sadržavaju i tkivo prostate koje nije zahvaćeno tumorom, a koje se također analiziralo na prisutnost navedenih biljega.

Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10%-tnom puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 5 µm, deparafiniziranje i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozin (HE).

U istraživanju je upotrijebljeno primarno protutijelo na EpCAM (ab32392, razrjeđenje 1:600, ABCAM, USA) i primarno protutijelo na Cx43 (sc-59949, razrjeđenje 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA).

Imunohistokemijska analiza izraženosti EpCAM-a i Cx43 obavljena je metodom LSAB kao vizualizacijskim sustavom na DAKO TechMate TM (DAKO, Danska) automatiziranom stroju za imunohistokemijsko bojenje uz upotrebu streptavidin imunoperoksidaza protokola MSIP.

Kao pozitivna kontrola za EpCAM upotrijebljeno je tkivo adenokarcinoma želuca, a za Cx43 tkivo debelog crijeva. U negativnoj kontroli je za oba istraživana biljega primarno protutijelo zamijenjeno izotipskim imunoglobulinom.

Rezultati imunohistokemijske analize za navedene biljege prikazani su semikvantitativno određivanjem postotka imunoreaktivnih stanica u tumoru i benignom tkivu prostate. Postotak imunoreaktivnih stanica određen je na cijeloj površini tumora i benignog tkiva prostate u odabranom prerezu.



### 4.3. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički. Napravljena je deskriptivna statistika i analiza normaliteta distribucije Smirnov-Kolmogorovljevim testom. Prema rezultatima u daljnjoj analizi primijenjeni su adekvatni parametrijski ili neparametrijski testovi. U analizi razlika kvantitativnih vrijednosti između dviju skupina upotrijebljen je neparametrijski Mann-Whitneyev U test. Pri međusobnoj usporedbi triju skupina upotrijebljen je neparametrijski Kruskall-Wallisov test. Razlike u učestalosti kvalitativnih varijabli analizirane su hi-kvadrat testom. Izračunavali su se Spearmanovi koeficijenti korelacije međuodnosa pojedinih kvantitativnih varijabli. Napravljena je Coxova regresijska analiza (Cox proportional hazards regression analysis) kako bi se ustanovila prediktivna vrijednost ekspresije EpCAM-a i connexina 43 na preživljenje (odsutnost bolesti). Sve P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su važnima. Pri analizi je primijenjen statistički softver MedCalc for Windows version 11.3.1. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

## 5. REZULTATI

EpCAM je u ovom istraživanju bio različito izražen u svim uzorcima adenokarcinoma prostate i u većini slučajeva (61,8%) izraženost je pronađena u više od 35% žlijezda. U 23 uzorka benignog tkiva (22,5%) izraženost EpCAM-a nije uočena, dok se u samo jednom uzorku benignog tkiva (1%) pokazala izraženost EpCAM-a u više od 35% žlijezda.

Rezultati izraženosti EpCAM-a u tumorskom i benignom tkivu sumirani su u tablici 6.

Tablica 6. Izraženost EpCAM-a kod 102 bolesnika s adenokarcinomom prostate

Izraženost EpCAM-a (%)	Tumor	Benigno tkivo
0	0	23 (22,5%)
5	0	21 (20,6%)
10	2 (2%)	15 (14,7%)
15	1 (1%)	16 (15,7%)
20	9 (8,8%)	16 (15,7%)
25	4 (3,9%)	4 (3,9%)
30	20 (19,7%)	6 (5,9%)
35	3 (2,9%)	0
40	13 (12,7%)	1 (1%)
45	3 (2,9%)	0
50	6 (5,9%)	0
60	4 (13,7%)	0
70	11 (10,8%)	0
80	9 (8,8%)	0
90	7 (6,9%)	0
100	0	0
Ukupno	102 (100%)	102 (100%)

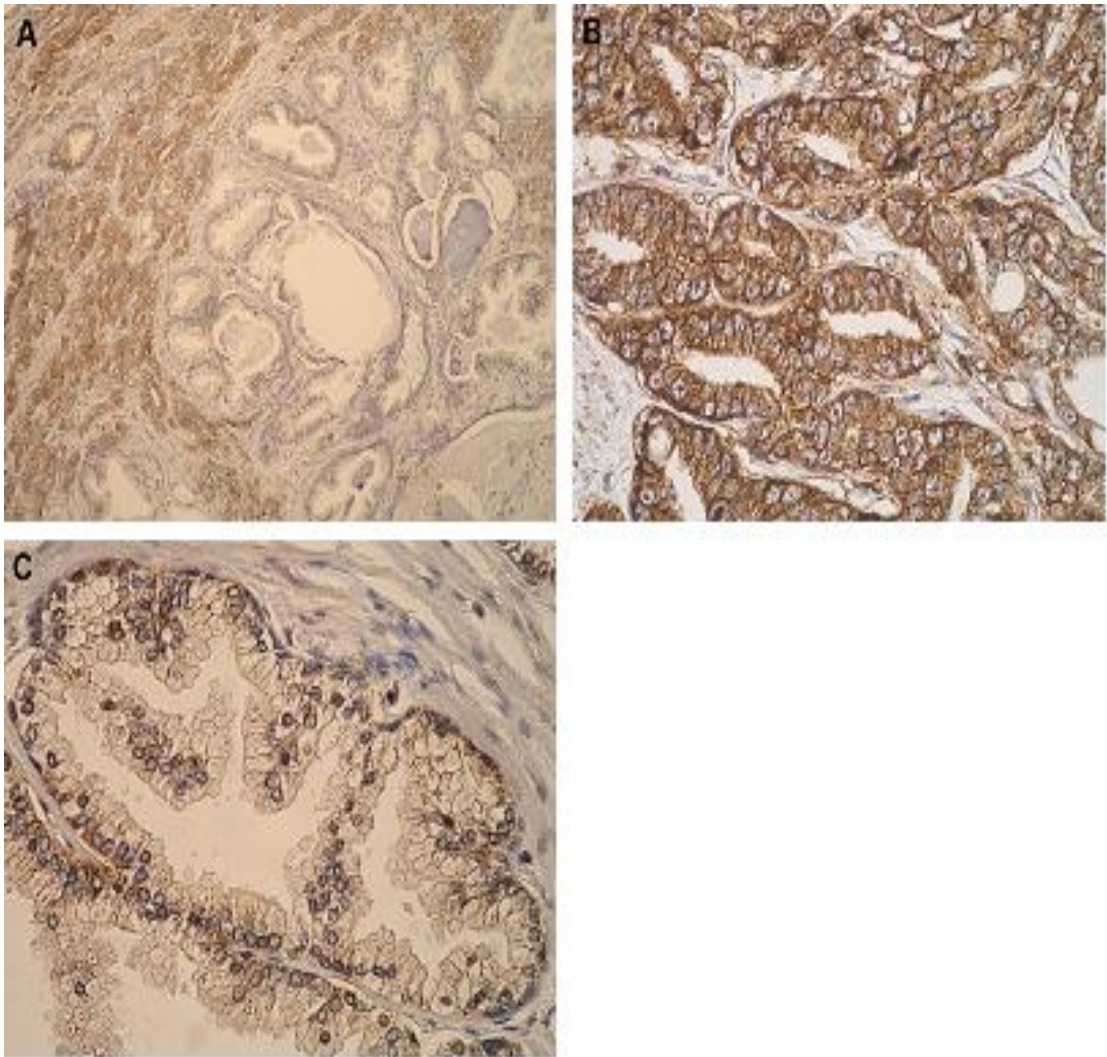
Izraženost Cx43 bila je u različitoj mjeri prisutna u svim analiziranim uzorcima tumorskog i benignog tkiva. U više od 50% analiziranih uzoraka benignog tkiva izraženost Cx43 bila je u 85% i više žlijezda, dok je sličnu izraženost imalo manje od 10% tumora. U jednom uzroku benignog tkiva (1%) i 40 uzoraka tumorskog tkiva (39,2%) Cx43 bio je izražen u manje od 60% žlijezda.

Rezultati izraženosti Cx43 u tumorskom i benignom tkivu sumirani su u tablici 7.

Tablica 7. Izraženost connexina 43 kod 102 bolesnika s adenokarcinomom prostate

Izraženost connexina 43 (%)	Tumor	Benigno tkivo
5	1 (1%)	0
10	3 (2,9%)	0
15	1 (1%)	0
20	12 (11,8%)	0
30	11 (10,8%)	0
40	7 (6,9%)	1 (1%)
50	5 (4,9%)	0
60	14 (13,7%)	9 (8,8%)
65	1 (1%)	0
70	21 (20,5%)	12 (11,8%)
80	17 (16,7%)	27 (26,4%)
85	0	5 (4,9%)
90	8 (7,8%)	26 (25,5%)
100	1 (1%)	22 (21,6%)
Ukupno	102 (100%)	102 (100%)

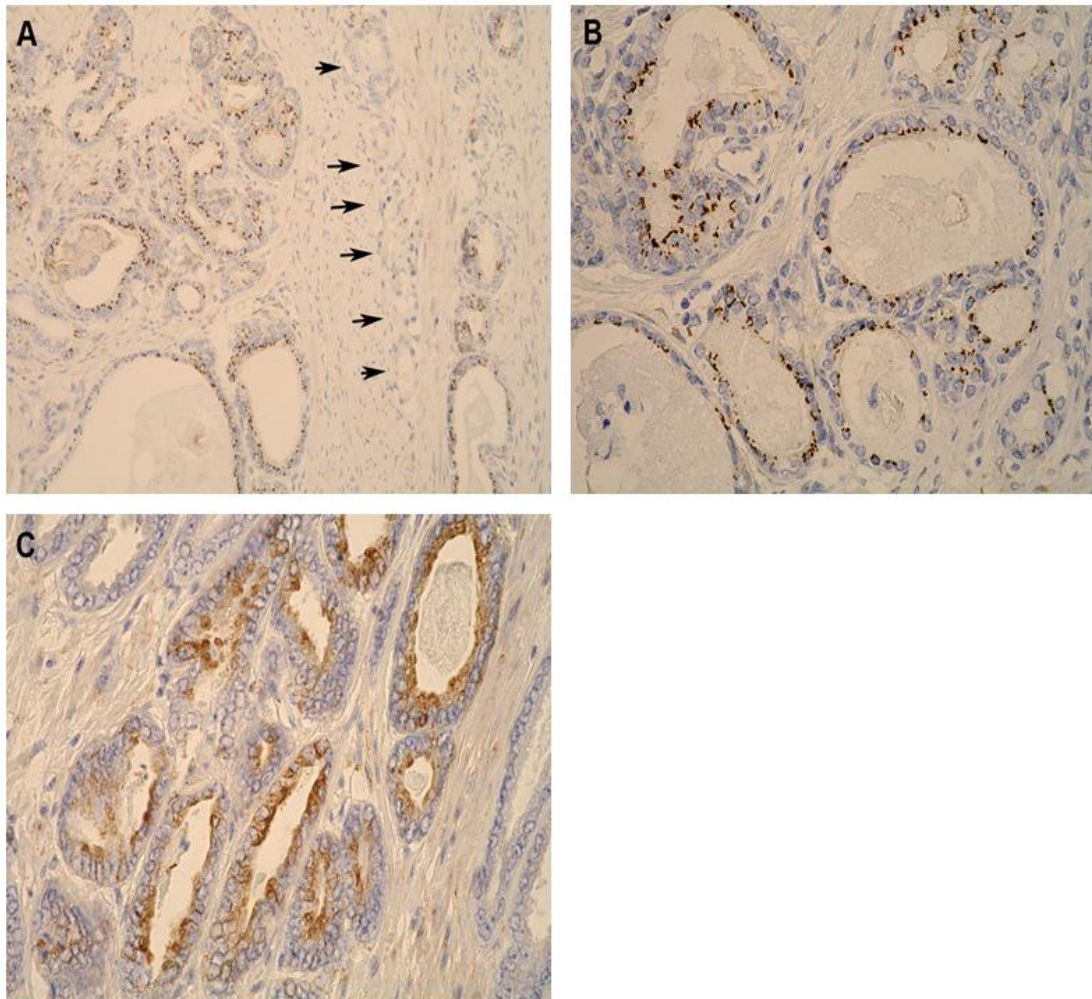
Imunohistokemijska reakcija na EpCAM u tkivu karcinoma bila je smještena na membrani i u citoplazmi, gdje je imala zrnata obilježja. U benignom tkivu pozitivna reakcija bila je ograničena na bazolateralnu membranu sekretornih stanica (slika 1 A-C). Pozitivitet na EpCAM nije nađen u stromalnim stanicama prostate ni u jednom od istraživanih uzoraka.



Slika 1. Imunohistokemijska izraženost EpCAM-a u benignim i malignim žlijezdama prostate

(A) EpCAM je češće izražen u malignim nego u benignim žlijezdama (x100), (B) U malignim žlijezdama EpCAM je bio izražen u citoplazmi (x400), (C) Reakcija u pozitivnim, benignim žlijezdama razlikovala se od one u malignim i bila je ograničena na bazolateralnu membranu sekretornih stanica (x400).

Imunohistokemijska reakcija na Cx43 bila je smještena u citoplazmi benignih i malignih epitelnih stanica. U benignim stanicama reakcija je bila grudičasta, paranuklearna, apikalno orijentirana i nije dosegala luminalnu stranu stanične membrane. U malignim stanicama reakcija je bila sitno zrnata, difuzno raspoređena i u većini malignih stanica dosegala je luminalnu stranu stanične membrane (slika 2 A-C). Pozitivitet na Cx43 nije nađen u stromi prostate ni u jednom od istraživanih uzoraka.



Slika 2. Imunohistokemijska izraženost connexina 43 u benignim i malignim žlijezdama prostate

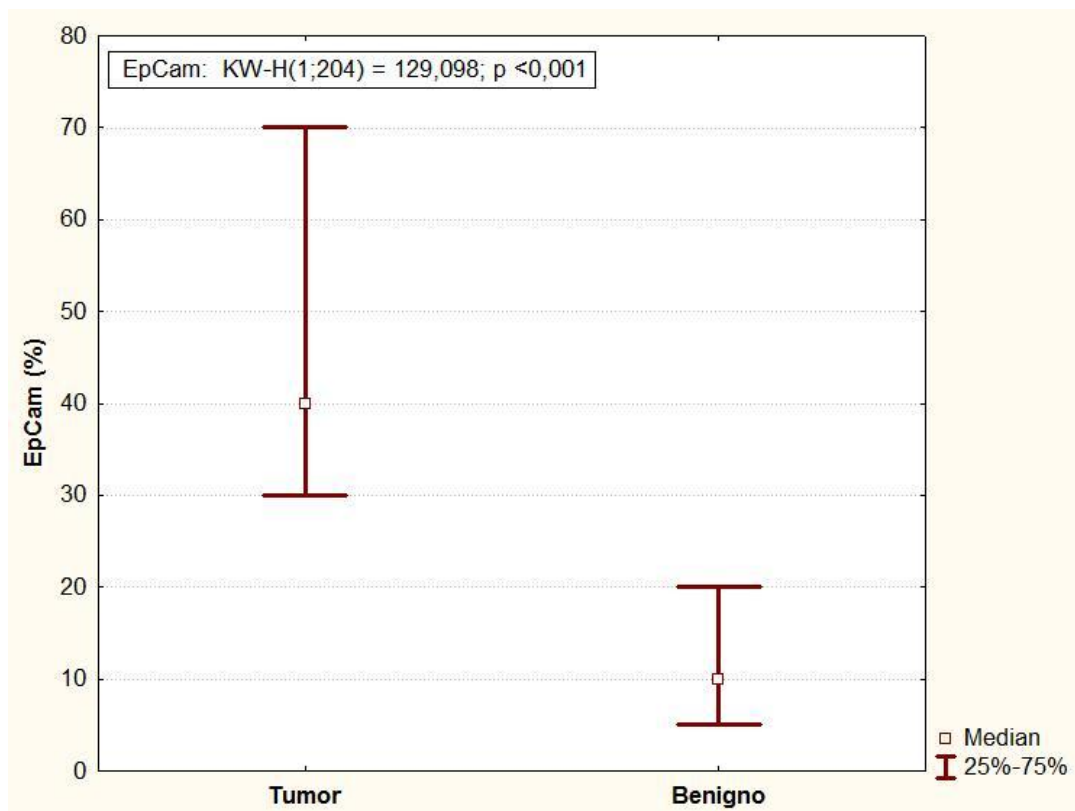
(A) Connexin 43 bio je izražen u benignim žlijezdama, dok maligne stanice nisu pokazale reakciju (strelice) (x200), (B) U benignim stanicama reakcija je bila citoplazmatska, grudičasta, paranuklearna, apikalno orijentirana i nije dosegala luminalnu stranu stanične membrane (x400), (C) U malignim stanicama reakcija je bila također smještena u citoplazmi, sitno zrnata, difuzno raspoređena i u većini malignih stanica dosegala je luminalnu stranu stanične membrane (x400).

Kako bi se utvrdilo postoji li statistički znatna razlika u izraženosti EpCAM-a i Cx43 između tumorskog i benignog tkiva, upotrijebljen je Mann-Whitneyev U neparametrijski test zbog raspodjele koja ne slijedi normalnu distribuciju.

Izraženost EpCAM-a u adenokarcinomu prostate bila je od 10 do 90% (medijan 40%, interkvartilni raspon 30-70). U benignom tkivu izraženost EpCAM-a bila je od 0 do 40% (medijan 10%, interkvartilni raspon 5-20). U ovom istraživanju izraženost EpCAM-a bila je statistički znatno viša u tumorskom nego u benignom tkivu prostate (Mann-Whitneyev U test,  $p < 0,001$ ) (tablica 8) (slika 3).

Tablica 8. Raspodjela izraženosti EpCAM-a između tumorskog i benignog tkiva

Biljeg	Tip	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
EpCAM	Tumor	102	10,0%	90,0%	30,0%	40,0%	70,0%	<0,001
	Benigno	102	0,0%	40,0%	5,0%	10,0%	20,0%	



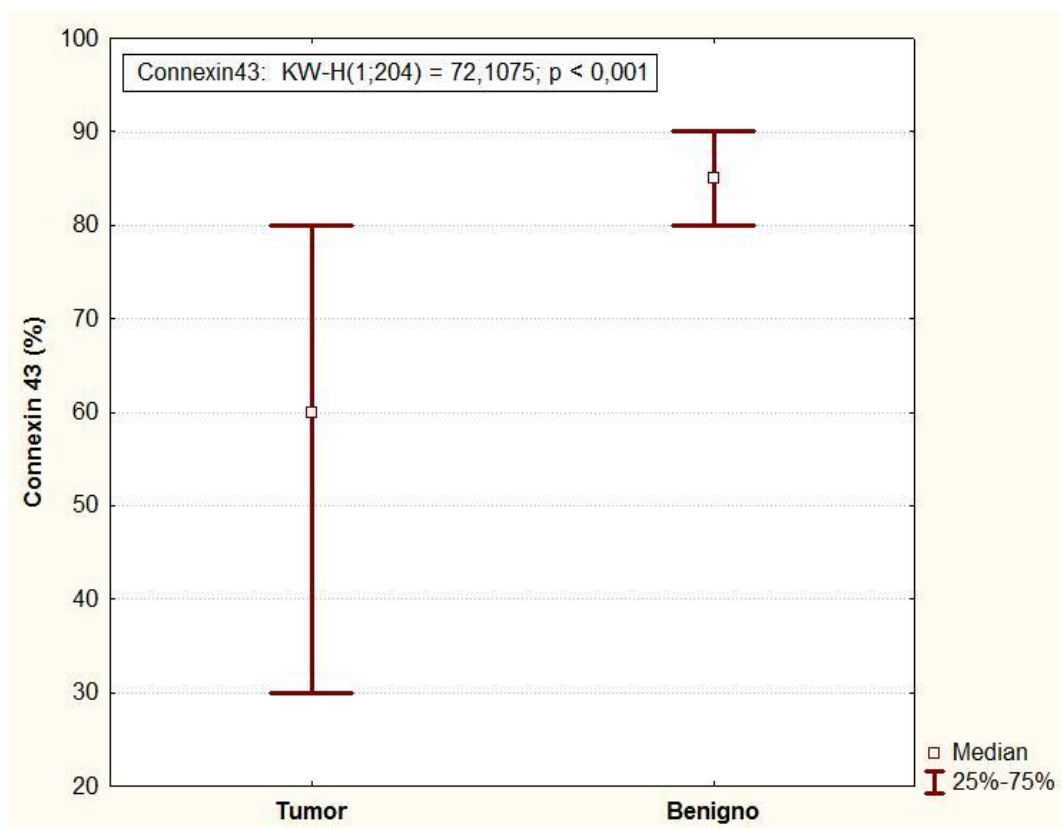
Slika 3. Raspon 25-75. percentile vrijednosti izraženosti EpCAM-a u tumorskom i benignom tkivu

Izraženost Cx43 u karcinomu prostate bila je od 5 do 100% (medijan 60%, interkvartilni raspon 30-80). U benignom tkivu izraženost je bila od 40 do 100% (medijan 85%, interkvartilni raspon 80-90). U ovom istraživanju izraženost Cx43 bila je veća u benignom tkivu nego u tkivu prostate zahvaćenom karcinomom (Mann-Whitneyev U test,  $p < 0,001$ ) (tablica 9) (slika 4).

Tablica 9. Raspodjela izraženosti Cx43 između tumorskog i benignog tkiva

Biljeg	Tip	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
Cx43	Tumor	102	5,0%	100,0%	30,0%	60,0%	80,0%	<0,001
	Benigno	102	40,0%	100,0%	80,0%	85,0%	90,0%	





Slika 4. Raspon 25-75 percentile vrijednosti izraženosti connexina 43 u tumorskom i benignom tkivu

Povezanost EpCAM-a s dobi, vremenom praćenja, PSA, relapsom PSA, BCR-om i vremenom BCR-a, preoperativnim i postoperativnim Gleasonovim zbrojem prikazani su Spearmanovim korelacijskim koeficijentom jer su sve varijable kvantitativne.

Rezultati Spearmanova koeficijenta korelacije za odabrane parametre u odnosu na izraženost EpCAM-a u tumorskom tkivu prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Prikaz Spearmanova koeficijenta korelacije za odabrane parametre u odnosu na izraženost EpCAM-a u tumorskom tkivu

Spearmanova korelacija		EpCAM (tumor)
<b>Dob (godine)</b>	Koeficijent korelacije	-0,103
	P	0,303
	N	102
<b>PSA</b>	Koeficijent korelacije	0,175
	P	0,078
	N	102
<b>Vrijeme praćenja (mjeseci)</b>	Koeficijent korelacije	-0,556
	P	<0,001
	N	102
<b>relaps PSA</b>	Koeficijent korelacije	0,283
	P	0,129
	N	30
<b>Vrijeme BCR-a</b>	Koeficijent korelacije	0,136
	P	0,474
	N	30
<b>Connexin 43-tumor</b>	Koeficijent korelacije	-0,181
	P	0,069
	N	102
<b>Preoperativni Gleasonov zbroj</b>	Koeficijent korelacije	0,256
	P	0,009
	N	102
<b>Postoperativni Gleasonov zbroj</b>	Koeficijent korelacije	0,279
	P	0,004
	N	102

Izraženost EpCAM-a između preostalih kategorijskih varijabli (stadij bolesti T i N, zahvaćenost sjemenih mjehurića i proboj kapsule te pozitivni rubovi) prikazana je Mann-Whitneyevim U testom (razlike između dvije kategorije) ili Kruskal-Wallisovim testom (razlike između tri ili više kategorija) (tablice 11-15).

Tablica 11. Raspodjela izraženosti EpCAM-a u odnosu na preživljenje i biokemijski relaps (BCR)

Biljeg	Ishod	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
EpCAM Tumor	Preživljenje	72	10,0%	90,0%	30,0%	35,0%	60,0%	<0,001
	BCR	30	10,0%	90,0%	50,0%	70,0%	80,0%	

Tablica 12. Raspodjela izraženosti EpCAM-a u stadiju bolesti T2 i T3

Biljeg	T	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
EpCAM Tumor	2	75	10,0%	90,0%	30,0%	40,0%	60,0%	0,002
	3	27	10,0%	90,0%	40,0%	60,0%	80,0%	

Tablica 13. Raspodjela izraženosti EpCAM-a kod bolesnika s negativnim i pozitivnim limfnim čvorovima

Biljeg	N	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
EpCAM Tumor	0	99	10,0%	90,0%	30,0%	40,0%	70,0%	0,436
	1	3	40,0%	70,0%	40,0%	60,0%	70,0%	

Tablica 14. Raspodjela izraženosti EpCAM-a kod prodora kapsule (K), zahvaćenosti sjemenih mjehurića (M) te zahvaćenosti sjemenih mjehurića i prodora kapsule (MK)

Biljeg	M/K	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
EpCAM Tumor	K	14	10,0%	90,0%	37,5%	65,0%	90,0%	0,531
	M	5	40,0%	90,0%	50,0%	70,0%	85,0%	
	MK	7	40,0%	70,0%	40,0%	60,0%	70,0%	

Tablica 15. Raspodjela izraženosti EpCAM-a kod negativnih i pozitivnih rubova

Biljeg	Rubovi	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
EpCAM Tumor	Negativni	88	10,0%	90,0%	30,0%	40,0%	60,0%	0,069
	Pozitivni	22	10,0%	90,0%	37,5%	60,0%	72,5%	

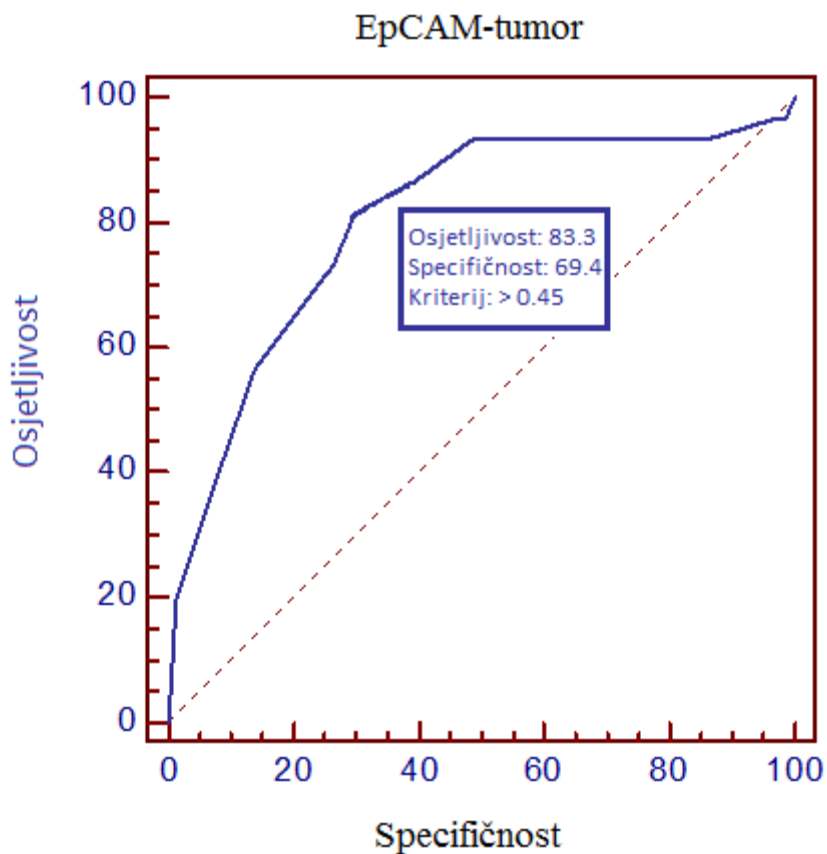
Izraženost EpCAM-a bila je statistički znatno negativno povezana s ukupnim vremenom praćenja (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije - 0,556,  $p < 0,001$ ), što upozorava na kraće vrijeme preživljenja bez povrata bolesti i raniju pojavu BCR-a kod bolesnika s većom izraženošću EpCAM-a. U usporedbi s bolesnicima kod kojih se nije pojavio BCR, izraženost EpCAM-a kod bolesnika s BCR-om bila je statistički osjetno veća ( $p < 0,001$ ). Preoperativni (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,256,  $p = 0,009$ ) i postoperativni (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,279,  $p = 0,004$ ) Gleasonovi zbrojevi pokazali su pozitivnu povezanost s izraženošću EpCAM-a u tumorskom tkivu i bolesnici s većom izraženošću EpCAM-a imali su veći preoperativni i postoperativni Gleasonov zbroj. Kod

tumora u stadiju bolesti T3 (Mann-Whitneyev U test,  $p=0,002$ ) zamijećena je znatno veća izraženost EpCAM-a u usporedbi s tumorima u stadiju T2.

Nije pronađena veća povezanost izraženosti EpCAM-a u tumoru s dobi bolesnika (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije  $-0,103$ ,  $p=0,303$ ), preoperativnim PSA (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije  $0,175$ ,  $p=0,078$ ) i vrijednošću relapsa PSA (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije  $0,283$ ,  $p=0,129$ ).

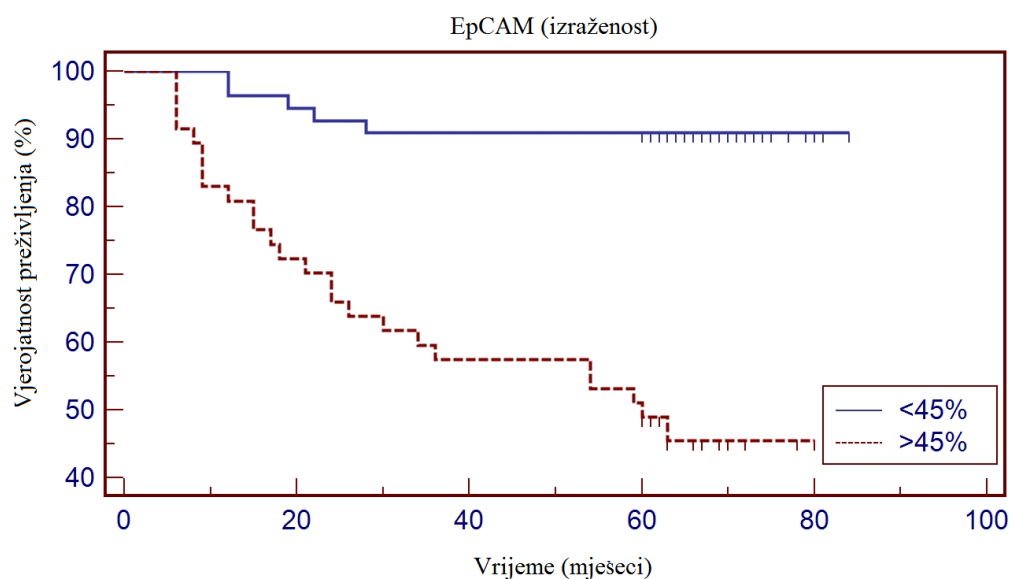
U grupi od 30 bolesnika s BCR-om nije pronađena znatna povezanost između izraženosti EpCAM-a i duljine preživljenja bez povrata bolesti (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije  $0,136$ ,  $p=0,474$ ). Usto, izraženost EpCAM-a nije bila povezana sa zahvaćenošću sjemenih mjehurića i/ili probojem kapsule u stadiju bolesti T3 (Kruskal-Wallisov test,  $p=0,531$ ), pozitivnim kirurškim rubovima (Mann-Whitneyev U test,  $p=0,069$ ) i metastazama u limfne čvorove (stadij bolesti N1) (Mann-Whitneyev U test,  $p=0,436$ ). Nije zamijećena razlika u izraženosti EpCAM-a kod tumora koji je probio kapsulu (stadij T3a) i tumora koji je zahvatio sjemene mjehuriće (T3b) ili onih s istodobnim probojem kapsule i invazijom u sjemene mjehuriće.

Kako bi se utvrdila povezanost između izraženosti EpCAM-a i duljine preživljenja bez BCR-a, provedena je ROC-analiza (receiver operator characteristics analysis). Prema rezultatima ROC-analize uzorci s izraženošću EpCAM-a od barem 45% u tumorom zahvaćenim žlijezdama smatrani su uzorcima s jakom izraženošću EpCAM-a (osjetljivost 83,3%, interval pouzdanosti (CI): 65,35%-94,4% i specifičnost 69,4%, interval pouzdanosti (CI): 57,5%-79,8%) (slika 5). Tri uzorka tumora (2,9%) pokazala su izraženost EpCAM-a od 45% (cut-off vrijednost), dok je kod 19 uzoraka tumora (18,6%) vrijednost bila bliska cut-off vrijednosti (40% u 13 slučajeva i 50% u 6 slučajeva).



Slika 5. ROC-analiza povezanosti izraženosti EpCAM-a u tumorskom tkivu s prognozom bolesti

Kaplan-Meierova analiza pokazala je da je vrijeme preživljenja bez biokemijskog relapsa dulje za bolesnike kod kojih je izraženost EpCAM-a bila manja od 45% nego za bolesnike kod kojih je izraženost EpCAM-a bila veća od 45% ( $p < 0,001$ ) (slika 6).



Slika 6. Kaplan-Meierova analiza utjecaja prekomjerne izraženosti EpCAM-a na duljinu preživljenja bez biokemijskog relapsa

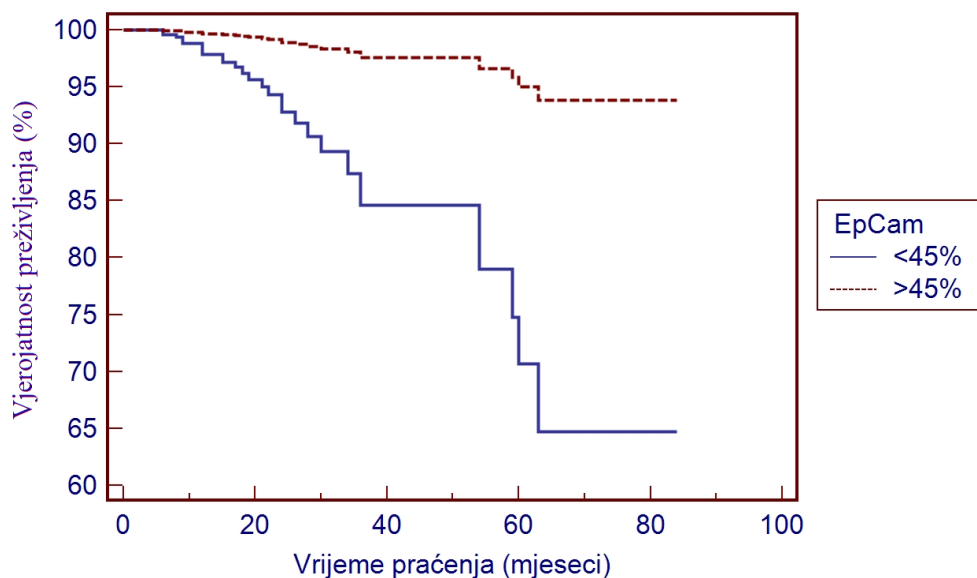
Prema rezultatima Kaplan-Meierove analize napravljena je Coxova regresijska analiza koja je uključivala dob bolesnika, preoperativni i postoperativni Gleasonov zbroj, preoperativni PSA, stadij bolesti T i N, proboj kapsule prostate tumorom, zahvaćenost sjemenih mjehurića i izraženost EpCAM-a.

Kao statistički važni čimbenici za duljinu preživljenja bez povrata bolesti u multivarijantnoj analizi pokazali su se preoperativni Gleasonov zbroj ( $p=0,025$ ), izraženost EpCAM-a veća od 45% ( $p<0,001$ ), viši, T stadij bolesti ( $p<0,001$ ) i preoperativni PSA ( $p=0,003$ ). Preostale istraživane varijable, kao što su dob ( $p=0,676$ ), postoperativni Gleasonov zbroj ( $p=0,465$ ), status limfnih čvorova (N) ( $p=0,707$ ) i pozitivni kirurški rubovi ( $p=0,060$ ), nisu pokazale statistički veći utjecaj na duljinu preživljenja bez povrata bolesti (tablica 16) (slika 7).

Tablica 16. Coxova regresijska analiza utjecaja pojedinih ispitivanih varijabli na duljinu preživljenja bez biokemijskog relapsa (postavljeni model važan je na razini  $p < 0,000$ )

Ispitivane varijable	b	SE	P	OR	95% CI of OR
<b>Dob</b>	-0,02023	0,04852	0,676	0,98	0,8915 - 1,0772
<b>Connexin 43 &lt;30%</b>	1,1973	0,4910	0,014	3,31	1,2711 - 8,6261
<b>EpCAM &gt;45%</b>	1,9167	0,5389	<0,001	6,79	2,3768 - 19,4452
<b>Preoperativni Gleasonov zbroj</b>	1,1340	0,5053	0,025	3,10	1,1603 - 8,3259
<b>Postoperativni Gleasonov zbroj</b>	0,4512	0,6181	0,465	1,57	0,4705 - 5,2408
<b>Pozitivni rubovi</b>	0,9404	0,5014	0,060	2,56	0,9633 - 6,8089
<b>PSA</b>	0,08604	0,02899	0,003	1,08	1,0299 - 1,1532
<b>T</b>	2,2079	0,4958	<0,001	9,09	3,4596 - 23,9173
<b>N</b>	0,3020	0,8034	0,7070	1,35	0,2823 - 6,4795





Slika 7. Coxova regresijska analiza utjecaja izraženosti EpCAM-a na duljinu preživljenja bez biokemijskog relapsa

Povezanost Cx43 s dobi, vremenom praćenja, PSA, relapsom PSA i vremenom BCR-a, preoperativnim i postoperativnim Gleasonovim zbrojem prikazani su Spearmanovim korelacijskim koeficijentom jer su sve varijable kvantitativne.

Rezultati Spearmanova koeficijenta korelacije za odabrane parametre u odnosu na izraženost Cx43 u tumorskom tkivu prikazani su u tablici 17.

Tablica 17. Prikaz Spearmanova koeficijenta korelacije za odabrane parametre u odnosu na izraženost connexina 43 u tumorskom tkivu

<b>Spearmanova korelacija</b>		<b>Cx43 (tumor)</b>
<b>Dob (godine)</b>	Koeficijent korelacije	0,058
	P	0,563
	N	102
<b>PSA</b>	Koeficijent korelacije	-0,266
	P	0,007
	N	102
<b>Vrijeme praćenja (mjeseci)</b>	Koeficijent korelacije	0,432
	P	<0,001
	N	102
<b>relaps PSA</b>	Koeficijent korelacije	0,329
	P	0,076
	N	30
<b>Vrijeme BCR-a</b>	Koeficijent korelacije	-0,156
	P	0,411
	N	30
<b>Preoperativni Gleasonov zbroj</b>	Koeficijent korelacije	-0,161
	P	0,105
	N	102
<b>Postoperativni Gleasonov zbroj</b>	Koeficijent korelacije	-0,176
	P	0,077
	N	102

Izraženost Cx43 između preostalih kategorijskih varijabli (stadij bolesti T i N, invazija u sjemene mjehuriće, proboj kapsule te pozitivni rubovi) prikazana je Mann-Whitneyevim U testom (razlike između dvije kategorije) ili Kruskal-Wallisovim testom (razlike između tri ili više kategorija) (tablice 18-22).

Tablica 18. Raspodjela izraženosti connexina 43 u odnosu na preživljenje i biokemijski relaps (BCR)

Biljeg	Ishod	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
Cx43 tumor	Preživljenje	72	10,0%	100,0%	52,5%	70,0%	80,0%	<0,001
	BCR	30	5,0%	90,0%	20,0%	30,0%	60,0%	

Tablica 19. Raspodjela izraženosti connexina 43 u stadiju bolesti T2 i T3

Biljeg	T	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
Cx43 tumor	2	75	10,0%	100,0%	40,0%	70,0%	80,0%	0,021
	3	27	5,0%	90,0%	20,0%	50,0%	70,0%	

Tablica 20. Raspodjela izraženosti connexina 43 kod bolesnika s negativnim i pozitivnim limfnim čvorovima

Biljeg	N	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
Cx43 tumor	0	99	5,0%	100,0%	30,0%	60,0%	80,0%	0,999
	1	3	30,0%	70,0%	30,0%	70,0%	70,0%	

Tablica 21. Raspodjela izraženosti connexina 43 kod prodora kapsule (K), zahvaćenosti sjemenih mjehurića (M) te zahvaćenosti sjemenih mjehurića i prodora kapsule (MK)

Biljeg	M/K	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
Cx43 Tumor	K	14	10,0%	80,0%	20,0%	40,0%	72,5%	0,200
	M	5	5,0%	60,0%	12,5%	30,0%	50,0%	
	MK	7	20,0%	90,0%	30,0%	70,0%	70,0%	

Tablica 22. Raspodjela izraženosti connexina 43 kod negativnih i pozitivnih rubova

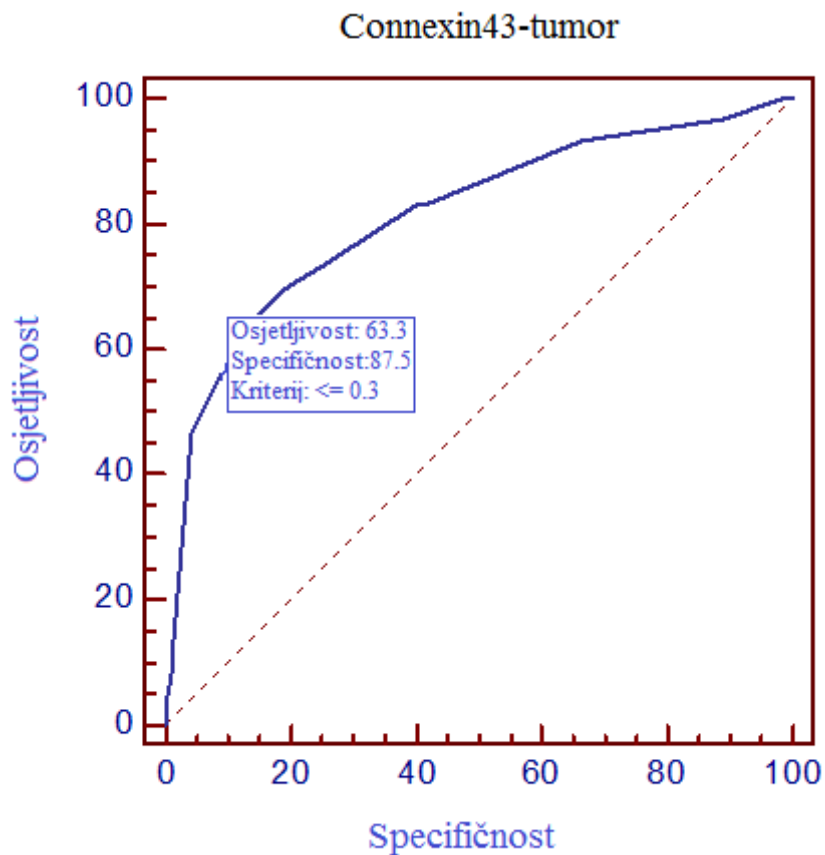
Biljeg	Rubovi	N	Minimum	Maksimum	Percentile			P
					25.	50. Medijan	75.	
Cx43 tumor	Negativni	88	10,0%	100,0%	40,0%	70,0%	80,0%	<0,001
	Pozitivni	22	5,0%	80,0%	20,0%	30,0%	62,5%	

Zamijećena je statistički znatna pozitivna povezanost povećane izraženosti Cx43 s vremenom praćenja (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,432,  $p < 0,001$ ), što upućuje na dulje preživljenja bez povrata bolesti i kasniju pojavu BCR-a kod tih bolesnika. Preoperativni PSA (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije -0,266,  $p < 0,007$ ) pokazao je negativnu povezanost s izraženošću Cx43, a bolesnici sa smanjenom izraženošću Cx43 imali su više preoperativne vrijednosti PSA. Tumori u stadiju bolesti T3 (Mann-Whitneyev U test,  $p = 0,021$ ) i oni s pozitivnim kirurškim rubovima (Mann-Whitneyev U test,  $p < 0,001$ ) pokazali su osjetno manju izraženost Cx43 u usporedbi s tumorima u stadiju T2 i tumorima bez pozitivnih kirurških rubova.

Nije pronađena statistički znatna povezanost izraženosti Cx43 u tumorima s dobi bolesnika (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,058,

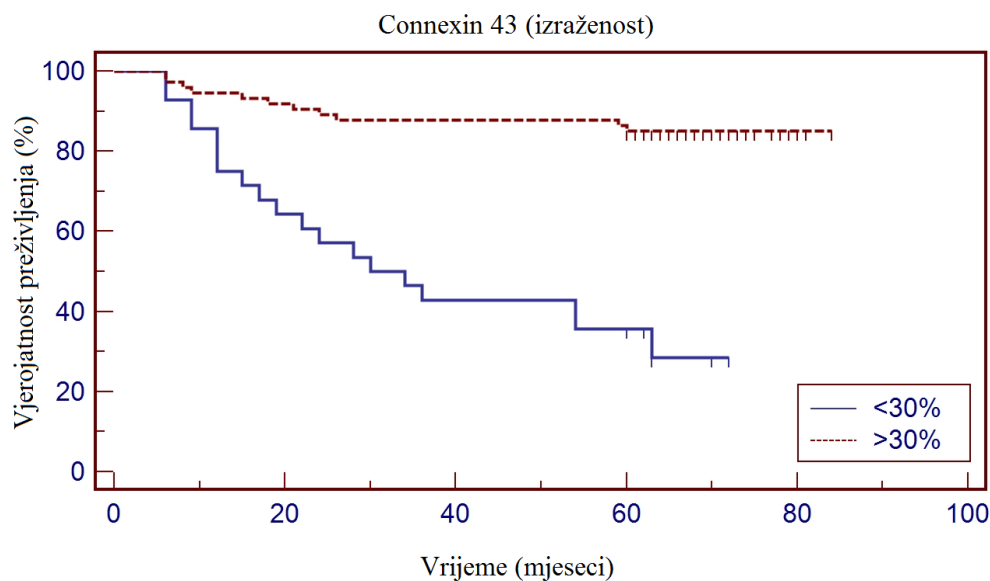
p=0,563), preoperativnim (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije -0,161, p=0,105) i postoperativnim (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije -0,176, p=0,077) Gleasonovim zbrojem, vremenom pojave BCR-a u bolesnika koji su dobili povrat bolesti (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije -0,156, p=0,411) i vrijednošću relapsa PSA (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,329, p=0,076). Izraženost Cx43 nije bila povezana sa zahvaćanjem sjemenih mjehurića u stadiju bolesti T3 (Kruskal-Wallisov test, p=0,200) i s metastazama u limfnim čvorovima u stadiju bolesti N1 (Mann-Whitneyev U test, p=0,999). Kod bolesnika kojima je tumor zahvatio sjemene mjehuriće nisu zamijećene veće razlike u izraženosti Cx43 u usporedbi s onima kod kojih je tumor probio kapsulu prostate.

Kako bi se utvrdila povezanost između izraženosti Cx43 i duljine preživljenja bez BCR-a, provedena je ROC-analiza (receiver operator characteristics analysis). Prema rezultatima ROC-analize uzorci s izraženošću Cx43 od barem 30% u tumorom zahvaćenim žlijezdama smatrani su uzorcima s jakom izraženošću Cx43 (osjetljivost 63%, interval pouzdanosti (CI): 43,0%-80,1% i specifičnost 87,5%, interval pouzdanosti (CI): 77,6%-94,1%) (slika 8). U jedanaest uzoraka tumora (10,8%) izraženost Cx43 bila je 30% (cut-off vrijednost), dok su u još 19 uzoraka tumora (18,6%) vrijednosti bile bliske cut-off vrijednosti (20% u 12 slučajeva i 40% u 7 slučajeva).



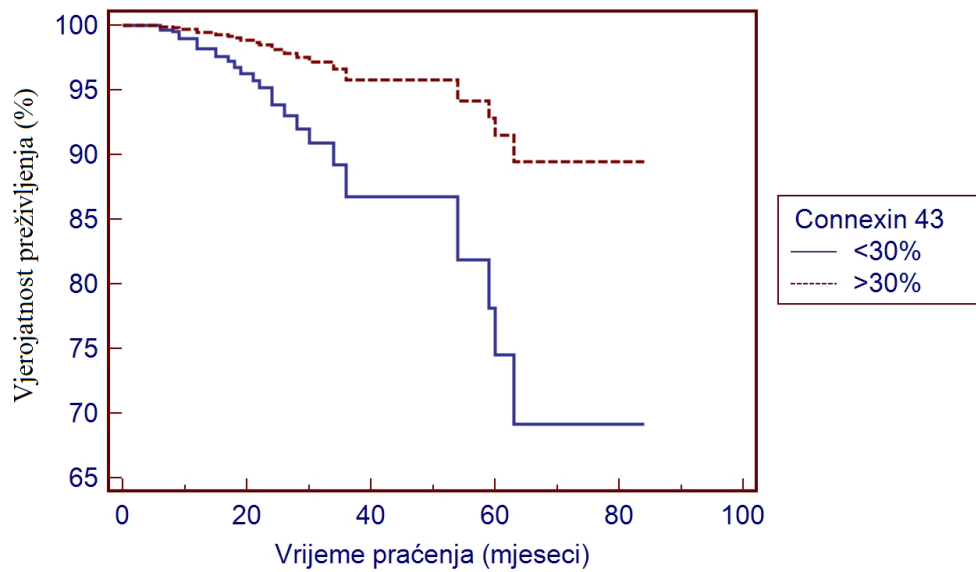
Slika 8. ROC-analiza povezanosti izraženosti connexina 43 u tumorskom tkivu s prognozom bolesti

Kaplan-Meierova analiza pokazala je da je vrijeme preživljenja bez BCR-a dulje za bolesnike kod kojih je izraženost Cx43 veća od 30% u usporedbi s onima kod kojih je izraženost Cx43 manja od 30% ( $p < 0,001$ ) (slika 9).



Slika 9. Kaplan-Meierova analiza utjecaja prekomjerne izraženosti connexina 43 na duljinu preživljenja bez biokemijskog relapsa

Prema rezultatima Kaplan-Meierove analize napravljena je Coxova regresijska analiza, a kao statistički važni čimbenici za duljinu preživljenja bez povrata bolesti u multivarijantnoj analizi pokazali su se preoperativni Gleasonov zbroj ( $p=0,025$ ), izraženost Cx43 manja od 30% ( $p=0,014$ ), viši, T stadij bolesti ( $p<0,001$ ) i preoperativni PSA ( $p=0,003$ ). Preostale istraživane varijable, kao što su dob ( $p=0,676$ ), postoperativni Gleasonov zbroj ( $p=0,465$ ), status limfnih čvorova (N) ( $p=0,707$ ) i pozitivni kirurški rubovi ( $p=0,060$ ), nisu pokazale statistički znatan utjecaj na duljinu preživljenja bez povrata bolesti (tablica 16) (slika 10).



Slika 10. Coxova regresijska analiza utjecaja izraženosti connexina 43 na duljinu preživljenja bez biokemijskog relapsa

U ovom istraživanju nije zamijećena veća povezanost između izraženosti EpCAM-a i Cx43 u karcinomu prostate (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije -0,181,  $p=0,069$ ).



## 6. RASPRAVA

Do sada je nekoliko istraživanja dokazalo konzistentnu i jaku izraženost EpCAM-a u karcinomu prostate te njegovu jaču izraženost u karcinomom zahvaćenom tkivu prostate u odnosu na benigno tkivo prostate (172, 176, 188, 189). Slični rezultati dobiveni su i u našem istraživanju, gdje se u većini uzoraka karcinoma prostate (61,8%) pokazala izraženost EpCAM-a u više od 35% žlijezda, dok se u samo jednom uzorku benignog tkiva (1%) pokazala izraženost EpCAM-a u više od 35% žlijezda.

U našem istraživanju imunohistokemijska reakcija na EpCAM u karcinomskom i pozitivnom benignom tkivu bila je ograničena na epitelne stanice te je imala iste morfološke karakteristike već opisane u istraživanju Poczateka i suradnika (176).

Za razliku od Mukherjeea i sur. (190) naše i prethodna istraživanja nisu našla stromalnu izraženost EpCAM-a. Mukherjee i sur. (190) analizirali su izraženost EpCAM-a u 20 uzoraka dobivenih nakon prostatektomije zbog lokaliziranog karcinoma prostate, a koji su uključivali 99 smrznutih uzoraka tkiva uklopljenih u optimalni medij za rezanje i 11 uzorka fiksiranih u etanolu i uklopljenih u parafin. Oni su primijetili konzistentno i ponovljivo obojenje na EpCAM u svih 20 uzoraka. Epitel je pokazivao membranozni i difuzni uzorak u normalnim i tumorskim stanicama bez razlike u intenzitetu obojenja. Stromalne stanice u benignom tkivu prostate nisu pokazale obojenje, dok je jako stromalno obojenje bilo prisutno u tumoru. Stromalno obojenje na EpCAM bilo je najizraženije u histološkim poljima koja su sadržavala žarišta visokog Gleasonova stupnja pa su autori pretpostavili da se razina EpCAM proteina u stromi tumora povećava s Gleasonovim stupnjem (190).

Moguće objašnjenje postojanja razlika u izraženosti EpCAM-a u istraživanjima Mukherjeea i drugim istraživanjima, uključujući i naše, možda je u različitoj obradi tkiva (172, 176, 188, 189). Oni su rabili smrznuta i u etanolu fiksirana tkiva, dok je u drugim istraživanjima za analizu upotrijebljeno tkivo koje je bilo fiksirano samo u formalinu. Nadalje, upotreba

različitih primarnih protutijela na EpCAM i/ili različita razrjeđenja protutijela mogla su pridonijeti različitoj izraženosti EpCAM-a u njihovu i drugim istraživanjima.

U našem je istraživanju također proučavana prognostička vrijednost izraženosti EpCAM-a u karcinomu prostate. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je izraženost EpCAM-a povezana s različitim kliničkopatološkim karakteristikama tumora i duljinom preživljenja bez BCR-a. Bolesnici s višim preoperativnim i postoperativnim Gleasonovim zbrojem te kraćim vremenom praćenja imali su znatno veću izraženost EpCAM-a. Negativna korelacija vremena praćenja i izraženosti EpCAM-a upozoravala je na to da tumori kod bolesnika s BCR-om imaju veću izraženost EpCAM-a. Osim toga, zahvaćenost sjemenih mjehurića i proboj kapsule (stadij bolesti T3) bili su znatnije zastupljeni u tumorima s većom izraženošću EpCAM-a. Izraženost EpCAM-a u tumoru nije bila znatno povezana s pozitivnim kirurškim rubovima, ali je pokazala tendenciju postizanja granice važnosti ( $p=0,069$ ). Nije pronađena veća povezanost između izraženosti EpCAM-a i metastaza u limfnim čvorovima. Samo su trojica bolesnika u našoj istraživanoj skupini imala metastaze u limfnim čvorovima, što je nedostatan broj za pouzdanu statističku analizu.

Prisutnost veće izraženosti EpCAM-a u karcinomu prostate bila je povezana s karakteristikama koje su upućivale na agresivniji tumorski fenotip. Usto, velika izraženost EpCAM-a bila je povezana s kraćim vremenom preživljenja bez BCR-a u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi. U multivarijantnoj analizi nije pronađena korelacija između BCR-a i postoperativnog Gleasonova zbroja, pozitivnih kirurških rubova i metastaza u limfne čvorove. No pozitivni kirurški rubovi su gotovo dosegli granicu značajnosti ( $p=0,060$ ) i vjerojatno bi je dosegli da je ispitivana veća skupina. Kao što je spomenuto, samo su trojica bolesnika imala metastaze u limfnim čvorovima, što je nedostatan broj za pouzdanu statističku analizu. U slučaju postoperativnog Gleasonova zbroja, moguće objašnjenje je u adjuvantnoj terapiji, koja je primijenjena kod 15 bolesnika s visokim Gleasonovim zbrojem.

Slična prognostička važnost EpCAM-a objavljena je za različite karcinome (175, 191), ali ne i za karcinom prostate (176, 188, 189). Spizzo i sur. (175)

proučavali su izraženost EpCAM-a u uzorcima 199 bolesnika oboljelih od epitelnog karcinoma jajnika i pokazali da je njegova jača izraženost osjetno povezana sa smanjenjem ukupnog preživljenja u proučavanoj skupini. Njihova retrospektivna analiza pokazala je snažnu prognostičku važnost izraženosti EpCAM-a u epitelnom karcinomu jajnika (175).

Varga i sur. (191) proučavali su izraženost EpCAM-a u uzorcima 99 bolesnika operiranih zbog karcinoma žučnog mjehura i pronašli jaku izraženost EpCAM-a u 63,6% uzoraka karcinoma, dok je univarijantna i multivarijantna analiza pokazala snažnu prognostičku važnost EpCAM-a u karcinomu žučnog mjehura.

Prvo istraživanje o prognostičkoj važnosti izraženosti EpCAM-a u karcinomu prostate objavljeno je 1999. u radu Poczatek i sur. (176). Njihovo istraživanje obuhvatilo je 76 bolesnika s klinički lokaliziranim karcinomom prostate koji su podvrgnuti radikalnoj prostatektomiji. Svi bolesnici kvalificirani su kao patološki stadij pT2, 38 bolesnika kod kojih nije bilo progresije bolesti klasificirano je kao „kontrola“, a 38 bolesnika kod kojih su zamijećeni porast PSA ili progresija bolesti kao „slučajevi“. Oni nisu pronašli veću korelaciju između izraženosti EpCAM-a u karcinomu prostate i Gleasonova zbroja. Usto, nije bilo veće razlike u izraženosti EpCAM-a u uzorcima tumora bolesnika kod kojih se razvila progresija bolesti nakon radikalne prostatektomije u usporedbi s onima kod kojih nije bilo progresije nakon radikalnog operativnog zahvata (176).

U novijem istraživanju Zellweger i sur. (189) analizirali su izraženost EpCAM-a u 181 uzorku klinički lokaliziranog karcinoma prostate dobivenom transuretralnom resekcijom prostate (n=95) i uzorcima dobivenima radikalnom prostatektomijom (n=86), potom u uzorcima 120 transuretralnih resekcija zbog hormon-refraktornog lokalnog povrata bolesti i 91 uzorku metastaze karcinoma prostate dobivenom od obduciranih bolesnika liječenih androgenom blokadom i umrlih u terminalnoj fazi metastatske bolesti. Upotrijebili su tehniku tkivne postrojbe (engl. „tissue microarray-TMA“) i biopsiju jednog cilindra tkiva (promjera 0,6 mm) uzetog iz najmanje diferenciranog područja tumora koji je imunohistokemijski analiziran. Od 392 uzorka karcinoma prostate 342 uzorka (87,5%) interpretirana su na

prerezima dobivenima tehnikom tkivne postrojbe. U njihovu istraživanju izraženost EpCAM-a bila je znatno povezana s visokim Gleasonovim zbrojem, ali nije opažena razlika u izraženosti EpCAM-a unutar različitih stadija progresije karcinoma prostate (189).

Went i sur. (188) koristili su se tehnikom tkivne postrojbe u analizi izraženosti EpCAM-a u 553 uzorka karcinoma prostate u različitim stadijima bolesti (uključujući stadij bolesti T4) i s različitim Gleasonovim zbrojem (uključujući Gleason 3 i 4). Uzorci tkiva uzeti su iz reprezentativnih područja tumora, a 414 uzoraka (74,9%) primjerenih za analizu obrađeno je statistički. Izraženost EpCAM-a u karcinomu prostate nije bila povezana sa stadijem bolesti T i N te Gleasonovim zbrojem. U analizi preživljenja koja je uključivala samo uzorke tumora s jakom izraženošću EpCAM-a (izraženost u više od 70% malignih stanica) nije zamijećena povezanost izraženosti EpCAM-a s ukupnim preživljenjem (188).

Za razliku od rezultata našeg istraživanja, prethodne studije nisu pronašle veću prognostičku vrijednost izraženosti EpCAM-a u karcinomu prostate (176, 188, 189), ali bi se dobivena odstupanja mogla objasniti time da smo drukčije postavili naše istraživanje. U usporedbi s prethodnim istraživanjima, naša istraživana skupina bila je konzistentnija, u analizi preživljenja u obzir se uzimalo samo preživljenje bez BCR-a, što je korišteno i kao krajnji cilj istraživanja. Imunohistokemijska analiza provedena je na cijeloj površini prereza odabranih tako da Gleasonov uzorak u prerezu najbolje rekapitulira postoperativni Gleasonov zbroj i sadržava područja benignog tkiva prostate. Cut-off vrijednost izraženosti EpCAM-a upotrijebljena u analizi preživljenja određena je ROC-analizom s 83,3% osjetljivosti i 69,4% specifičnosti. Nadalje, primarno protutijelo upotrijebljeno u našem istraživanju bilo je različito od onih upotrijebljenih u svim drugim istraživanjima (176, 188, 189).

Nekoliko istraživanja proučavalo je upotrebu EpCAM-a u liječenju karcinoma prostate. Oberneder i sur. (192) proveli su prvu fazu istraživanja s adecatumumabom, humanim protutijelom usmjerenim protiv EpCAM-a, kod bolesnika s hormon-refraktornim karcinomom prostate te su dokazali mogućnost upotrebe adecatumumaba u liječenju karcinoma prostate koji

izražava EpCAM. De Bono i sur. (193) proučavali su ING-1, monoklonalno protutijelo za EpCAM visokog afiniteta dobiveno humanim inženjeringom, u liječenju bolesnika s uznapredovalim karcinomima, uključujući karcinome prostate. Preliminarni dokazi nalaza ING-1 u tumoru i antitumorski učinak podržavaju daljnju kliničku primjenu tog protutijela u liječenju EpCAM pozitivnih malignih bolesti.

Dosadašnja istraživanja pokazala su smanjenu izraženost connexina 43 (Cx43) u karcinomu prostate u usporedbi sa susjednim benignim stanicama (182, 194).

Habermann i sur. (182) zamijetili su izraženost Cx43 u 93% uzoraka benigne hiperplazije prostate, dok je u karcinomu izraženost Cx43 bila smanjena i samo 10% uzoraka slabo diferenciranih karcinoma prostate (Gleasonov zbroj 8-10) pokazalo je izraženost Cx43. Ti rezultati upućuju na to da je izraženost Cx43 povezana s Gleasonovim zbrojem, a njegova se izraženost smanjuje porastom tumorskog gradusa (182). Slični rezultati o smanjenju izraženosti Cx43 u uznapredovalim, anaplastičnim stanicama karcinoma prostate objavili su u istraživanju Tsai i sur. (194).

U našem istraživanju je Cx43 bio izražen u svim analiziranim uzorcima malignog i benignog tkiva. Cx43 bio je više izražen u benignom tkivu u usporedbi s malignim tkivom prostate, što je u skladu s već objavljenim rezultatima (182, 194). Nije zamijećena znatna povezanost između izraženosti Cx43 u tumorima i preoperativnog te postoperativnog Gleasonova zbroja. Postoperativni Gleasonov zbroj pokazao je tendenciju postizanja vrijednosti važnosti ( $p=0,077$ ). Istraživanje Habermann i sur. (182) uključivalo je 40 uzoraka karcinoma, a istraživanje Tsaija i sur. (194) tri uzorka karcinoma. Naša ispitivana skupina bila je mnogo veća, ali smatramo da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se potvrdila ili odbacila povezanost izraženosti Cx43 i Gleasonova zbroja.

U usporedbi s normalnim stanicama većina neoplastičnih stanica ima manjak pukotinskih spojeva i poremećaj međustanične komunikacije (182). Ti rezultati upozoravaju na to da smanjenje izraženosti Cx43, koje rezultira poremećajem međustanične komunikacije, može uzrokovati nenormalan i nekontroliran rast epitelnih stanica (182).

Umhauer i sur. (195) pokazali su da je izraženost Cx43 bila gotovo odsutna u adenokarcinomu jajnika, dok je u normalnom tkivu jajnika Cx43 bio mnogo izraženiji.

Brehm i sur. (184) u svom istraživanju dokazali su da je progresija karcinoma *in situ* testisa u seminom povezana s intratubularnim smanjenjem ili čak gubitkom izraženosti Cx43 gena i sinteze Cx43 proteina u Sertolijevim stanicama, što upućuje na to da se regulacija izraženosti Cx43 događa na transkripcijskoj razini.

Istraživanje Mehta i sur. (177) pokazalo je da su connexini bili smješteni na kontaktnim područjima dviju epitelnih stanica dobro diferenciranih karcinoma prostate te da je zamijećeno njihovo unutarstanično nakupljanje kako su karcinomi postajali invazivniji i nediferenciraniji sve do postupnog gubitka njihove izraženosti u uznapredovalim stadijima. Gubitak pukotinskih spojeva kritični je korak prema progresiji karcinoma prostate (177). Ti su rezultati u skladu s njihovim *in vitro* istraživanjima, što upozorava na to da se epitelne stanice karcinoma prostate jako mijenjaju, tj. da su zamijećene promjene u izraženosti Cx43 uz velik gubitak Cx43 u uznapredovalim stadijima i metastatskoj bolesti (177).

Xu i sur. (183) objavili su slične rezultate za tkiva karcinoma pluća, u kojima je također bila smanjena izraženost Cx43 i E-kaderina, što je bilo povezano s lošom diferencijacijom tumora, uznapredovalim stadijem bolesti TNM i metastazama u limfnim čvorovima.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da je smanjena izraženost Cx43 u tumorima bila povezana s uznapredovalim stadijem tumora (stadij T3), ali nije bilo razlike između uzoraka tumora koji su zahvatili sjemene mjehuriće i onih koji su probili kapsulu. Smanjena izraženost Cx43 bila je povezana s višim preoperativnim vrijednostima PSA i pozitivnim kirurškim rubovima. Navedeni rezultati upućuju na činjenicu da se tumori sa smanjenom izraženošću Cx43 ponašaju agresivnije. U slučaju metastaza u limfnim čvorovima (stadij N1) nije zamijećena povezanost s izraženošću Cx43, ali zaključci o povezanosti izraženosti Cx43 i metastatskog potencijala tumora nisu pouzdani jer su samo trojica bolesnika u našoj istraživanoj

skupini imala metastaze u limfnim čvorovima, što je nedostatan broj za ozbiljniju statističku analizu.

Izraženost Cx43 proučavana je u različitim kacinomima u nekoliko istraživanja, ali su proučavanja bila rijetko usmjerena na njegovu prognostičku vrijednost (196-199). U posljednje vrijeme sve se više istražuju connexini, posebno Cx26 i njegova prognostička vrijednost u različitim karcinomima (196-198).

Nomura i sur. (196) u svom istraživanje obuhvatili su 153 bolesnika s kolorektalnim karcinomom. Cx26 imao je statistički značajnu povezanost s povratom bolesti i histološkim tipom tumora (196). Kod bolesnika s Cx26 negativnim tumorima preživljenje je bilo osjetno kraće nego kod bolesnika s Cx26 pozitivnim tumorima (196). Prema njihovoj multivarijatnoj analizi (196), Cx26 bio je nezavisni prognostički čimbenik.

Liu i sur. (197) proučavali su izraženost Cx26 u 205 slučajeva karcinoma želuca, a njihova multivarijatna regresijska analiza pokazala je da je izraženost Cx26 bila nezavisni prognostički pokazatelj intestinalnog tipa karcinoma želuca te je upućivala na povoljnu prognozu.

Inose i sur. (198) nastojali su razjasniti utjecaj Cx26 na kliničkopatološki ishod i njegovu prognostičku važnost u humanom planocelularnom karcinomu jednjaka 123 bolesnika. Njihovi rezultati pokazali su da nije bilo pozitivnog obojenja na Cx26 u normalnim pločastim stanicama jednjaka te je petogodišnje preživljenje bolesnika s planocelularnim karcinomom jednjaka i pozitivnim Cx26 bilo mnogo kraće nego bolesnika s Cx26 negativnim nalazom (198).

Prema našim spoznajama samo je jedno istraživanje proučavalo prognostičku vrijednost Cx43 u karcinomu.

Conklin i sur. (199) analizirali su izraženost Cx26, Cx32 i Cx43 u 438 invazivnih karcinoma dojke. Cx43 bio je snižen u različitim stadijima progresije karcinoma prostate te je pokazivao snažnu negativnu povezanost s Ki67 i snažnu pozitivnu povezanost sa statusom estrogenskih i progesteronskih receptora (199). No Kaplan-Meierova analiza preživljenja pokazala je da Cx proteini (Cx26, Cx32 i Cx43) nisu pouzdani prognostički

biljezi za karcinom dojke (199). U tom istraživanju nije provedena Coxova analiza.

U našem istraživanju se prvi put procjenjivala prognostička vrijednost izraženosti Cx43 u karcinomu prostate. U ovom istraživanju je gubitak izraženosti Cx43 u karcinomu prostate bio jasno povezan s karakteristikama tumora koje upozoravaju na agresivniji tumorski fenotip (više vrijednosti preoperativnog PSA, stadij tumora T3 i pozitivni kirurški rubovi). Prema univarijatnoj i multivarijatnoj analizi, bolesnici kod kojih je izraženost Cx43 u tumorskom tkivu bila manja od 30% imali su kraće vrijeme preživljenja bez BCR-a .

U nekoliko istraživanja proučavala se uloga Cx43 u terapiji karcinoma prostate. Wang i sur. (180) pokazali su da je Cx43 povećao osjetljivost karcinoma prostate na TNF $\alpha$  induciranu apoptozu. Fukushima i sur. (178) zamijetili su da je kombinirana terapija Cx43 i docetaxelom bila mnogo više citotoksična kada su stanice tretirane docetaxelom 24 sata od transfekcije Cx43, što upozorava na to da je Cx43 utjecao na povećanje osjetljivosti na docetaxel.

U našem istraživanju nije pronađena statistički znatna povezanost između izraženosti EpCAM-a i Cx43 u karcinomu prostate.

Naše istraživanje potvrdilo je povećanu izraženost EpCAM-a i smanjenu izraženost Cx43 u karcinomu prostate te da izraženost oba biljega ima prognostičku važnost, a dobiveni rezultati podržavaju njihovu potencijalnu ulogu u progresiji karcinoma prostate. Štoviše, naši rezultati upozoravaju i na to da bi EpCAM i Cx43 mogli poslužiti kao dodatni prognostički biljezi za prepoznavanje bolesnika s klinički lokaliziranim karcinomom prostate koji imaju povećan rizik za povrat bolesti i zahtijevaju sekundarnu terapiju. Daljnja istraživanja biološkog učinka tih proteina mogu pomoći u razvoju ciljane terapije na EpCAM i one terapije koja bi povećala izraženost Cx43 te preko njega inhibirala rast stanica i suprimirala tumorsku progresiju.



## 7. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti:

1. EpCAM je bio različito izražen u svim uzorcima adenokarcinoma prostate i u većini slučajeva (61,8%) izraženost je zamijećena u više od 35% žlijezda. Samo u 1% uzoraka benignog tkiva EpCAM je bio izražen u više od 35% žlijezda. Izraženost Cx43 bila je u različitoj mjeri prisutna u svim analiziranim uzorcima tumorskog i benignog tkiva. U više od 50% analiziranih uzoraka benignog tkiva Cx43 bio je izražen u 85% i više žlijezda, dok je sličnu izraženost imalo manje od 10% tumora.
2. Izraženost EpCAM-a bila je znatno statistički negativno povezana s ukupnim vremenom praćenja (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije -0,556,  $p < 0,001$ ), što upućuje na kraće vrijeme preživljenja bez povrata bolesti i raniju pojavu BCR-a kod bolesnika s većom izraženošću EpCAM-a. Kod bolesnika s BCR-om izraženost EpCAM-a bila je statistički mnogo veća ( $p < 0,001$ ) nego kod bolesnika kod kojih se nije pojavio BCR. Preoperativni (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,256,  $p = 0,009$ ) i postoperativni (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,279,  $p = 0,004$ ) Gleasonovi zbrojevi pokazali su pozitivnu povezanost s izraženošću EpCAM-a u tumorskom tkivu i bolesnici s većom izraženošću EpCAM-a imali su veći preoperativni i postoperativni Gleasonov zbroj. U uzorcima tumora u stadiju bolesti T3 (Mann-Whitneyev U test,  $p = 0,002$ ) zamijećena je veća izraženost EpCAM-a nego u uzorcima tumora u stadiju T2.
3. Pojačana izraženost Cx43 bila je osjetno statistički pozitivno povezana s vremenom praćenja (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije 0,432,  $p < 0,001$ ), što upozorava na dulje vrijeme preživljenja bez povrata bolesti i kasniju pojavu BCR-a kod tih bolesnika. Preoperativni PSA (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije -0,266,  $p < 0,007$ ) pokazao je negativnu povezanost s izraženošću Cx43, a bolesnici sa smanjenom izraženošću Cx43 imali su više preoperativne vrijednosti

PSA. U uzorcima tumora u stadiju bolesti T3 (Mann-Whitneyev U test,  $p=0,021$ ) i onih s pozitivnim kirurškim rubovima (Mann-Whitneyev U test,  $p<0,001$ ) zamijećena je mnogo manja izraženost Cx43 nego u uzorcima tumora u stadiju T2 i uzorcima tumora bez pozitivnih kirurških rubova.

4. Spearmanovim testom korelacije nije pronađena veća povezanost između izraženosti EpCAM-a i Cx43 u adenokarcinomu prostate (Spearmanov test korelacije, koeficijent korelacije  $-0,181$ ,  $p=0,069$ ).
5. Kaplan-Meierova analiza pokazala je da je vrijeme preživljenja bez BCR-a dulje za bolesnike kod kojih je izraženost EpCAM-a manja od 45% nego za bolesnike kod kojih je izraženost EpCAM-a veća od 45% ( $p<0,001$ ) kao i za bolesnike kod kojih je izraženost Cx43 veća od 30% nego za one kod kojih je izraženost Cx43 manja od 30% ( $p<0,001$ ). Prema rezultatima Kaplan-Meierove analize napravljena je Coxova regresijska analiza. Postavljeni regresijski model imao je veliku prediktivnu vrijednost na duljinu preživljenja na razini  $p<0,000$ . Kao statistički važni čimbenici koji utječu na duljinu preživljenja bez povrata bolesti u multivarijantnoj analizi pokazali su se preoperativni Gleasonov zbroj ( $p=0,025$ ), izraženost EpCAM-a veća od 45% ( $p<0,001$ ), izraženost Cx43 manja od 30% ( $p=0,014$ ), viši, T stadij bolesti ( $p<0,001$ ) i preoperativni PSA ( $p=0,003$ ). Oba biljega pokazala su se u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi kao dobri neovisni prognostički čimbenici.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da bi oba istraživana biljega mogla imati ulogu u progresiji i prognozi karcinoma prostate. S obzirom na njihovu potencijalnu ulogu u progresiji karcinoma prostate, oba biljega kandidati su za razvoj i primjenu specifične molekularne terapije koja bi mogla olakšati i unaprijediti liječenje karcinoma prostate. Praćenjem EpCAM-a i Cx43 u prognostičke svrhe mogli bi se na relativno jednostavan i jeftin način izdvojiti bolesnici kojima nakon kirurške terapije treba uvesti i dodatnu terapiju da bi se spriječio povrat bolesti, odnosno produljio život i poboljšala njegova kvaliteta.

## 8. SAŽETAK

U ovom istraživanju analizirana je izraženost i prognostička vrijednost EpCAM-a i connexina 43 (Cx43) u karcinomu prostate. Hipoteza istraživanja bila je da su EpCAM i Cx43 izraženi u adenokarcinomu prostate te da je pojačana izraženost EpCAM-a povezana s lošijom prognozom, a pojačana izraženost Cx43 s boljom prognozom za bolesnika s adenokarcinomom prostate.

Na temelju postavljene hipoteze određeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

1. Imunohistokemijski odrediti izraženost EpCAM-a i Cx43 u adenokarcinomu i benignom tkivu prostate.
2. Usporediti imunohistokemijsku izraženost EpCAM-a i Cx43 u adenokarcinomu prostate s priznatim prognostičkim čimbenicima (preoperativni PSA, Gleasonov zbroj, TNM i vrijeme biokemijskog relapsa).
3. Odrediti postoji li povezanost između izraženosti EpCAM-a i Cx43 u adenokarcinomu prostate.
4. Odrediti koji od dva ispitivana biljega ima veću prognostičku vrijednost u adenokarcinomu prostate.

Istraživanje je obuhvatilo 102 bolesnika kojima je učinjena radikalna prostatektomija zbog klinički lokaliziranog karcinoma prostate. Materijal je obrađen standardnom histološkom metodom, a dodatni rezovi tkiva koji su uz karcinom prostate sadržavali i tkivo prostate bez tumora analizirani su imunohistokemijski monoklonalnim protutijelima na EpCAM i Cx43.

EpCAM je bio pojačano izražen, a Cx43 smanjeno izražen u karcinomu prostate. Izraženost EpCAM-a bila je statistički osjetno negativno povezana s ukupnim vremenom praćenja ( $p < 0,001$ ), što upozorava na kraće vrijeme preživljenja bez povrata bolesti i raniju pojavu BCR-a kod bolesnika s većom izraženošću EpCAM-a. Kod bolesnika kod kojih se pojavio BCR izraženost EpCAM-a bila je statistički mnogo veća ( $p < 0,001$ ). Bolesnici s većim preoperativnim i postoperativnim Gleasonovim zbrojem te kraćim

vremenom praćenja imali su mnogo veću izraženost EpCAM-a. Izraženost Cx43 u karcinomu prostate bila je znatno povezana s vremenom praćenja ( $p < 0,001$ ) i preoperativnim PSA ( $p < 0,007$ ). Bolesnici sa smanjenom izraženošću Cx43 u karcinomu imali su kraće vrijeme preživljenja bez povrata bolesti i više preoperativne vrijednosti PSA. Nadalje, bolesnici s pozitivnim kirurškim rubovima ( $p < 0,001$ ) imali su osjetno smanjenu izraženost Cx43.

Spearmanovim faktorom korelacije nije pronađena statistički znatna povezanost između stupnja izraženosti EpCAM-a i Cx43 u karcinomu prostate (Spearmanov koeficijent korelacije, koeficijent korelacije  $-0,181$ ,  $p = 0,069$ ).

Kaplan-Meierova analiza pokazala je da su bolesnici s izraženošću EpCAM-a većom od 45% ( $p < 0,001$ ) i izraženošću Cx43 manjom od 30% ( $p < 0,001$ ) živjeli kraće bez povrata bolesti. U Coxovoj regresijskoj analizi kao statistički važni faktori za duljinu preživljenja bez povrata bolesti pokazali su se preoperativni PSA ( $p = 0,003$ ), preoperativni Gleasonov zbroj ( $p = 0,025$ ), viši, T stadij bolesti ( $p < 0,001$ ), izraženost EpCAM-a veća od 45% ( $p < 0,001$ ) i izraženost Cx43 manja od 30% ( $p = 0,014$ ).

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da bi EpCAM koji je u većoj mjeri izražen u karcinomu te Cx43 koji pokazuje smanjenu izraženost u tumorskom tkivu mogli imati ulogu u progresiji karcinoma prostate. EpCAM i Cx43 osjetno su povezani s priznatim prognostičkim čimbenicima, što upozorava na njihovu prognostičku vrijednost koja je u oba slučaja potvrđena univarijatom i multivarijatom analizom.

S obzirom na njihovu moguću ulogu u progresiji karcinoma prostate, oba ispitivana biljega kandidati su za razvoj i primjenu specifične molekularne terapije koja bi mogla olakšati i unaprijediti liječenje karcinoma prostate. Praćenjem EpCAM-a i Cx43 u prognostičke svrhe također bi se mogli na relativno jednostavan i jeftin način izdvojiti bolesnici kojima nakon kirurške terapije treba uvesti i dodatnu terapiju da bi se spriječio povrat bolesti, odnosno produljio život i poboljšala njegova kvaliteta.

## 9. SUMMARY

### PROGNOSTIC VALUE OF EpCAM AND CONNEXIN 43 EXPRESSION IN PROSTATE CANCER

The hypothesis of this study was that the increased expression of EpCAM is associated with poorer disease prognosis while the increased expression of connexin 43 (Cx43) in prostate cancer is associated with better disease prognosis.

The study included a cohort of 102 patients and the examined markers were analyzed immunohistochemically with monoclonal antibodies to EpCAM and Cx43.

EpCAM was found to be overexpressed in cancer and Cx43 in benign prostatic tissue. The patients with higher preoperative and postoperative Gleason score and short follow-up time had tumours with a significantly higher expression of EpCAM. The patients with BCR harbored higher EpCAM expression. Tumours in T3 stage of the disease showed significantly higher EpCAM expression. The loss of Cx43 expression was clearly associated with tumour features that indicated a more aggressive tumour phenotype (higher preoperative PSA, T3 tumor stage and positive surgical margins). Kaplan-Meier analysis showed that the patients with the expression of EpCAM  $\geq 45\%$  ( $p < 0.001$ ) and Cx43 expression  $\leq 30\%$  ( $p < 0.001$ ) were short lived without disease recurrence. In Cox regression analysis, preoperative Gleason score ( $p = 0.025$ ), higher T stage ( $p < 0.001$ ), preoperative PSA ( $p = 0.003$ ), EpCAM expression  $\geq 45\%$  ( $p < 0.001$ ) and Cx43 expression  $\leq 30\%$  ( $p = 0.014$ ) were significant predictors of biochemical recurrence-free survival.

Based on these results we can conclude that EpCAM higher expression and Cx43 decreased expression in cancer tissue may play a role in the progression of prostate cancer. EpCAM and Cx43 were significantly associated with recognized prognostic factors, and their prognostic value was confirmed both in univariate as well as in multivariate analysis.

**Goran Benko, Zagreb, 2013.**

## 10. LITERATURA

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, i sur. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
3. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 2002;90:162-73.
4. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000: the global picture. *Eur J Cancer* 2001;37:S4-66.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. godinu, Registar za rak, Incidencija raka u Hrvatskoj. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2010.
6. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, i sur. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17:337-47.
7. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer* 1996;77:138-43.
8. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, i sur. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3367-71.
9. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002;168:906-13.
10. Brawley OW, Jani AB, Master V. Prostate cancer and race. *Curr Probl Cancer* 2007;31:211-25.
11. Sim HG, Cheng CW. Changing demography of prostate cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:834-45.
12. Gu G, Borthman AR. Cytogenomic aberrations associated with prostate cancer. *Cancer Genet* 2011;204:57-67.
13. Gallucci M, Merola R, Leonardo C, i sur. Genetic profile identification in clinically localized prostate carcinoma. *Urol Oncol* 2009;27:502-8.

14. Reynolds MA. Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett* 2008;271:13-24.
15. Breslow N, Chan CW, Dhom G, i sur. Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int J Cancer* 1977;20:680-8.
16. Kabalin JN, McNeal JE, Price HM, i sur. Unsuspected adenocarcinoma of prostate in patient undergoing cystoprostatectomy for other causes: incidence, histology and morphometric observation. *J Urol* 1989;141:1091-4.
17. Zaridze DG, Boyle P, Smans M. International trends in prostatic cancer. *Int J Cancer* 1984;33:223-30.
18. Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer* 2004;4:519-27.
19. Schmid H-P, Engeler DS, Pummer K, i sur. Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Cancer Prevention. Recent Results Cancer Res* 2007;174:101-7.
20. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, i sur. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 2012;61:1079-92.
21. Wein JA. *Campbell-Walsh Urology*. 10. Izdanje. Philadelphia: Saunders, 2012.
22. Montironi R, Santinelli A, Mazzucchelli R. Prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Panminerva Med* 2002;44:213-20.
23. Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia. *Curr Urol Rep* 2000;1:65-70.
24. Fine SW, Amin MB, Barney DM, i sur. A contemporary update on pathology reporting for prostate cancer: biopsy and radical prostatectomy specimens. *Eur Urol* 2012;62:20-39.
25. Lopez JI. Prostate adenocarcinoma detected after high-grade prostatic intraepithelial neoplasia or atypical small acinar proliferation. *BJU Int* 2007;100:1272-6.
26. Tomas D, Krušlin B, Rogatsch H, Schafer G, Belicza M, Mikuz G. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. *Eur Urol* 2007;51:98-103.

27. 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.
28. De Nunzio C, Kramer G, Marberger M, i sur. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol* 2011;60:106-17.
29. Asimakopoulos AD, Miano R, Mauriello A, i sur. Significance of focal proliferative atrophy lesions in prostate biopsy cores that test negative for prostate carcinoma. *Urol Oncol* 2011;29:690-7.
30. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, i sur. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 2003;62 Suppl 5A:S55-62.
31. Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2000;56:828-32.
32. Rubin MA, De Marzo AM. Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol* 2004;17:380-8.
33. Cheng L, Shan A, Cheville JC, Qian J, Bostwick DG. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: a premalignant lesion? *Cancer Res* 1988;58:389-91.
34. Bostwick DG, Iczkowski KA. Minimal criteria for the diagnosis of prostate cancer on needle biopsy. *Ann Diagn Pathol* 1997;1:104-29.
35. Montironi R, Bartels PH, Hamilton PW, Thompson D. Atypical adenomatous hyperplasia (adenosis) of the prostate: development of a Bayesian belief network for its distinction from well-differentiated adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1996;27:396-407.
36. Bostwick DG. Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* 1996;78:330-6.
37. Foster CS, Sakr WA. Proliferative lesions of the prostate that mimic carcinoma. *Diagn Pathol* 2001;7:194-212.
38. Grignon DJ, Sakr WA. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: a critical review. *Eur Urol* 1996;30:206-11.



39. Gleason DF. Atypical hyperplasia, benign hyperplasia, and well-differentiated adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol* 1985;9:53-67.
40. Estrig D, Freeman JA, Elmajian AK, i sur. Transitional cell carcinoma involving the prostate with a proposed staging classification for stromal invasion. *J Urol* 1996;156:1071-6.
41. Stilgenbauer R, Benedict M, Bamshad R, Viduetsky A. Sarcoma of the prostate: sonographic findings and pathologic correlation. *J Ultrasound Med* 2007;26:1789-93.
42. Dundore PA, Cheville JC, Nascimento AG, Farrow GM, Bostwick DG. Carcinosarcoma of the prostate. Report of 21 cases. *Cancer* 1995;76:1035-42.
43. McNeal JE. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 1968;49:347-9.
44. Noguchi M, Stamey TA, McNeal JE, Nolley R. Prognostic factors for multifocal prostate cancer in radical prostatectomy specimens: lack of significance of secondary cancers. *J Urol* 2003;170:459-63.
45. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974;111:58-64.
46. Amin M, Boccon-Gibod L, Egevad L, i sur. Prognostic and predictive factors and reporting of prostate carcinoma in prostate needle biopsy specimens. *Scand J Urol Nephrol* 2005;216:20-33.
47. Egevad L, Norlen BJ, Norberg M. The value of multiple core biopsies for predicting the Gleason score of prostate cancer. *BJU Int* 2001;88:716-21.
48. Harnden P, Shelley MD, Coles B, i sur. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncology* 2007;8:411-9.
49. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C (eds). *TNM classification of malignant tumors*. UICC International Union Against Cancer. 7th ed. Wiley-Blackwell, 2009;243-248.

50. Hayakawa T, Mitsuya H, Kojima M, Hayase Y. Clinical study on prostatic cancer detected incidentally by transurethral resection of the prostate. *Hinyokika Kyo* 2002;48:13-6.
51. Gnanapragasam VJ, Kumar V, Langton D, Pickard RS, Leung HY. Outcome of transurethral prostatectomy for the palliative management of lower urinary tract symptoms in men with prostate cancer. *Int J Urol* 2006;13:711-5.
52. Lim LC, Rosenthal MA, Maartens N, Ryan G. Management of brain metastases *Intern Med J* 2004;34:270-8.
53. Whitmore WF Jr. Natural history and staging of prostate cancer. *Urol Clin North Am* 1984;11(2):205-20.
54. Thuraija R, Osborn J, McFarlane J, Bahl A, Persad R. Radical prostatectomy with positive surgical margins: how are patients managed? *BJU Int* 2006;97:445-50.
55. Chang SS, Cookson MS. Impact of positive surgical margins after radical prostatectomy. *Urology* 2006;68:249-52.
56. Ahlering TE, Skarecky DW, McLaren CE, Weinberg AC. Seminal vesicle involvement in patients with D1 disease predicts early prostate specific antigen recurrence and metastasis after radical prostatectomy and early androgen ablation. *Cancer* 2002 15;94:1648-53.
57. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, i sur. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology* 1993;42:365-74.
58. Bozeman CB, Carver BS, Caldito G, Venable DD, Eastham JA. Prostate cancer in patients with an abnormal digital rectal examination and serum prostate-specific antigen less than 4.0 ng/ml. *Urology* 2005;66:803-7.
59. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, i sur. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/ml or less. *J Urol* 1999;161:835-9.
60. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, i sur. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994;151:1283-90.

61. Sauter ER, Klein G, Wagner-Mann C, Diamandis EP. Prostate-specific antigen expression in nipple aspirate fluid is associated with advanced breast cancer. *Canc Detect Prev* 2004; 28:27-31.
62. Allard WJ, Zhou Z, Yeung KK. Novel immunoassay for the measurement of complexed prostate-specific antigen in serum. *Clin Chem* 1998;44:1216-23.
63. Stamey TA, Kabalin JN. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. Untreated patients. *J Urol* 1989;141:1070-5.
64. Stephan C, Cammann H, Meyer HA, Lein M, Jung K. PSA and new biomarkers within multivariate models to improve early detection of prostate cancer. *Cancer Lett* 2007;249:18-29.
65. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350:2239-46.
66. Stamey TA, Freiha FS, McNeal J, et al. Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. *Cancer* 1993;71:933-8.
67. Gallina A, Karakiewicz PI, Chun FK, et al. Health-insurance status is a determinant of the stage at presentation and of cancer control in European men treated with radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *BJU Int* 2007;99:1404-8.
68. Trock BJ, Han M, Freedland SJ, et al. Prostate cancer-specific survival following salvage radiotherapy vs. observation in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* 2008;299:2760-9.
69. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA* 1993;270:860-4.
70. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992;267:2215-20.
71. Schmid H-P, McNeal JE, Stamey TA. Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients

- with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer* 1993;71:2031-40.
72. Arlen PM, Bianco F, Dahut WL, i sur. Prostate Specific Antigen Working Group. Prostate Specific Antigen Working Group guidelines on prostate specific antigen doubling time. *J Urol* 2008;179:2181-5.
  73. Heidenreich A. Identification of high-risk prostate cancer: role of prostate-specific antigen, PSA doubling time, and PSA velocity. *Eur Urol* 2008;54:976-7.
  74. Ramirez ML, Nelson EC, Devere White RW, i sur. Current applications for prostate-specific antigen doubling time. *Eur Urol* 2008;54:291-300.
  75. O'Brien MF, Cronin AM, Fearn PA, i sur. Pre-treatment prostate-specific antigen (PSA) velocity and doubling time are associated with outcome but neither improves prediction of outcome beyond pre-treatment PSA alone in patients treated with radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2009;27:3591-7.
  76. Vickers AJ, Savage C, O'Brien MF, i sur. Systematic review of pre-treatment prostate-specific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:398-403.
  77. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, i sur. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998;279:1542-7.
  78. Stephan C, Lein M, Jung K, i sur. The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. *Cancer* 1997;79:104-9.
  79. Hessels D, Klein Gunnewiek JMT, van Oort I, i sur. DD3 (PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44:8-15.
  80. Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, i sur. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol* 2008;179:1804-9.

81. Hessels D, van Gils MP, van Hooij O, i sur. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate* 2010;70:10-6.
82. Shappell SB. Clinical utility of prostate carcinoma molecular diagnostic tests. *Rev Urol* 2008;10:44-69.
83. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, i sur. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol* 2009;56:275-86.
84. Fučkar Ž, Tucak A. Transrektalna sonografija prostato vezikularnog segmenta (prva iskustva). *Med Vjesn* 1985;17:25-8.
85. Tang J, Yang JC, Li Y, Li J, Shi H. Peripheral zone hypoechoic lesions of the prostate: evaluation with contrast-enhanced gray scale transrectal ultrasonography. *J Ultrasound Med* 2007;26:1671-9.
86. Sperandeo G, Sperandeo M, Morcaldi M i sur. Transrectal ultrasonography for the early diagnosis of adenocarcinoma of the prostate: a new manoeuvre designed to improve the differentiation of malignant and benign lesions. *J Urol* 2003;169:607-10.
87. Spajić B, Čupić H, Tomas D, Štimac G, Krušlin B, Kraus O. The incidence of hyper echoic prostate cancer in transrectal ultrasound-guided biopsy specimens. *Urology* 2007;70:734-7.
88. Eastham JA, Riedel E, Scardino PT, i sur. Polyp Prevention Trial Study Group. Variation of serum prostate-specific antigen levels: an evaluation of year-to-year fluctuations. *JAMA* 2003;289:2695-700.
89. Stephan C, Klaas M, Muller C, i sur. Interchangeability of measurements of total and free prostate-specific antigen in serum with 5 frequently used assay combinations: an update. *Clin Chem* 2006;52:59-64.
90. Hara R, Jo Y, Fujii T, i sur. Optimal approach for prostate cancer detection as initial biopsy: prospective randomized study comparing transperineal versus transrectal systematic 12-core biopsy. *Urology* 2008;71:191-5.
91. Takenaka A, Hara R, Ishimura T, i sur. A prospective randomized comparison of diagnostic efficiency between transperineal and transrectal 12-core prostate biopsy. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2008;11:134-8.

92. Epstein JI, Herawi M. Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care. *J Urol* 2006;175:820-834.
93. Moore CK, Karikehalli S, Nazeer T, i sur. Prognostic significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation in the contemporary era. *J Urol* 2005;173:70-2.
94. Merrimen JL, Jones G, Walker D, i sur. Multifocal high grade prostatic intraepithelial neoplasia is a significant risk factor for prostatic adenocarcinoma. *J Urol* 2009;182:485-90.
95. Lemaitre L, Puech P, Poncelet E, i sur. Dynamic contrast-enhanced MRI of anterior prostate cancer: morphometric assessment and correlation with radical prostatectomy findings. *Eur Radiol* 2009;19:470-80.
96. Walz J, Graefen M, Chun FK, i sur. High incidence of prostate cancer detected by saturation biopsy after previous negative biopsy series. *Eur Urol* 2006;50:498-505.
97. Eichler K, Hempel S, Wilby J, i sur. Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review. *J Urol* 2006;175:1605-12.
98. Donovan J, Hamdy F, Neal D, i sur. ProtecT Study Group. Prostate Testing for Cancer and Treatment (ProtecT) feasibility study. *Health Technol Assess* 2003;7:1-88.
99. Zigeuner R, Schips L, Lipsky K, i sur. Detection of prostate cancer by TURP or open surgery in patients with previously negative transrectal prostate biopsies. *Urology* 2003;62:883-7.
100. Linzer DG, Stock RG, Stone NN, i sur. Seminal vesicle biopsy: accuracy and implications for staging of prostate cancer. *Urology* 1996;48:757-61.
101. Pelzer AE, Bektic J, Berger AP, i sur. Are transition zone biopsies still necessary to improve prostate cancer detection? Results from the Tyrol screening project. *Eur Urol* 2005;48:916-21.
102. Aron M, Rajeev TP, Gupta NP. Antibiotic prophylaxis for transrectal needle biopsy of the prostate: a randomized controlled study. *BJU Int* 2000;85:682-5.

103. Adamakis I, Mitropoulos D, Haritopoulos K, i sur. Pain during transrectal ultrasonography guided prostate biopsy: a randomized prospective trial comparing periprostatic infiltration with lidocaine with the intrarectal instillation of lidocaine-prilocain cream. *World J Urol* 2004;22:281-4.
104. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ Prostate Cancer Early Detection, V.2.2010. Page 15.
105. Giannarini G, Mogorovich A, Valent F, i sur. Continuing or discontinuing low-dose aspirin before transrectal prostate biopsy: results of a prospective randomized trial. *Urol* 2007;70:501-5.
106. Iczkowski KA, Casella G, Seppala RJ, i sur. Needle core length in sextant biopsy influences prostate cancer detection rate. *Urology* 2002;59:698-703.
107. Van der Kwast TH, Lopes C, Santonja C, i sur. Members of the pathology committee of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer. Guidelines for processing and reporting of prostatic needle biopsies. *J Clin Pathol* 2003;56:336-40.
108. Rogatsch H, Moser P, Volgger H, i sur. Diagnostic effect of an improved pre-embedding method of prostate needle biopsy specimens. *Hum Pathol* 2000;31:1102-7.
109. Novis DA, Zarbo RJ, Valenstein PA. Diagnostic uncertainty expressed in prostate needle biopsies. A College of American Pathologists Q-probes Study of 15,753 prostate needle biopsies in 332 institutions. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:687-92.
110. Iczkowski KA. Current prostate biopsy interpretation: criteria for cancer, atypical small acinar proliferation, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, and use of immunostains. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:835-43.
111. Reyes AO, Humphrey PA. Diagnostic effect of complete histologic sampling of prostate needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1998;109:416-22.
112. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, i sur. ISUP grading committee. The 2005 International Society of Urologic Pathology (ISUP) Consensus

- Conference on Gleason grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1228-42.
113. Sebo TJ, Cheville JC, Riehle DL, i sur. Predicting prostate carcinoma volume and stage at radical prostatectomy by assessing needle biopsy specimens for percent surface area and cores positive for carcinoma, perineural invasion, Gleason score, DNA ploidy and proliferation, and preoperative serum prostate specific antigen: a report of 454 cases. *Cancer* 2001;91:2196-204.
  114. Freedland SJ, Terris MK, Csathy GS, i sur. Search Database Study Group. Preoperative model for predicting prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy using percent of biopsy tissue with cancer, biopsy Gleason grade and serum prostate specific antigen. *J Urol* 2004;171:2215-20.
  115. Brimo F, Vollmer RT, Corcos J, i sur. Prognostic value of various morphometric measurements of tumour extent in prostate needle core tissue. *Histopathology* 2008;53:177-83.
  116. Herkommer K, Kuefer R, Gschwend JE, i sur. Pathological T0 prostate cancer without neoadjuvant therapy: clinical presentation and follow-up. *Eur Urol* 2004;45:36-41.
  117. Postma R, de Vries SH, Roobol MJ, i sur. Incidence and follow-up of patients with focal prostate carcinoma in 2 screening rounds after an interval of 4 years. *Cancer* 2005;103:708-16.
  118. Oliver SE, May MT, Gunnell D. International trends in prostate-cancer mortality in the „PSA-ERA“. *Int J Cancer* 2001;92:893-8.
  119. Helgesen F, Holmberg L, Johansson JE, i sur. Trends in prostate cancer survival in Sweden, 1960 through 1988, evidence of increasing diagnosis of non-lethal tumours. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1216-21.
  120. Post PN, Kil PJ, Coebergh JW. Trends in survival of prostate cancer in south-eastern Netherlands 1971-1989. *Int J Cancer* 1999;81:551-4.
  121. Ilic D, O'Connor D, Green S, i sur. Screening for prostate cancer: a Cochrane systematic review. *Cancer Causes Control* 2007;18:279-85.
  122. Bartsch G, Horninger W, Klocker H, i sur. Tyrol Prostate Cancer Screening Group. Prostate cancer mortality after introduction of prostate specific



- antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. *Urology* 2001;58:417-24.
123. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL 3rd, i sur; PLCO Project Team. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 2009;360:1310-9.
  124. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, i sur; ERSPC Investigators. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009;360:1320-8.
  125. Heidenreich A, Bolla M, Joniau S, i sur. Guidelines on prostate cancer. European Association of Urology, 2011.
  126. Börgermann C, Loertzer H, Hammerer P, i sur. Problems, objective, and substance of early detection of prostate cancer. *Urologe A* 2010;49:181-9.
  127. Roobol MJ, Roobol DW, Schröder FH. Is additional testing necessary in men with prostate-specific antigen levels of 1.0 ng/mL or less in a population-based screening setting? (ERSPC, section Rotterdam). *Urology* 2005;65:343-6.
  128. Carter HB, Kettermann AE, Ferrucci L, i sur. Prostate specific antigen testing among the elderly; when to stop? *J Urol* 2008;174:600.
  129. Bianco FJ Jr, Scardino PT, Eastham JA. Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function ("trifecta"). *Urology* 2005;66:83-94.
  130. Young H. Radical perineal prostatectomy. *Johns Hopkins Hosp Bull* 1905;16:315-21.
  131. Memmelaar J, Millin T. Total prostatovesiculectomy; retropubic approach. *J Urol* 1949;62:340-8.
  132. Walsh PC, Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol* 1982;128:492-7.
  133. Fitzsimons NJ, Sun LL, Dahm P, i sur. A single-institution comparison between radical perineal and radical retropubic prostatectomy on perioperative and pathological outcomes for obese men: an analysis of the Duke Prostate Center database. *Urology* 2007;70:1146-51.
  134. Walsh PC. Extraperitoneal standard laparoscopic radical prostatectomy. *J Urol* 2005;174:567-8.

135. Ficarra V, Novara G, Artibani W, i sur. Retropubic, laparoscopic, and robot-assisted radical prostatectomy: a systematic review and cumulative analysis of comparative studies. *Eur Urol* 2009;55:1037-63.
136. Budäus L, Huland H, Graefen M. Controversies in the management of localized prostate cancer: Radical prostatectomy still the standard of care. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 May 23. [Epub ahead of print] PMID: 21612943.
137. Eastham JA, Kattan MW, Riedel E, i sur. Variations among individual surgeons in the rate of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol* 2003;170:2292-5.
138. Dubbelman YD, Dohle GR, Schröder FH. Sexual function before and after radical retropubic prostatectomy: A systematic review of prognostic indicators for a successful outcome. *Eur Urol* 2006;50:711-8.
139. Kirschner-Hermanns R, Jakse G. Quality of life following radical prostatectomy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;43:141-51.
140. Potosky AL, Davis WW, Hoffman RM, i sur. Five-year outcomes after prostatectomy or radiotherapy for prostate cancer: The prostate cancer outcomes study. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1358-67.
141. Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA. Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2005;23:7005-12.
142. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999;281:1591-7.
143. Potosky AL, Legler J, Albertsen PC, i sur. Health outcomes after prostatectomy or radiotherapy for prostate cancer: Results from the Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1582-92.
144. Duchesne GM. Radiation for prostate cancer. *Lancet Oncol* 2001;2:73-81.
145. Morris DE, Emami B, Manch PM, i sur. Evidence-based review of three-dimensional conformal radiotherapy for localized prostate cancer: an ASTRO outcomes initiative. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:3-19.
146. Bossi A. Modern external-beam radiation therapy for prostate cancer: How and when? *Eur Urol Suppl* 2008;7:22-8.

147. Crook J. The role of brachytherapy in the definitive management of prostate cancer. *Cancer Radioth* 2011;15:230-7.
148. Swanson GP, Thompson IM. Adjuvant radiotherapy for high-risk patients following radical prostatectomy. *Urol Oncol* 2007;25:515-9.
149. Morgan SC, Waldron TS, Eapen L, Mayhew LA, Winkquist E, Lukka H. Adjuvant radiotherapy following radical prostatectomy for pathologic T3 or margin-positive prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Radiother Oncol* 2008;88:1-9.
150. Pasquier D, Ballereau C. Adjuvant and salvage radiotherapy after prostatectomy for prostate cancer: a literature review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:972-9.
151. Moul JW. Biochemical recurrence of prostate cancer. *Curr Probl Cancer* 2003;27:243-72.
152. Carroll PR, Cooperberg MR. Evolving indications for active surveillance in low-risk localized prostate cancer. *Eur Urol Suppl* 2003;2:7-13.
153. van As NJ, Norman AR, Thomas K, et al. Predicting the probability of deferred radical treatment for localised prostate cancer managed by active surveillance. *Eur Urol* 2008;54:1297-305.
154. Lu-Yao GL, Potosky AL, Albertsen PC, et al. Follow-up prostate cancer treatments after radical prostatectomy: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:166-73.
155. Partin AW, Pearson JD, Landis PK, et al. Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radical prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases. *Urology* 1994;43:649-59.
156. Bott SRJ. Management of recurrent disease after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2004;7:211-6.
157. Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, et al. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999;281:1591-7.
158. Bott SR. Management of recurrent disease after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2004;7:211-6.
159. Moul JW. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *J Urol* 2000;163:1632-42.

160. Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, i sur. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:965-74.
161. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Consensus Panel. Consensus statement: guidelines for PSA following radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:1035-41.
162. Trapasso JG, deKernion JB, Smith RB, i sur. The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol* 1994;152:1821-5.
163. Lange PH, Ercole CJ, Lightner DJ, i sur. The value of serum prostate specific antigen determinations before and after radical prostatectomy. *J Urol* 1989;141:873-9.
164. Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007;171:386-95.
165. Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, i sur. Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:2659-69.
166. Xie X, Wang CY, Cao YX, i sur. Expression pattern of epithelial cell adhesion molecule on normal and malignant colon tissues. *World J Gastroenterol* 2005;11:344-7.
167. Thurmond LM, Stimmel JB, Ingram AC, i sur. Adenocarcinoma cells exposed in vitro to Navelbine or Taxol increase Ep-CAM expression through a novel mechanism. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:429-37.
168. Stoecklein NH, Siegmund A, Scheunemann P, i sur. Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer* 2006;6:165-9.
169. Gosens MJ, van Kempen LC, van de Velde CJ, van Krieken JH, Nagtegaal ID. Loss of membranous Ep-CAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol* 2007;20:221-32.

170. Prince S, Zeidman A, Dekel Y, Ram E, Koren R. Expression of epithelial cell adhesion molecule in gallbladder carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables. *Am J Clin Pathol* 2008;129:424-9.
171. Spizzo G, Went PT, Dirnhofer S, et al. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004;86:207-13.
172. Went PT, Lugli A, Meier S, et al. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:122-8.
173. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 2007;96:417-23.
174. Brunner A, Prelog M, Verdorfer I, et al. EpCAM is predominantly expressed in high grade and advanced stage urothelial carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 2008;61:307-10.
175. Spizzo G, Went PT, Dirnhofer S, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;103:483-8.
176. Poczatek RB, Myers RB, Manne U, et al. Ep-CAM levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Urol* 1999;162:1462-6.
177. Mehta PP, Perez-Stable C, Nadji M, Mian M, Asotra K, Ross BA. Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes. *Dev Genet* 1999;24:91-110.
178. Fukushima M, Hattori Y, Yoshizawa T, Maitani Y. Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice. *Int J Oncol* 2007;30:225-31.
179. Hossain MZ, Jagdale AB, Ao P, LeCiel C, Huang RP, Boynton AL. Impaired expression and posttranslational processing of connexin 43 and downregulation of gap junctional communication in neoplastic human prostate cells. *Prostate* 1999;38:55-9.
180. Wang M, Berthoud VM, Beyer EC. Connexin 43 increases the sensitivity of prostate cancer cells to TNF $\alpha$ -induced apoptosis. *J Cell Sci* 2007;120:320-9.

181. Govindarajan R, Zhao S, Song XH, i sur. Impaired trafficking of connexins in androgen-independent human prostate cancer cell lines and its mitigation by  $\alpha$ -catenin. *J Biol Chem* 2002;277:50087-97.
182. Habermann H, Ray V, Habermann W, Prins GS. Alterations in gap junction protein expression in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol* 2002;167:655-60.
183. Xu HT, Li QC, Zhang YX, i sur. Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells. *Folia Histochem Citobiol* 2008;46:315-21.
184. Brehm R, Ruttinger C, Fischer P, i sur. Transition from preinvasive carcinoma in situ to seminoma is accompanied by a reduction of connexin 43 expression in Sertoli cells and germ cells. *Neoplasia* 2006;8:499-509.
185. Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 2005;1719:125-45.
186. Li Z, Zhou Z, Welch DR, Donahue HJ. Expressing connexin 43 in breast cancer cells reduces their metastasis to lungs. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:893-901.
187. Sobin LH, Wittekind C, (eds). *International Union Against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumours*, 5th ed. Wiley Liss: New York, USA, 1997.
188. Went P, Vasei M, Bubendorf L, i sur. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 2006;94:128-35.
189. Zellweger T, Ninck C, Bloch M, i sur. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer* 2005;113:619-28.
190. Mukherjee S, Richardson AM, Rodriguez-Canales J, i sur. Identification of EpCAM as a molecular target of prostate cancer stroma. *Am J Pathol* 2009;175:2277-87.
191. Varga M, Obrist P, Schneeberger S, i sur. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* 2004;10:3131-6.

192. Oberneder R, Weckermann D, Ebner B, i sur. A phase I study with adecatumumab, a human antibody directed against epithelial cell adhesion molecule, in hormone refractory prostate cancer patients. *Eur J Cancer* 2006;42:2530-8.
193. De Bono JS, Tolcher AW, Forero A, i sur. ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:7555-65.
194. Tsai H, Werber J, Davia MO, i sur. Reduced connexin 43 expression in high grade, human prostatic adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:64-9.
195. Umhauer S, Ruch RJ, Fanning J. Gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression in ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:999-1000.
196. Nomura S, Maeda K, Noda E, i sur. Clinical significance of the expression of connexin 26 in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:79.
197. Liu X, Furuya T, Li D, i sur. Connexin 26 expression correlates with less aggressive phenotype of intestinal type-gastric carcinomas. *Int J Mol Med* 2010;25:709-16.
198. Inose T, Kato H, Kimura H, i sur. Correlation between connexin 26 expression and poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2009;16:1704-10.
199. Conklin C, Huntsman D, Yorida E, i sur. Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Cancer Lett* 2007;255:284-94.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 26. travnja 1978. godine. Osnovnu školu i gimnaziju prirodoslovno-matematičkog smjera završio sam u Varaždinu.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 1996. godine, a diplomirao sam u lipnju 2002. godine. Pripravnički staž odradio sam u Općoj bolnici Varaždin tijekom 2003. godine.

Nakon položenog državnog ispita, u srpnju 2004. godine započeo sam specijalizaciju iz urologije za Opću bolnicu Varaždin.

U kolovozu 2009. godine položio sam specijalistički ispit iz urologije pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske.

Doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu upisao sam 2009. godine, a završio 2012. godine.

Aktivno sam i pasivno sudjelovao na domaćim i međunarodnim kongresima.

Autor sam i koautor više članaka i kongresnih priopćenja koji su objavljeni u indeksiranim časopisima od kojih su tri u Current Contentsu. Član sam Hrvatskog urološkog društva.

Oženjen sam i otac jednog djeteta.