

**УНИВЕРЗИТЕТ "СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ" – СКОПЈЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ**



**ЕКСПРЕСИЈА НА СТРОМАЛНИ МАРКЕРИ И
АНДРОГЕН РЕЦЕПТОР КАЈ БЕНИГНА
ПРОСТАТИЧНА ХИПЕРПЛАЗИЈА И
ПРОСТАТИЧЕН КАРЦИНОМ**

- ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА -

Автор: д-р сци. Вања Филиповски

Ментор: проф. д-р Весна Јаневска

Скопје, 2017

СОДРЖИНА

АПСТРАКТ	3
SUMMARY	6
1. ВОВЕД.....	9
1.1. Теорија на соматски мутации.....	11
1.2. Улога на стромата во простатичната карциногенеза.....	12
1.3. Улога на експресијата на Androgen Receptor кај стромалните клетки во развојот на простатата и простатична карциногенеза	13
1.4. Бенигна простатична хиперплазија	14
2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА СТУДИЈАТА.....	15
3. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ	16
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	17
4.1. МАТЕРИЈАЛ	17
4.2. МЕТОДИ	17
4.2.1. Хистохемиско бојење Trichrome Masson	17
4.2.2. Имунохистохемиска анализа	18
4.2.2.1 Стромални маркери: Vimentin, Desmin и α -Smooth Muscle Actin (α -SMA).....	18
4.2.2.2. Androgen Receptor (AR)	18
4.2.2.3 Клиничко-патолошки параметри.....	19
5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	21
6. РЕЗУЛТАТИ	22
6.1. Главни клиничко-патолошки параметри.....	22
6.2. Хистохемиско бојење Trichrome – Masson	24
6.3. Експресија на стромални маркери.....	26
6.4. Експресија на Androgen Receptor	41
7. ДИСКУСИЈА	55
7.1. Прогностички фактори кај простатичен карцином	55
7.2. Gleason-ов градуирачки систем.....	56
7.3. Стадиум на болест.....	58
7.4. Третман на простатичен карцином.....	59
7.5. Стромални маркери	63
7.5.1. Реактивна строма во простатична карциногенеза.....	63
7.5.2. Миофибробласт концепт	65
7.5.3. Заздравување на рана како аналогична за карциногенеза на строма	67
7.5.4. Стромални промени кај карцином на простатата и експресија на стромални маркери	67
7.6. Androgen Receptor (AR):	71
7.6.1. Стромален Андроген Рецептор (AR) во развој на простатата и простатична карциногенеза	71
7.6.2. Прогресивен губиток на AR експресија кај стромални клетки во транзиција од бенигнен кон малигнен тумор и во тек на прогресија на малигнен тумор“	72
7.6.3. Механизам на губиток на AR експресија во туморот.....	73
7.6.4. Експресија на Андроген Рецептор.....	74
8. ЗАКЛУЧОЦИ	81
9. РЕФЕРЕНЦИ	83

АПСТРАКТ

Вовед: Најголемиот број на простатични тумори се аденокарциноми кои потекнуваат од епителните клетки, кои ги обложуваат простатичните жлезди и простатичните изводни канали. Поради тоа до сега фокус на истражување на простатичната карциногенеза биле генетските оштетувања кои ги претрпуваат простатичните малигни епителни клетки, но се поголем е бројот на докази кои посочуваат дека промените во стромалната микросредина, асоцирани со малигниот епител на простатата може да бидат неопходни во прогресија на простатичната карциногенеза. Се претпоставува дека кај простатичниот карцином се нарушени интеракциите помеѓу стромата и епителот, односно настануваат промени не само кај епителните, туку и кај стромалните клетки, при што настанува губиток на контролата врз растот на епителните клетки што доведува до прогресија на простатичниот карцином.

Цел: Целта на оваа студија беше да се утврди постоење на стромални промени кај простатичните карциноми, користејќи хистохемиски и имунохистохемиски методи, односно да се утврдат квалитативни разлики во композицијата на простатичната строма кај бенигна простатична хиперплазија (ВРН) и простатичен карцином и овие разлики да се квантифицираат и корелираат.

Материјал и Методи: За ретроспективна анализа се користеа архивски парафински блокчиња, од примероци земени по направена радикална простатектомија кај 70 пациенти болни од простатичен карцином. Анализираниите примероци содржеа простатичен карцином и периферно од него подрачја на околна бенигна простатична хиперплазија. Овие примероци се обоија хистохемиски со бојењето Trichrome Masson и имунохистохемиски со антителата: Vimentin, α -smooth muscle Actin (α -SMA), Desmin и Androgen Receptor (AR).

Простатичната строма е анализирана посебно во зоните на бенигната простатична хиперплазија и во зоните на простатичниот карцином.

Прво се одреди интензитетот на бојењето Trichrome Masson во стромата на простатичниот карцином и бенигната простатична хиперплазија, а потоа се одреди експресијата и интензитетот на сигналот на антителата Vimentin, α -smooth muscle Actin (α -SMA) и Desmin во стромата на простатичниот карцином и бенигната простатична хиперплазија.

На крајот се одреди експресијата и интензитетот на сигналот за антителото Androgen Receptor во епителните и стромалните клетки кај бенигната простатична хиперплазија и простатичниот карцином.

Со цел квантификација на анализираниите податоци, кај хистохемиското бојење Trichrome Masson се евалуира интензитетот на пребојувањето, а за имунохистохемиските бојења Vimentin, Desmin и α -smooth muscle Actin (α -SMA) се користеше индекс на пребојување кој ги инкорпорира во себе процентот на обоени стромални клетки и интензитетот на сигналот, додека за Androgen Receptor се користеше хистолошки скор кој ги мери дистрибуцијата и интензитетот и на сигналот. Добиените резултати беа меѓусебно корелирани, а дополнително се направи и корелација со клиничко-патолошките параметри: диференцираноста на карциномот, локалната проширеност на болеста, стадиумот на болеста, возраста на пациентите и вредноста на предоперативното серумско ниво на простата специфичниот антиген (PSA).

За статистичка анализа на добиените резултати се користеа следниве методи: дескриптивни методи (просек, медијана), методи за тестирање на значајноста на разликите меѓу анализираните параметри (Chi-square test, Student-ов t test, Wilcoxon matched test, Analysis of Variance, Kruskal-Wallis ANOVA) и методи за одредување на корелација меѓу одредени параметри (Spearman-ов коефициент на ранг корелација и Pearson-ов коефициент на корелација).

За статистички сигнификантни се земаа вредностите $p < 0,05$ а за високо сигнификантни вредностите на $p < 0,01$.

Резултати: Хистохемиската анализа со боењето Trichrome Masson покажа статистички сигнификантна разлика (Chi-square=31,71 df=1 $p < 0,001$) во јачината на пребојуваето, која е поголема помеѓу стромалните клетки на карциномот на простатата во однос на стромалните клетки кај бенигната простатична хиперплазија.

Анализата на имунохистохемиското боење со антителото Vimentin покажа сигнификантно зголемена експресија (Chi-square = 45,55 df = 1 $p < 0,001$) во стромата на карциномот споредено со стромата кај бенигната простатична хиперплазија. Во стромата на простатичниот карцином Vimentin експресијата сигнификантно позитивно корелира со интензитетот на пребојувањето со хистохемиското боење Trichrome Masson ($R = 0,68$ $p < 0,001$), со градусот на туморот ($R = 0,35$ $p = 0,003$) и со локалната проширеност на болеста ($R = 0,28$ $p = 0,019$).

Анализата на имунохистохемиското боење со антителото Desmin покажа статистички сигнификантно (Chi-square = 117,89 df = 1 $p < 0,001$) намалена експресија во стромата кај простатичниот карцином во однос на стромата кај бенигната простатична хиперплазија. Во стромата на простатичниот карцином Desmin експресијата сигнификантно позитивно корелира со интензитетот на пребојувањето со хистохемиското боење Trichrome Masson ($R = 0,28$ $p < 0,02$) и со градусот на туморот ($R = 0,25$ $p = 0,035$).

Анализата на имунохистохемиското боење со антителото α -smooth muscle Actin (α -SMA) не покажа статистички сигнификантна разлика (Chi-square = 0,2 df = 1 $p = 0,65$) во однос на индексот на пребојување во стромата кај простатичниот карцином и стромата кај бенигната простатична хиперплазија. α -SMA експресијата во стромата на простатичниот карцином сигнификантно корелира со диференцираноста на туморот, односно Gleason скорот ($R = -0,35$ $p = 0,005$).

Анализата на имунохистохемиското боење со антителото Androgen Receptor покажа статистички сигнификантно помала експресија на Androgen Receptor во епителните клетки на простатичен карцином отколку кај епителни клетки на бенигната простатична хиперплазија ($p = 0,002$) и покажа сигнификантно помала експресија во стромалните клетки на простатичниот карцином во споредба со стромалните клетки кај бенигната простатична хиперплазија ($p < 0,01$).

Кај простатичниот карцином најдена е сигнификантна позитивна корелација на експресијата на Androgen Receptor меѓу стромалните клетки и епителните клетки ($R = 0,46$ и $p < 0,01$). Експресијата на Androgen Receptor покажа корелација меѓу експресијата во стромалните клетки на простатичниот карцином и Gleason скорот ($R = -0,44$ $p < 0,05$).

Заклучок: Реактивната карцином асоцирана строма покажува квалитативни и квантитативни разлики во однос на стромата кај бенигната простатична хиперплазија што се манифестира со појава на позитивно пребојување со боењето Trichrom Masson, со појава на позитивен сигнал за антителиото Vimentin и негативен сигнал за антителиото Desmin, односно со појава на карцином асоцирани миофибробласи. Количината на реактивна строма и степенот на диференцираност на стромата корелираат со градусот, T категоријата и стадиумот на болеста од што произлегува дека скорирање на стромалната компонента на простатичниот карцином може да претставува дополнителна алатка за одредување на агресивноста на карциномот.

Експресијата за антителиото Androgen Receptor опаѓа и кај епителните и кај стромалните клетки на простатичен карцином, при што падот на експресијата на Androgen Receptor кај стромалните клетки е поназначена. Експресијата на Androgen Receptor во стромата на простатичниот карцином сигнификантно корелира со Gleason-овиот градус на туморот, односно постои сигнификантен пад во експресијата на Androgen Receptor кај полошо диференцираните тумори.

Од горе кажаното произлегува дека интензитетот на пребојувањето со хистохемиското боење Trichrome Masson и индексот на пребојување со имунохистохемиските боења со антителиата Vimentin и Desmin може да се користат како градуирачки систем на стромата односно како дополнителни градуирачки системи на веќе етаблираниот Gleason-ов градуирачки систем, кој ја анализира епителната компонента на карциномот. Хистолошкиот скор за Androgen Receptor експресија во стромата на простатични карциноми исто така може да се користи како дополнителен градуирачки систем на веќе етаблираниот Gleason-ов градуирачки систем.

Резултатите од ова истражување укажуваат на тоа дека кај простатичниот карцином е неопходно да се анализира не само епителната туку и стромалната компонента на туморот бидејќи стромата како интегрален дел на простатичниот карцином учествува во иницијација и прогресија на болеста и одредени нејзини карактеристики може да се користат како прогностички фактори за прогресија на болеста.

Клучни зборови: простатичен карцином, карциногенеза, строма, Vimentin, α -smooth muscle Actin (α -SMA), Desmin, Androgen Receptor.

SUMMARY

Introduction: The majority of prostate tumors are adenocarcinomas which derive from the epithelial cells that form the prostate glands and prostate ducts. Accordingly, the focuses of investigations so far were genetic alterations of the malignant epithelial cells in the prostate cancer. Recently, there is mounting evidence that alterations in the stromal microenvironment, associated with malignant epithelium could be responsible for the progression of prostatic carcinogenesis. It is hypothesized that in prostate cancer the interactions between the stromal and epithelial compartments are compromised hence alterations are rendered in both epithelial and stromal cells. These alterations contribute to the loss of growth control in epithelial cells that leads to progression of prostate cancer.

Aim: The aim of this study is to establish existence of stromal changes in prostatic carcinoma using histochemical and immunohistochemical methods by measuring qualitative changes in the composition of the prostatic stroma in the benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma and by quantifying and correlating these results.

Material and Methods: A retrospective analysis was performed using archived paraffin blocks from samples of 70 cases of radical prostatectomy specimens in which a diagnosis of prostatic carcinoma was made. Adequate samples were chosen from the peripheral zones of prostatic carcinoma in order to correlate them with the surrounding areas of benign prostatic hyperplasia. These samples were stained with the histochemical stain Trichrome Masson and a subsequent immunohistochemical analyses were performed using the antibodies: Vimentin, α -smooth muscle Actin (α -SMA), Desmin and Androgen Receptor (AR).

The prostatic stroma was analyzed separately in the zones of benign prostatic hyperplasia and zones of prostatic cancer.

First, the staining intensity of the Trichrome Masson stain in the stroma of prostatic carcinoma and stroma of benign prostatic hyperplasia was analyzed and then the expression and the intensity of the signal for the antibodies Vimentin, α -smooth muscle Actin and Desmin in the stroma of prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia was analysed.

At the end the expression and the intensity of the signal for the antibody Androgen Receptor was analyzed in the epithelial and stromal cells of benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma.

In order to quantify the analyzed data for the histochemical stain Trichrome Masson, the intensity of the staining was evaluated and for the immunohistochemical stains Vimentin, Desmin and α -smooth muscle Actin (α -SMA) a staining index was used that incorporates percentage of stained stromal cells and the intensity of the signal. For Androgen Receptor a histological score was used that measures the distribution and the intensity of the signal and represents the percentage of stained cells for each staining intensity.

The data was correlated and an additional correlation was made with the following clinico – pathological parameters: tumor differentiation, local spread of the disease, stage of the disease, patient age and preoperative serum levels of the Prostate Specific Antigen (PSA).

For statistical analyses of the data the following methods were used: descriptive methods (average, median), methods of testing significance of differences among analyzed parameters (Chi-square test, Student t test, Wilcoxon matched test,

Analysis of Variance, Kruskal-Wallis ANOVA) and methods of determining correlation among designated parameters (Spearman coefficient of rang correlation and Pearson coefficient of correlation).

Statistically significant values were determined to be $p < 0,05$ and highly statistically significant values were determined to be $p < 0,01$.

Results: The histochemical analysis using Trichrome Masson stain showed statistically significant difference (Chi-square = 31,71 df = 1 $p < 0,001$) in staining intensity which is higher among stromal cells in prostatic carcinoma compared to stromal cells in benign prostatic hyperplasia.

The analysis of the immunohistochemical stain with Vimentin antibody showed significantly higher expression ($p < 0,001$) in the stroma of the prostatic carcinoma compared to the stroma in benign prostatic hyperplasia. In the stroma of the prostatic carcinoma Vimentin expression shows significantly positive correlation with Trichrome Masson histochemical stain ($R = 0,68$ $p < 0,001$), with tumor grade ($R = 0,35$ $p = 0,003$) and local spread of the disease ($R = 0,28$ $p = 0,019$).

The analysis of the immunohistochemical stain with Desmin antibody showed statistically significant (Chi-square = 117,89 df = 1 $p < 0,001$) lower expression in the stroma of prostatic cancer compared with the stroma in benign prostatic hyperplasia. In the stroma of the prostatic carcinoma Desmin expression shows significantly positive correlation with Trichrome Masson histochemical stain ($R = 0,28$ $p < 0,02$) and with tumor grade ($R = 0,25$ $p = 0,035$) and local spread of the disease ($R = 0,28$ $p = 0,019$).

The analysis of the immunohistochemical stain with α -smooth muscle Actin (α -SMA) antibody did not show statistically significant difference (Chi-square = 0,2 df = 1 $p = 0,65$) in staining intensity between stroma in prostatic carcinoma and stroma in benign prostatic hyperplasia. α -SMA expression in the stroma of prostatic carcinoma significantly correlated only with Gleason score ($R = -0,35$ $p = 0,005$).

The analysis of the immunohistochemical stain with Androgen Receptor showed significant lower expression in epithelial cells of prostatic carcinoma compared to epithelial cells of benign prostatic hyperplasia ($p = 0,002$) and significant lower expression in stromal cells of prostatic carcinoma compared to stromal cells of benign prostatic hyperplasia ($p < 0,01$). In the prostatic carcinoma a significant positive correlation of Androgen Receptor expression was found between stromal cells of prostatic carcinoma and epithelial cells of prostatic carcinoma ($r = 0,46$ $p < 0,01$). The expression of Androgen Receptor showed correlation between the stromal cells of prostatic carcinoma and Gleason score ($R = -0,44$ $p < 0,05$).

Conclusion: Carcinoma associated reactive stroma shows qualitative and quantitative differences compared to the stroma in benign prostatic hyperplasia with positive staining for the histochemical stain Trichrome Masson, with the emergence of expression of Vimentin antibody and with negative signal for Desmin antibody compatible to the appearance of carcinoma associated myofibroblasts. The amount of reactive stroma and the level of differentiation of the stroma correlate with Gleason grade, T category and stage of the disease which means that scoring of the stromal component of the prostatic carcinoma could represent an additional tool in determination of the aggressiveness of the prostatic carcinoma.

The expression of Androgen Receptor is reduced in the epithelial and stromal cells of prostatic carcinoma and the reduction of Androgen Receptor expression in the stromal cells is more pronounced. The expression of Androgen Receptor in stromal

cells of prostatic carcinoma significantly correlates with Gleason grade of the tumor meaning that there is significant drop in Androgen Receptor expression in poorly differentiated tumors.

Consecutively, the intensity of staining with the histochemical stain Trichrome Masson and the staining index with the immunohistochemical markers Vimentin and Desmin could serve as grading systems for the stroma as a complement to the well established Gleason grading system that analyzes the epithelial component of the prostatic carcinoma. The histological score for Androgen Receptor expression in the stroma of prostatic carcinoma could also serve as an additional grading system to the well established Gleason grading system.

The results of this study show that it is necessary in prostatic carcinoma to analyze not only the epithelial but also the stromal component of the tumor since the stroma, as an integral part of prostatic carcinoma, plays a role in initiation and progression of the disease and some of its characteristics might serve as prognostic factors in the progression of the disease.

Key words: prostatic carcinoma, carcinogenesis, stroma, Vimentin, α -smooth muscle Actin (α -SMA), Desmin, Androgen Receptor.

1. ВОВЕД

Карциномите на простатата, белодробното и дебелото црево се помеѓу најчестите малигноми дијагностицирани кај мажите во западниот свет. Најновите податоци покажуваат дека простатичниот карцином е најчесто дијагностицирана малигна неоплазма и втора водечка причина за смрт асоцирана со карцином кај мажите во Соединетите Американски Држави. Споредбено, простатичниот карцином е поредок во другите делови на Светот каде што е поголема инциденцата и/или степенот на mortalitet од други тумори, кои потекнуваат од оралната празнина, ждрелото и желудникот¹.

Повеќе од 95% од хуманите простатични карциноми се аденокарциноми кои потекнуваат од епителните клетки, кои ги обложуваат жлездите и дуктусите на простатата. Кај истите се одредуваат степени (градуси) на малигност според Gleason-овиот степенувачкиот систем, кој ги зема во предвид микроскопските и архитектуралните карактеристики на туморот. Се користат 5 морфолошки шеми на раст и притоа се одредуваат најчестата архитектурална шема на раст и втората по честота архитектурална шема на раст со што се добива Gleason-ов скор. Gleason скоровите од 2-6 одредуваат карциноми со низок степен на малигнитет или добро диференцирани карциноми (G1), Gleason скорот 7 одредува карциноми со среден степен на малигнитет или умерено диференцирани карциноми (G2), додека Gleason скоровите 8-10 одредуваат карциноми со висок степен на малигнитет или лошо диференцирани карциноми (G3). Gleason-овиот степенувачки систем е цврсто етаблиран како систем кој најдобро корелира со агресивноста на простатичниот карцином².

Покрај Gleason-овиот скор од особена важност за прогнозата на пациентите со карцином на простатата има и стадиумот на болеста. Стадиумот на болеста, односно стадиумот на простатичниот карцином, се одредува според препораките на “American Joint Committee on Cancer” (AJCC). Оваа организација развива системи за одредување на стадиуми за опишување на степенот на прогресија на болеста кај болните од рак при што го користи “TNM” скорирачкиот систем: T = големина на тумор, N = присуство на метастатски депозити во регионални лимфни јазли и M = присуство на далечни метастази.

Генерално простатичните карциноми се делат во 2 големи групи: локализирана болест кога болеста се наоѓа во стадиуми I и II и означува дека болеста е задржана во простатата (големина на тумор - pT1 и pT2) и напредната болест кога болеста се наоѓа во стадиуми III и IV и означува екстрапростатична екстензија на туморот односно ширење на туморот во околина на простатата преку пробивање на простатичната капсула (pT3a) или инфилтрација на туморот во семиналните везикули на простатата (pT3b) што одговара на стадиум на болеста III, или присуство на туморска инвазија во соседни органи (pT4), метастатски депозити во регионални лимфни јазли (pN1) и/или далечни метастази (M) што одговара на стадиум на болеста IV³.

Трет важен прогностички фактор кај простатичниот карцином претставува серумското ниво на простата специфичниот антиген. Простата специфичниот антиген (Prostate Specific Antigen – PSA) е гликопротеински ензим, член на фамилијата на каликреин сродни пептидази кој се секретира од страна на епителните клетки на простатичната жлезда. PSA се продуцира за во ејакулатот да изврши ликвифакција на спермата и овозможи слободно движење на сперматозоидите⁴ и исто така доведува до разложување на цервикалниот

мукус при што се овозможува влез на сперматозоидите во матката⁵. PSA е присутен во серумот на мажите со здрави простатични жлезди во мали количества, но често серумското ниво на PSA се покачува кај мажи со простатичен карцином како и со други простатични нарушувања, како што се воспаление на простатата или бенигна простатична хиперплазија⁶.

Серумското ниво на простата специфичниот антиген е третата варијабла со прогностичка моќ која се користи во таканаречените “ризик стратификациони системи”, кои имаат за цел пациентите со простатичен карцином да ги групираат во 3 групи за да се предвиди ризикот од неуспешна терапија (хируршка и радиолошка), или ризикот од повторна појава на болеста. Другите две варијабли како што погоре е веќе кажано се Gleason-овиот скор и стадиумот на болеста. Според овие три варијабли овој ризик се дели на: низок ризик: PSA < 10ng/mL, Gleason score 2 - 6 (G1), клинички стадиум T1 – T2a; умерен ризик: PSA 10 – 20ng/mL, Gleason score 7 (G2), клинички стадиум T2b/c; висок ризик: PSA > 20ng/mL, Gleason score 8 - 10 (G3), клинички стадиум T3 - T4⁷.

Простатичниот карцином е уникатен во однос на другите карциноми бидејќи е споро растечки малигном кој се дијагностицира ексклузивно кај мажи над 50 годишна возраст. Следствено, неопходно е 10 до 15 годишно следење на пациентите кога се одредува полза од терапија, споредено со 5 годишното следење на пациентите кај најголемиот број други малигноми¹. Така за индивидуални пациенти со други придружни болести (коморбидитети) треба да се земе во предвид возраста и очекуваната старост пред да се даде дефинитивен третман, односно да се земат во предвид коморбидитетите кои може да имаат поголемо влијание врз преживувањето кај пациентот, споредбено со преживувањето од простатичен карцином. Поради овој факт кај некои пациенти терапија не се спроведува. Во оваа група пациенти со простатичен карцином припаѓаат постари лица со други придружни болести како и пациенти со карцином со низок степен на малигнитет и мала големина на туморот. Оттука за оваа група пациенти “внимателно следење” станува можна терапија која е уникатна за простатичниот карцином, односно пациентите кои ги исполнуваат горенаведените услови (мала големина на туморот, низок степен на малигнитет и напредната возраст со коморбидитети) подлежат само на внимателно следење.

Доколку не се третира простатичниот карцином кај повеќето пациенти постои ризик од прогресија на болеста. Кај овие пациенти, бенефитот од локалниот третман во однос на периодот на отсуство на болеста и севкупното преживување мора да се балансира со несаканите ефекти асоцирани со соодветниот третман. Кај пациенти со фаворизирачки карактеристики на болеста, како ниско предоперативно серумско ниво на простата специфичниот антиген, низок клинички стадиум и добро или умерено диференциран тумор, периодот на отсуство на болест и севкупното 5 годишно преживување е одлично доколку се изведе радикална простатектомија, или радиотерапија како локален третман. Сепак, овие резултати не се толку добри кај пациенти со нефаворизирачки карактеристики на болеста. Поради појава на несакани ефекти, при користење на хирургија и конвенционална зрачна терапија (уринарна инконтиненција, ректални тегоби и импотенција, како и рани и доцни хируршки компликации) се истражуваат нови модалитети во третманот на простатичниот карцином кои би постигнале подобри резултати со помали несакани ефекти од третманот¹.

Поради ова, во светот се истражуваат специфичните биолошки карактеристики на простатичниот карцином со цел изнаоѓање на нови неинвазивни терапевтски стратегии. Традиционално, терапијата за сите епителни малигноми, вклучувајќи го и простатичниот карцином, е таргетирање на малигните епителни клетки. Поради генетската нестабилност овие клетки претставуваат подвижни цели за третман. Иако малигните стромални клетки се абнормални, прелиминарните студии, кои користат кариотипски анализи и компаративна генетска хибридизација, покажуваат дека овие клетки не поседуваат големи генетски алтерации. Така, тие може да претставуваат постационарни цели за третман на простатичниот канцер¹.

Ваквото сознание е особено важно и за пациентите кај кои според современите терапевтски препораки постои можност единствено за “активно следење” на карциномот на простатата¹.

1.1. Теорија на соматски мутации

Генерално се прифаќа како факт дека генските мутации се основата за процесот на карциногенеза. Бројни референци го поткрепуваат ова тврдење каде мутациите се директна причина на таканаречените спорадични карциноми кои опфаќаат околу 95% од хуманите малигни неоплазми⁸. Оваа пракса или поимање на карциногенезата е цврсто етаблирано во последните четири декади, но се повеќе се појавуваат нови идеи, кои ја доведуваат во прашање теоријата за соматски мутации⁸. Најчесто поставувани прашања се:

- Кои се овие мутации?

- Колку е нивната појава поврзана со малигна неоплазма?

- Кога настануваат мутациите и како се тие поврзани со конверзијата на претходно нормални во малигни неопластични ткива?

Еднакви одговори на овие сензитивни прашања не се добиваат⁹. Всушност, се поголем е бројот на скептиците кои ги искажуваат своите сомнежи за вредноста на теоријата на соматски мутации¹⁰⁻¹².

Два основни проблема во однос на оваа теорија се:

1. И покрај агресивните напори во лабораториите ширум светот, вклучително и со појавата на молекуларна биологија, оваа теорија не може да се зацврсти⁹.

2. Се поголем е бројот на податоци кои ја потенцираат улогата на ткивните интеракции во карциногенезата¹³⁻¹⁵.

Оваа скоро незабележлива промена, од клеточно во ткивно основана етиопатогенеза, не се вклопува лесно во очекувањата претпоставени од теоријата за соматски мутации.

Надмоќта на онкоген/репресорски (супресор) ген поимањето (последната инкарнација во теоријата за соматски мутации) во објаснувањето на карциногенезата е доведена во прашање повеќе пати,^{10,16,17}.

Наместо отфрлање на теоријата на соматски мутации како неточна се воведуваат корекции на моменталната теорија на соматски мутации со воведување на ткивно-сродни концепти. Како додаток на мутациите конечниот исход на малигниот неопластичен фенотип морал да ја приспособи улогата на стромално - епителните ткивни интеракции, со што се добива хибридна теорија за карциногенеза, која ги вклучува елементите на теоријата за соматски мутации и улогата на стромално-епителните интеракции во процесот¹⁸. Последната е

наречена и епигенетска теорија за карциногенеза и укажува на ткивно основани феномени поради модификации во епигенетска генска експресија.

Во последните години се поставени теоретски алтернативи на теоријата за соматски мутации, кои укажуваат дека карциногенезата треба да се смета како проблем на нормалната хистогенеза и ткивна репарација¹⁵. Еднакво важна за овој нов пристап е претпоставката дека пролиферацијата е основна состојба на клетките¹⁹. Ова гледиште е дијаметрално спротивно на теоријата за соматски мутации, каде мирната состојба е основна состојба на клетките кај повеќеклеточните организми. Оваа алтернативна теорија ги вклопува ткивата како цел на карциногените и пролиферацијата како основна состојба на клетките и се нарекува теорија за ткивна организација (Tissue Organization Field Theory, TOFT)⁸.

Одредени автори ја поткрепуваат оваа теорија со експериментални трудови каде во главно стромалната компонента на епително - стромалниот пар е одговорна за неопластичниот фенотип²⁰. Поддржувачите на теоријата на стромални мутации укажуваат на тоа дека фибробластите во стромата на карциномот можеби акумулирале мутации, кои ја афектираат функцијата на нормалните клетки и нормалните епителни клетки би биле под влијание на мутираните стромални клетки, при што би се однесувале на начин на кои се однесуваат вистинските малигни епителни клетки¹².

1.2. Улога на стромата во простатичната карциногенеза

Стромата е широк поим кој во себе вклучува голем број на клеточни типови (фибробласти, ендотелни клетки, мазно-мускулни клетки, макрофаги, маст клетки и одреден број на клетки кои минуваат низ микросредината преку крвните и лимфните садови) како и компонентите на екстраклеточниот матрикс.

Најчести клетки во стромалниот компартман на простатата се мазно-мускулните клетки кои потекнуваат од мезенхимот на ембрионалниот урогенитален синус. Покрај тоа што се најчест клеточен тип мазно-мускулните клетки изгледа дека се и најважен клеточен тип во однос на простатичниот развој и одржување на хомеостазата. Земајќи го ова во предвид, промени во мазно-мускулните клетки може да се важни во еволуција на простатична карциногенеза¹.

Кај возрасните, простатичните мазно-мускулни клетки, кои експресираат Androgen Receptor (AR) реагираат со епителните клетки и под андрогена контрола го одржуваат епителот во потполно диференцирана мирна состојба. Ова се случува и во присуство и во отсуство на епителна експресија на Androgen Receptor со што се потенцира паракрината природа на мазно-мускулно – епителните интеракции¹.

Диференцијацијата на простатичната мазно-мускулатура се јавува на точно одреден начин, со секвенцијална експресија на карактеристични маркери вклучувајќи Vimentin, Actin, Myosin, Desmin и Vinculin. Губитокот на маркерите, кај експериментални животни по кастрација, се јавува во точно спротивна насока од појавата на маркерите кај простатата во развој¹. Конечно простатичната строма кај кастрирани животни се претвора во строма која содржи фибробласти или мезенхимални клетки кои коекспресираат Androgen Receptor и Vimentin со само минимална експресија на карактеристични мазно-мускулни маркери кај простатата која е во потполна регресија. Доколку повторно се дадат егзогени андрогени кај долготрајно кастрирани животни,

простатичното ткиво ќе одговори на високо координиран начин, повторно со појава на високо диференцирани стромални мазно-мускулни маркери и со епителна пролиферација¹.

Како заклучок, ниските нивоа на циркулирачки андрогени делуваат на мезенхималните клетки на простатата во развој за да индуцираат простатична епителна пролиферација и диференцијација. Обратно, високите циркулирачки нивоа на андрогени кај возрасните делуваат преку простатичната мазно-мускулатура да одржат потполно развиен мирен простатичен епител. Пролиферативните ефекти на стромата врз епителот се посредуваат преку стромален Androgen Receptor додека епителниот Androgen Receptor изгледа е неопходен само за експресија на простатични секреторни протеини¹.

Се е поголем бројот на докази кои укажуваат на тоа дека како што се развива карциномот така се јавуваат промени во стромалната средина поврзани со туморот. Во многу случаи овие промени можат да го зголемат инвазивниот и/или малигниот потенцијал на епителниот тумор. Се претпоставува дека епигенетските влијанија кои потекнуваат од стромалните клетки, во непосредна близина на простатичниот тумор, може да се критични во одредување дали некој тумор добива споро растечки или агресивен фенотип. Можно е по настанати генетски промени на простатичниот епител сигнализирањето од епителот кон околните мазно-мускулни клетки да стане нарушено. Тоа може да доведе до стромална дедиференцијација во правец кон фибробластен фенотип. Една консеквенца на ваквата трансформација може да биде промена во локалната микросредина, од промовирање на епителна хомеостаза кон промовирање на епителна митогенеза. Овие промени би довеле до епителна пролиферација, миграција и конечно би го зголемиле инвазивниот потенцијал на генетски алтерирани епителни клетки¹.

1.3. Улога на експресијата на Androgen Receptor кај стромалните клетки во развојот на простатата и простатична карциногенеза

Циркулирачките андрогени посредуваат во развојот и функцијата на простатата со активација на Androgen Receptor (AR). Повеќе студии покажале дека во AR во стромата е експресиран во мезенхималните клетки на урогениталниот синус, особено мезенхималните клетки во непосредна близина на епителот, во зоните каде се создаваат простатичните пупки. Како што се развива простатата и мезенхималните клетки диференцираат во мазно-мускулни клетки, експресијата на AR станува широко распространета, но не дифузно, низ целата мускулатура. Во минатото, истражувачите воглавно се фокусирале на испитување на функцијата на епителниот AR во простатата. Многу малку податоци се достапни за експресијата и функцијата на стромалниот AR во развојот на простатичниот карцином. Некои автори сметаат дека AR кај стромалните клетки е инволвиран во простатичниот развој и простатичната карциногенеза, со посебни функции во овие два процеса²¹.

Улогата на AR во простатичниот развој, функција и одржување на ткивна диференцијација е добро утврдена^{21,22}. AR игра критична улога во развојот на простатата преку регулација на андрогените ефекти на епителните клетки, односно нивен развој и диференцијација. Оваа активност во најголем дел се смета дека е резултат на паракрина сигнализација независно од присуство на епителни AR. Постои преминација на мезенхимална AR експресија во тек на

феталниот период додека AR експресијата кај епителните клетки е присутна во матурациониот пост-натален период²¹.

Споредено со нормална простата, најдено е дека експресијата на AR кај мезенхималните клетки опаѓа во раните стадиуми на болеста, уште при појава на висок градус простатична интраепителна неоплазија²³. Се покажал губиток на AR експресија линеарно со појава на карцином од повисоки градуси²³.

1.4 Бенигна простатична хиперплазија

Простатичната жлезда е единствен внатрешен орган кој продолжува да се зголемува кај возрасните мажи континуирано дури и по завршување на пубертетот кога постои нагло зголемување на нивото на циркуирачките андрогени во крвта. Бенигната простатична хиперплазија (Benign prostatic hyperplasia - BPH) е болест која се карактеризира со прогресивна дисконтинуирана хиперплазија на жлездените епителни клетки на простатата и стромалните клетки на простатата што доведува до зголемување на простатичната жлезда и појава на клинички симптоми^{24,25,26}.

Бенигната простатична хиперплазија претставува најчеста уролошка болест кај возрасни мажи и се јавува кај околу 25 проценти од мажите на возраст над 50 годишна возраст, 33 проценти од мажите над 60 годишна возраст или 50 проценти од мажите над 80 годишна возраст²⁶.

Бенигната простатична хиперплазија започнува во периуретралните подрачја хистолошки со појава на периуретрални нодули составени од строма, епител или мешавина на строма и епител²⁴. BPH започнува како проста микронодуларна хиперплазија и еволуира во макроскопско нодуларно зголемување кое постепено се претвора во клинички ентитет²⁶.

Прецизна молекуларна етиологија за процесот на бенигна простатична хиперплазија не е откриена. Зголемениот број на клеточни елементи може да е резултат на епителна и стромална пролиферација или неадекватна апоптоза. Се смета дека во настанокот на бенигната простатична хиперплазија учествуваат естрогени, андрогени, стромално-епителни интеракции, фактори на раст, поединечно или во комбинација^{25,26}.

Реактивни промени во стромата кај бенигна простатична хиперплазија се појавуваат во подрачја на хронична инфламација каде се појавува и реактивна строма слична на строма во процес на заздравување на рана, но не е јасно дали инфламаторниот процес е зависен или независен од постоењето на бенигната простатична хиперплазија^{25,26}.

Иако простатичен карцином и бенигна простатична хиперплазија често коегзистираат во исто простатично ткиво бидејќи се јавуваат кај повозрасни пациенти не е најдена етиолошка поврзаност помеѓу овие два процеса²⁷.

2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА СТУДИЈАТА

Досега традиционално во Светот малигните неоплазми од епително потекло, како простатичниот карцином се истражуваа и третираа единствено во склоп на теоријата за соматски мутации при што се испитуваа единствено малигните епителни клетки. Во последните години, со откривање на важната улога на стромата и стромално – епителните интеракции во карциногенезата постои револуција во истражувањето на причините за појава и третман на карциномите при што фокусот се пренасочува кон стромалната компонента на карциномите. Притоа се утврдуваат карактеристиките на малигно алтерираната строма со цел да се изнајдат начини за подобро разбирање на простатичната карциногенеза, утврдување на прогресијата и агресивноста на неоплазмата и евентуално одредување на нови терапевтски модалитети.

3. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

1. Да се одреди имунохистохемскиот профил на стромата кај бенигна простатична хиперплазија и кај простатичен карцином.

а) Да се направи корелација помеѓу стромата кај бенигна простатична хиперплазија и простатичен карцином, односно да се корелира интензитетот на пребојувањето на Trichrome Masson и интензитетот на сигналот на антителата Vimentin, α -smooth muscle Actin (α -SMA) и Desmin кај стромата на бенигна простатична хиперплазија и стромата на простатичен карцином.

б) Да се утврди и квантифицира присуството на миофибробласти во стромата кај бенигна простатична хиперплазија и простатичен карцином.

в) Да се направи корелација на промените во стромата кај простатичен карцином со клиничко патолошките параметри: возраст на пациентот, предоперативното серумско ниво на простата специфичниот антиген (PSA), локалната проширеност на болеста (Т категоријата), стадиумот на болеста и градусот на туморот.

2. Да се одреди Androgen Receptor експресијата кај епителните клетки и кај стромалните клетки на бенигна простатична хиперплазија и простатичен карцином

а) Да се утврди и квантифицира експресијата на Androgen Receptor кај стромалните и епителните клетки кај бенигната простатична хиперплазија и простатичен карцином.

б) Да се направи корелација на експресијата на Androgen Receptor кај епителните клетки на бенигна простатична хиперплазија и простатичен карцином.

в) Да се направи корелација на експресијата на Androgen Receptor кај стромалните клетки на бенигна простатична хиперплазија и простатичен карцином.

г) Да се направи корелација на експресијата на Androgen Receptor кај стромалните и епителните клетки на бенигна простатична хиперплазија и простатичен карцином со клиничко патолошките параметри: возраста на пациентот, предоперативното серумско ниво на простата специфичниот антиген (PSA), локалната проширеност на болеста (Т категоријата), стадиумот на болеста и градусот на туморот.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1. МАТЕРИЈАЛ

Студијата се изработи во Хистопатолошката лабораторија на Клиничката болница Ацибадем – Систина во Скопје во согласност со принципите и стандардите за добра лабораториска пракса.

Студијата претставува ретроспективна анализа на веќе постоечкиот архивски материјал во Хистопатолошката лабораторија на Клиничката Болница Ацибадем - Систина.

Материјалот на ова истражување опфаќа 70 пациенти со карцином на простата, кај кои е направена радикална простатектомија поради дијагностициран карцином на простата. Анализираниот група е унифицирана со тоа што кај сите пациенти е дијагностициран ацинарен тип на простатичен аденокарцином, кај сите е спроведена терапија радикална простатектомија со лимфаденектомија и кај ниту еден од нив не се евидентирани метастатски депозити во доставените регионални лимфни јазли.. Од тука произлегува дека сите пациенти вклучени во оваа студија се со категорија N0 и M0 и пациентите спаѓаат во патолошки стадиум I, II, III и IV соодветно на категоријата T и Gleason-овиот скор.

Оперативниот материјал на сите 70 пациенти е целосно вкалапен за рутинска хистолошка обработка и за поставување на медицинска дијагноза.

Од архивата на целосно вкалапеното простатично ткиво за потребите на оваа студија се одбра по еден примерок на кој се наоѓаше ткиво на простатичен карцином со околно ткиво од бенигна простатична хиперплазија, односно се одбра по еден примерок каде има релативно подеднаква застапеност на зони на бенигна простатична хиперплазија и простатичен карцином и посебно се анализираа подрачјата на бенигна простатична хиперплазија и подрачјата на простатичен карцином.

4.2. МЕТОДИ

4.2.1. Хистохемиско боење Trichrome Masson

Како почетна стапка при анализа на стромата на ВРН и простатичен карцином и како помошна метода на следствената имунохистохемија се искористи хистохемиско боење Trichrome Masson кое традиционално во патологијата се користи за разликување на мускулното од колагеното сврзно ткиво²⁸. Со хистохемиско боење Masson - Trichrome простатичните мазномускулни клетки кај нормалното простатично ткиво и бенигната простатична хиперплазија се бојат со црвена боја а клетките на реактивната тумор асоцирана строма на простатичен карцином се бојат сино²⁸.

Материјалот беше стандардно обработен за нови Хематоксилин -Еозин пресеци и хистохемиско боење Trichrome Masson.

Кај простатичните карциноми, стромата се анализираше на 5 последователни видни полиња, започнувајќи од поле со најинтензивна сина боја на големо зголемување (x 400). Анализираниот подрачја претходно се селектираа на мало зголемување и се одбележија на препаратот. Интензитетот на

пребојувањето со хистохемиското боење Trichrome Masson, односно количината на карцином асоцираните фибробласти (миофибробласти) семиквантитативно се одреди на следниов начин: негативно пребојување 0, слабо сино пребојување 1, умерено сино пребојување 2 и јако сино пребојување 3²⁸⁻³⁰.

Стромата кај ВРН се анализираше на идентичен начин со почеток од најинтензивно црвено пребоено поле.

4.2.2. Имунохистохемиска анализа

4.2.2.1 Стромални маркери: Vimentin, Desmin и α -Smooth Muscle Actin (α -SMA).

Како примарното антитело за детекција на Vimentin беше употребено глувчешко моноклонално антитело - clone V9, IgG₁ класа, (DAKO) со разредување од 1:100.

Како примарното антитело за детекција на Desmin беше употребено глувчешко моноклонално антитело - clone D33, IgG₁ класа, (DAKO) со разредување од 1:50.

Како примарното антитело за детекција на Smooth Muscle Actin (α -SMA) беше употребено глувчешко моноклонално антитело - clone HNF35, IgG₁ класа (DAKO) со разредување од 1:100.

За визуелизација на врзаните антитела се употреби визуализационен систем DAKO REALTM En VisionTM Detection System. Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse.

Позитивен сигнал за стромалните маркери Vimentin, Desmin и α -SMA претставува цитоплазматско пребојување на стромалните клетки.

Со цел да се квантифицира интензитетот на пребојувањето на стромалните клетки (миофибробласти или карцином асоцирани фибробласти) кај бенигната простатична хиперплазија и простатичниот карцином се одреди процентот на стромални клетки кои беа позитивни на боењето Vimentin, Desmin и α -SMA, а анализата се изведе на 5 последователни полиња за секое антитело на големо зголемување, започнувајќи од подрачјето на најинтензивен сигнал (x 400). Се направи скала за скорирање на фреквенција на позитивно пребоени клетки од 0 до 3: со 0 се означува 0% позитивни стромални клетки, со 1 се означува 1-33% позитивни стромални клетки, со 2 се означува 34-66% позитивни стромални клетки и со 3 се означува стромални клетки со позитивитет над 67%.

Се одреди и интензитетот на сигналот од 0 до 3: со 0 се означува непостоење на сигнал, со 1 се означува видлив сигнал на големо зголемување (x 400), со 2 се означува видлив сигнал на средно зголемување (x 100) и со 3 се означува видлив сигнал на мало зголемување (x 40). Потоа се помножи процентот на позитивни клетки и интензитетот на сигналот за да се добие индекс на пребојување: 0 = нема сигнал, 1 - 2 = низок индекс на пребојување, 3 - 4 = умерен индекс на пребојување и 6 - 9 = висок индекс на пребојување²⁸⁻³⁰.

4.2.2.2. Androgen Receptor (AR)

Како примарното антитело за детекција на Androgen Receptor беше употребено глувчешко моноклонално антитело - clone AR441 (DAKO), изотип IgG1 капа со разредување од 1:50.

За визуелизација на врзаното антителио се употреби визуализационен систем DAKO REALTM En VisionTM Detection System. Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse.

Позитивен сигнал за Androgen Receptor (AR) претставува нуклеарно пребојување кое се гледа и кај стромалните и кај епителните клетки во двете промени на простатата односно во ВРН и во простатичниот карцином.

Со оглед на хетерогеноста на сигналот примероците обоени за AR се набљудуваа на мало зголемување (x 40) за да се најде подрачје на најинтензивен сигнал. Потоа на големо зголемување (x 400) во подрачјето на најинтензивен сигнал се броеја најмалку 100 епителни и 100 околни стромални клетки. Бројот на позитивни јадра се прикажа како процент од вкупниот број на изброени јадра.

Интензитетот на сигналот беше субјективно градуиран на скала од 0 до 3, каде 0 = нема сигнал, 1 = слаб сигнал, 2 = умерен сигнал и 3 = јак сигнал.

Со оглед на хетерогеноста на сигналот се конструира хистолошки скор (H-SCORE) кој ги мери и интензитетот и дистрибуцијата на пребојувањето користејќи формула. Формулата е користена на следниов начин: [3 (силен сигнал)] x [процент на клетки со јак сигнал] + [2 (умерен сигнал) x процент на клетки со умерен сигнал] + [1 (слаб сигнал) x процент на клетки со слаб сигнал].

При тоа се добива збир во опсег од 0 до 300, кога збирот е 0 ако нема обоени клетки и збирот е 300 кога сите клетки (100%) се обоени и покажуваат силен интензитет на сигналот.

Пример: 33% од клетките се со сигнал 3
 33% од клетките се со сигнал 2
 34% од клетките се со сигнал 1

Збирот на овие изнесува 199 и претставува H-SCORE

Оваа семиквантитативна анализа за детално одредување на AR во простатичното ткиво се покажала како анализа со мала интерообсервер и интраобсервер грешка, и е прифатена од повеќе автори кои истражувале во истата област^{23,31,32}.

Во оваа студија хистолошкиот скор дополнително се пресметуваше како процент од максималниот претпоставен скор 300.

Ако AR во нормалната простата, односно ВРН како аналогот на нормална простата е изразен со цел да ја одржува простатичната хомеостаза во мирна, стабилна и контролирана состојба, тогаш 100% експресија на андроген со силен сигнал може да се смета за единица мерка на Androgen Receptor во идеална состојба на мирна простатата. Од тука промените во Androgen Receptor експресијата (помали од 300) би можеле да се изразуваат во процент од максималната експресија, со цел поточно да се одреди количеството на Androgen Receptor во простатата, односно поточно да се одреди промената која се случува во ткивото во однос на Androgen Receptor. Затоа во оваа студија резултатите за Androgen Receptor се прикажани и како проценет од максималниот хистолошки скор (односно идеално претпоставена максимална експресија на мирна простата).

4.2.2.3 Клиничко-патолошки параметри

Во нашата студија се користеа клиничко-патолошките параметри: возраст на испитаниците, Gleason-овит градус, T категоријата како аналогија на

стадиумот на болеста односно локалната проширеност на болеста или присуството и отсуството на екстрапростатична екстензија на простатичниот карцином и предоперативното серумско ниво на простата специфичниот антиген (PSA).

Возраста на испитаниците беше стратифицирана во возрастни групи под 60 годишна возраст, од 60 - 65 годишна возраст, од 65 - 70 годишна возраст и над 70 годишна возраст.

Gleason-овиот градус беше стратифициран во 3 групи: добро диференцирани простатични карциноми (G1) во кои Gleason-овиот скор изнесуваше 2 - 6 (Gleason score 2 - 6), умерено диференцирани простатични карциноми (G2) во кои Gleason-овиот скор изнесуваше 7 (Gleason score 7) и лошо диференцирани простатични карциноми (G3) во кои Gleason-овиот скор изнесуваше 8 - 10 (Gleason score 8 - 10).

Gleason-овиот градус беше дополнително стратифициран во 5 групи: Gleason grade group 1 (Gleason score 3+3), Gleason grade group 2 (Gleason score 3+4), Gleason grade group 3 (Gleason score 4+3), Gleason grade group 4 (Gleason score 4+4) и Gleason grade group 5 (Gleason score 4+5; 5+4; 5+5)

T категоријата беше одредена според pTNM категоризацијата на простатичниот карцином (AJCC 2010) што одредува големина на тумор или локална проширеност на простатичниот карцином. pT категоријата вклучува неколку групи како:

pT2a категорија – карцином локализиран на ниво на простатата во еден лобус од простатата во под 50% од волуменот на лобусот.

pT2b категоријата – карцином локализиран на ниво на простатата во еден лобус на простатата во над 50% од волуменот на лобусот.

pT2c категоријата - карцином локализиран на ниво на простатата во двата лобуса од простатата.

pT3a категорија – карцином кој покажува екстрапростатична екстензија со пробив на простатичната капсула.

pT3b категорија - карцином кој покажува екстрапростатична екстензија со инфилтрација во семиналните везикули.

Со оглед дека во анализирање 70 случаи од оваа серија немаше присуство на метастатски депозити во регионални лимфни јазли, далечни лимфни јазли, или далечни органи овие категории корелираа со стадиумите на болеста II и III при што категориите pT2a, pT2b и pT2c покажуваа локализирана болест, или простатичен карцином без екстрапростатична екстензија што соодветствува на стадиум на болеста II додека категориите pT3a и pT3b покажуваа локално напредната болест или простатичен карцином со екстрапростатична екстензија што соодветствува на стадиум на болеста III.

Предоперативното серумско ниво на простата специфичниот антиген (PSA) беше од историјата на болеста превземен клинички податок по направена рутинска биохемиска анализа пред изведување на хируршката операција односно радикална простатектомија изразено во нанограми на милилитар (ng/mL). Вредностите на PSA беа стратифицирани во четири групи и тоа вредности од 0 - 4 ng/mL, вредности од 4 - 10 ng/mL, вредности од 10 - 20 ng/mL и вредности над 20 ng/mL.

Овие клиничко патолошки параметри беа корелирани со податоците од нашата анализа односно со интензитетот на пребојувањето во стромата на бенигната простатична хиперплазија и стромата на простатичниот карцином со хистохемиското бојење Trichrom Masson, со индексот на пребојувањето во

стромата на бенигната простатична хиперплазија и стромата на простатичниот карцином, добиен од анализата на експресијата на стромалните маркери Vimentin, Desmin и α -smooth muscle Actin (α -SMA) и со хистолошкиот скор во епителот и стромата на бенигната простатична хиперплазија и епителот и стромата на простатичниот карцином добиен од анализата на експресијата на Androgen Receptor (AR).

5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

За статистичка анализа на добиените резултати се направи база во програмот SPSS for Windows 17,0. Се користеа следните статистички методи:

1. Дескриптивна статистика, односно мерки за централна тенденција (просек, медијана) за опишување на квантитативните податоци, апсолутни и релативни броеви за квалитативните податоци.

2. За тестирање на значајноста на разликите меѓу анализираните параметри, се користеа параметарски и непараметарски методи за зависни примероци (Chi-square test, Student-ov t test, Wilcoxon matched test, Analysis of Variance, Kruskal-Wallis ANOVA).

3. За одредување на корелацијата меѓу одредени параметри, се користеа непараметарски и параметарски методи (Spearman-ов коефициент на ранг корелација, Pearson-ов коефициент на корелација).

За статистички сигнификантни се земаа вредностите на $p < 0,05$, а за високо сигнифиикантни се земаа вредностите на $p < 0,01$.

6. РЕЗУЛТАТИ

6.1. Главни клиничко-патолошки параметри

Во табела 1 прикажана е дистрибуцијата на простатичните карциноми, во однос на локалната проширеност на болеста - T категорија и соодветниот стадиум на болеста, аналоген на локалната проширеност на неоплазмата.

Како што се може да се види на табелата, нема испитаници кај кои болеста е дијагностицирана во pT2b локална проширеност, додека кај најголем дел од испитаниците болеста е присутна во pT3b категоријата - 30 (42,86%) случаи.

Во однос на стадиумот на болеста се гледа дека 38,57% од случаевите припаѓаат на стадиум II (со локализирана болест на ниво на простатата, N0 M0) додека 61,43% од случаевите припаѓаат на стадиум III на простатичен карцином (локално напредната болест - екстрапростатичната екстензија N0,M0).

Табела 1. Дистрибуција на пациентите според T категоријата на болеста и стадиум на болеста

N = 70 (%)	pT	Стадиум на болеста
5 (7,14%)	pT2a	II 27 (38,57%)
0 (0%)	pT2b	
22 (31,43%)	pT2c	
13 (18,57%)	pT3a	III 43 (61,43%)
30 (42,86%)	pT3b	

Пациентите вклучени во ова истражување беа на возраст од 50 до 87 години. Просечната возраст на оваа серија испитаници е $67,66 \pm 7,4$ години, при што најголем број и процент на испитаници – 27 (38,6%) се на возраст постара од 71 години (Табела 2)

Табела 2. Возрасна дистрибуција на испитаниците

Возраст (години)	N = 70 (%)
≤60	10 (14,29%)
61 – 65	19 (27,14%)
66 – 70	14 (20,0%)
>71	27 (38,57%)
mean±SD, rang	67,66 ± 7,4 50 - 87

Предоперативната просечна вредност на PSA изнесува $18,8 \pm 23,2$ ng/ml, најниската измерена вредност е 1,51 ng/ml, максималната вредност е 150 ng/ml; пресметаната медијана, односно средна вредност од 11 ng/ml покажува дека 50% испитаници имаат PSA поголем од 11 ng/ml, додека половина испитаници имаат вредност на PSA пониски од 11 ng/ml.(Табела 3)

Табела 3. Предоперативни вредности на PSA

PSA (ng/ml)	N = 66 (%)
≤ 4	3 (4,55%)
4,1 – 10	28 (42,42%)
10,1 – 20	21 (31,82%)
> 21	14 (21,21%)
mean±SD, median, rang	18,8 ± 23,2 11,0 (1,51 – 150)

Во групата испитаници со pT категорија 3a, просечната возраст е најмала и изнесува $65,77 \pm 6,4$ години, во групата со категорија pT2a и pT3b просечната возраст е највисока $68,0 \pm 3,9$ и $68,63 \pm 8,0$ години последователно. Статистичката анализа покажа дека просечната возраст меѓу испитаниците со различен локален раст на простатичниот карцином е несигнификантна, односно незначајна. ($F = 0,46$ $p = 0,7$) (Табела 4).

Табела 4. Дистрибуција на T категоријата според возраст

pT	N	Descriptive Statistics – возраст (години)	
		mean ± SD	minimum - maximum
pT2a	5	$68,0 \pm 3,9$	62 - 72
pT2c	22	$67,36 \pm 7,8$	50 – 87
pT3a	13	$65,77 \pm 6,4$	52 - 74
pT3b	30	$68,63 \pm 8,0$	55 - 85
Тестирани разлики		Analysis of Variance $F = 0,46$ $p = 0,7$ NS*	

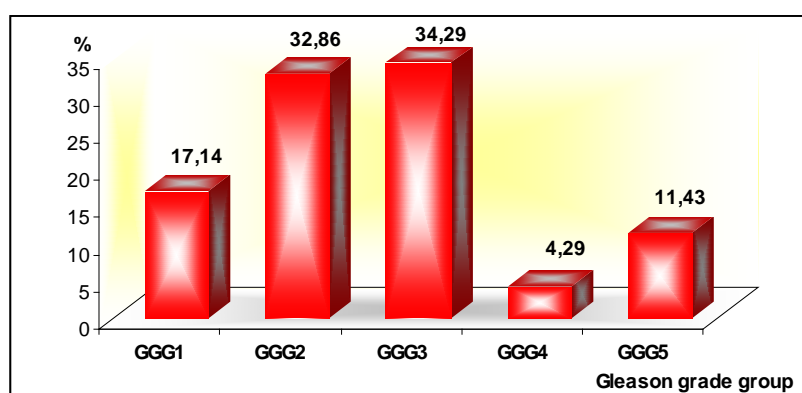
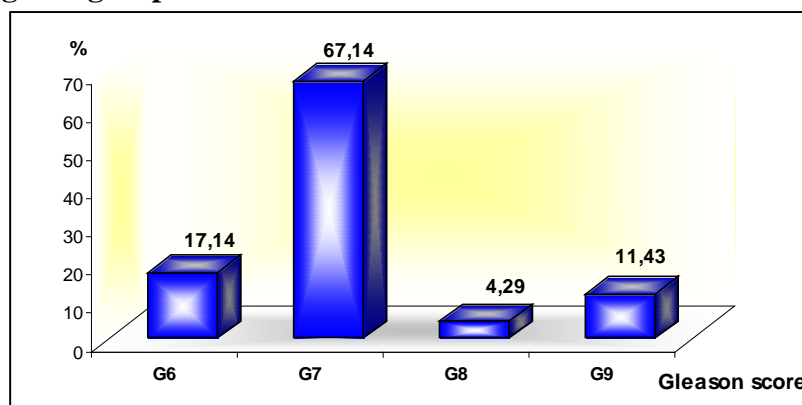
* несигнификантно

Анализата на простатичните карциноми во однос на диференцираноста, односно хистолошкиот Gleason скор покажа дека добро диференцирани се 17,14% тумори, умерено диференцирани се 67,14%, додека лошо диференцирани тумори се 15,71%. Во однос на Gleason grade group најголем број пациенти се наоѓаат во групите GGG2 и GGG3 (Табела 5, Слика 1)

Табела 5. Дистрибуција на испитаниците во однос на Gleason скор и во однос на Gleason-ов градус група (Gleason grade group - GGG)

Gleason score (G)	N = 70 (%)
G1 (≤6)	12 (17,14%)
G2 (7)	47 (67,14%)
G3 (> 8)	11 (15,71%)
mean±SD, median, rang	6,99 ± 0,6 7,0 (6 – 8)
Gleason grade group (GGG)	N=70 (%)
GGG 1	12 (17,14)
GGG 2	23 (32,86)
GGG 3	24 (34,29)
GGG 4	3 (4,29)
GGG 5	8 (11,43)

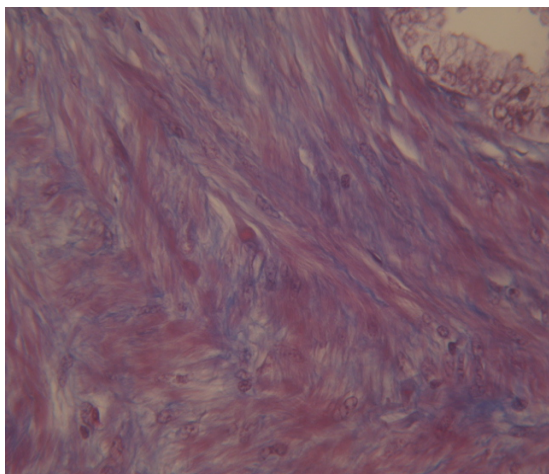
Слика 1. Дистрибуција на испитаници во однос на Gleason скор и Gleason grade group



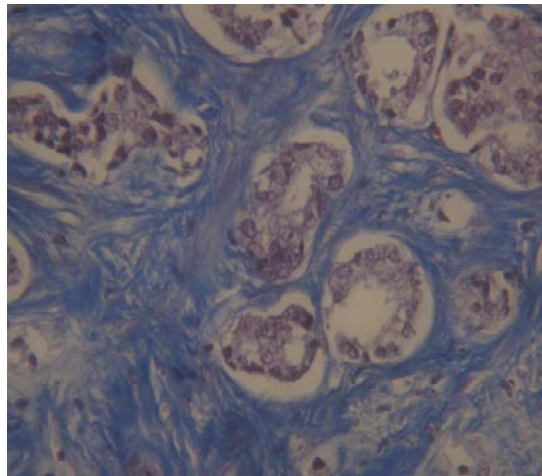
6.2. Хистохемиско боење Trichrome – Masson

Иницијално простатичната строма беше евалуирана користејќи го хистохемиското боење Trichrome Masson кое диференцира простатични мазно-мускулни клетки од други стромални клеточни типови и колагени влакна. Стромата кај бенигната простатична хиперплазија покажа мешавина од црвено пребоени мазно-мускулни клетки и сино пребоени колагени влакна и фибробласти (Слика 2). Обратно, стромата кај простатичните карциноми се пребојува преодминантно сино со многу мало црвено пребојување (Слика 3). Иако изолирани мазно-мускулни клетки беа присутни во некои случаи, ова сино пребојување беше конзистентно асоцирано со подрачја на карцином и тоа укажа на губиток на типични мазномускулни клетки и покачено ниво на колагени влакна во стромата на простатичниот карцином. Промената во боењето покажува дека стромалната микросредина во простатичниот карцином е алтерирана поради што се направија дополнителни анализи на имунохистохемиско ниво за да се испитаат специфичните стромални маркери кај реактивната строма на простатичниот карцином.

Слика 2



Слика 3



Слика 2: Црвено пребојување на стромата кај ВРН (Trichrome Masson x 400)

Слика 3: Сино пребојување на стромата кај простатичен карцином (Trichrome Masson x 400)

Во табела 6 прикажана е дистрибуцијата на модалитетите на јачината на пребојувањето во стромата на простатичен карцином и во стромата кај бенигна простатична хиперплазија за Trichrome Masson бојењето.

Од прикажаната дистрибуција се забележува дека со овој начин на прикажување на реактивната строма, количината на реактивната строма (интензитетот на пребојувањето) е најчесто 2 во стромата на простатичниот карцином, односно 44,28%, додека во стромата на ВРН најчесто застапена количина на реактивна строма (интензитет на пребојување) е 1, односно 70%.

Табела 6. Дистрибуцијата на модалитетите на интензитетот на пребојување на Trichrome - Masson бојењето кај простатичен карцином и ВРН

Интензитет на пребојување во строма	Карцином N (%)	ВРН N (%)
0	0	0
1	11 (15,71%)	49 (70,0%)
2	31 (44,28%)	20 (28,57%)
3	28 (40,0%)	1 (1,43%)

Тестираната разлика за јачината на сигналот за Trichrome бојењето, меѓу стромалните клетки на карциномот и стромалните клетки на бенигната хиперплазија статистички е сигнификантна (Chi-square=31,71 df=1 p<0,001). Trichrome Masson бојењето има значајно поголем интензитет на сино пребојување во стромата на карциномот споредено со стромата на бенигната простатична хиперплазија. Така кај 40% од случаите за Trichrome Masson интензитетот на пребојувањето изнесуваше 3 во стромалните клетки на карциномот, наспроти само 1,43% во стромалните клетки на ВРН (Табела 7).

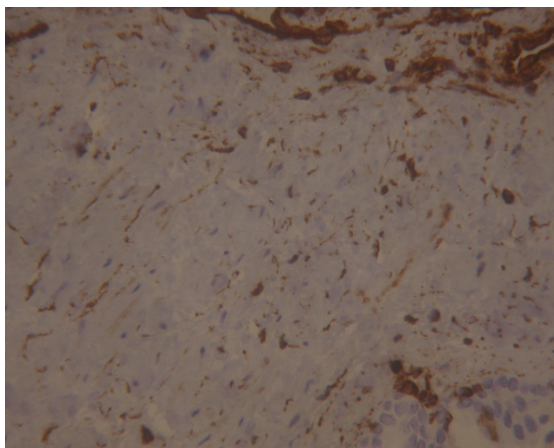
Табела 7. Дистрибуција на интензитетот на пребојување на Trichrome Masson кај простатичен карцином и ВРН

Интензитет на пребојување на строма	Карцином N(%)	ВРН Trichrome Masson N(%)
0	0	0
1 и 2 - низок	42 (59,99%)	69 (98,57%)
3 - умерен	28 (40,0%)	1 (1,43%)
Тестирани разлики	Chi-square = 31,71 df = 1 p < 0,001	

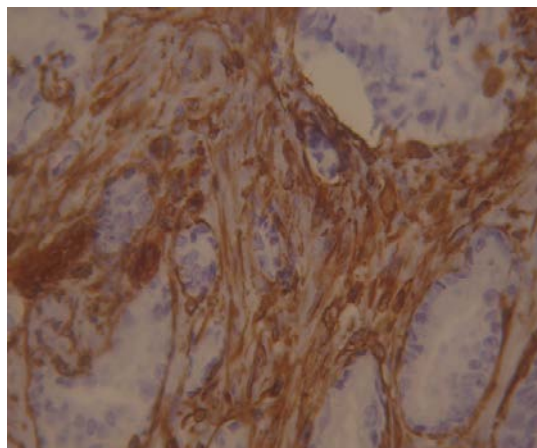
6.3. Експресија на стромални маркери

Од стромалните клетки фибробластите се карактеризираат со експресија на Vimentin (мезенхимален интермедиерен филамент) без дополнителна експресија на мазно-мускулни маркери (Слики 4, 5). Коекспресија на α -smooth muscle Actin (α -SMA) микрофиламенти (Слики 6, 7) и Desmin (Слики 8, 9) идентификува простатични мазно-мускулни клетки. Миофибробластен фенотип се смета дека се наоѓа помеѓу овие два екстрем и истиот се препознава со коекспресија на Vimentin и (α -SMA), без експресија на Desmin.

Слика 4.



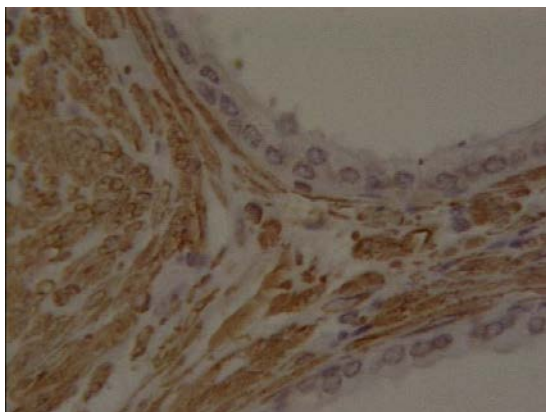
Слика 5



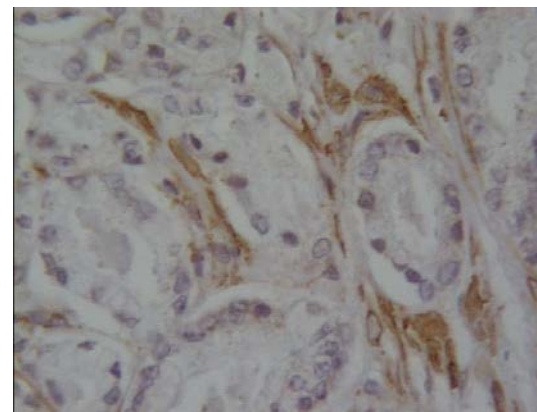
Слика 4: Експресија на Vimentin во стромата на ВРН (x 200)

Слика 5: Експресија на Vimentin во стромата на простатичен карцином (x 400)

Слика 6



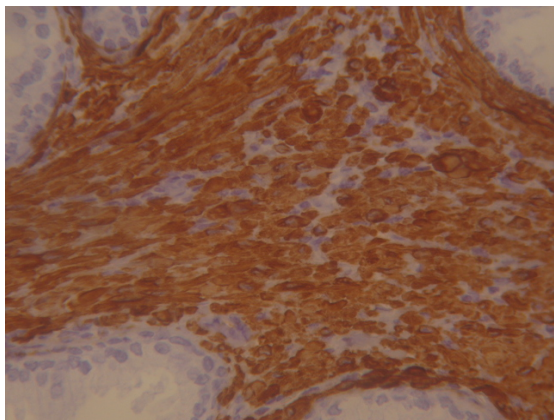
Слика 7



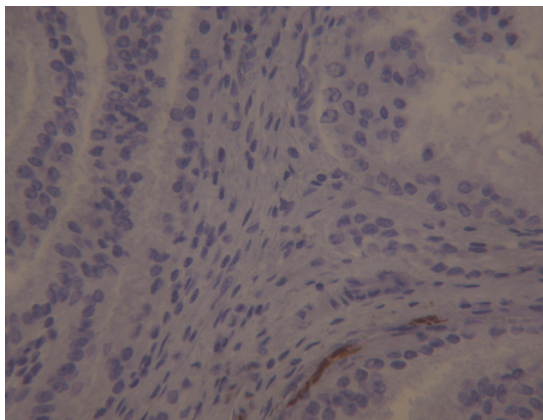
Слика 6: Експресија на α -SMA во стромата на ВРН (x 400)

Слика 7: Експресија на (α -SMA) во стромата на простатичен карцином (x 400)

Слика 8



Слика 9



Слика 8: Експресија на Desmin во стромата на ВРН (x 400)

Слика 9: Експресија на Desmin во стромата на простатичен карцином (x 400)

Стромата на простатичната жлезда кај бенигна простатична хиперплазија покажа високи нивоа на α -SMA и Desmin што беше конзистентно со црвеното пребојување кое се виде со хистохемиското боење Trichrome Masson.

Vimentin експресија се детектира кај интерстициелните фибробласти и васкуларните мазномускулни клетки, но не и кај простатичните мазномускулни клетки. Фибробластите беа помешани со простатичните мазномускулни клетки кои се типични за простатичната фибромускулна строма која е нормално присутна во простатичната жлезда.

Како што се покажа иницијално со боењето Trichrome Masson, се евидентираа фундаментални разлики во експресијата на стромалните маркери во разни зони на простатичната карциномска реактивна строма. Најголем пораст на Vimentin експресија се детектираше во зоните каде што имаше најинтензивно сино пребојување со Masson Trichrome пребојувањето. Во зоните на карцином α -SMA експресијата не покажа големи разлики во однос на бенигните подрачја на простата, но Desmin експресијата покажа пад особено во подрачјата на најинтензивно сино пребојување евидентирано со боењето Masson Trichrome.

Vimentin експресијата во простатична строма кај ВРН беше типично ниска (индекс на пребојување $1 - 2 = 1$). Обратно во зоните на карцином имаше умерена до јака Vimentin експресија ($3 - 4 = 2$ и $6 - 9 = 3$).

Во однос на интензитетот на сигналот за антителото Vimentin во стромата на простатичниот карцином и во стромата на ВРН, дистрибуцијата прикажана во табела 8 покажува дека индекс 3, односно висок индекс на пребојување е најчест во стромалните клетки на карциномот – 48,57%, а индекс 1, односно низок индекс на пребојување во стромалните клетки на ВРН- 67,14%.

Табела 8. Индекс на пребојување на Vimentin кај карцином на простатата и ВРН

Индекс на пребојување	Карцином N(%)	ВРН N(%)
0	0	0
1	8 (11,43%)	47 (67,14%)
2	28 (40,0%)	22 (31,43%)
3	34 (48,57%)	1(1,43%)

Антителото Vimentin има сигнификантно ($\text{Chi-square} = 45,55$ $\text{df} = 1$ $p < 0,001$) поголема експресија во стромата на карциномот споредено со стромата на бенигна простатична хиперплазија, во која дури 98,57% од случаите имаат индекс на пребојување 2 или 3 во стромалните клетки кај простатичниот карцином (Табела 9).

Табела 9. Групиран индекс на пребојување на Vimentin кај карцином на простатата и ВРН

	Карцином Vimentin N(%)	ВРН Vimentin N(%)
0	0	0
1 и 2 –низок	36 (51,43%)	69 (98,57%)
3 - умерен	34 (48,57%)	1 (1,43%)
тестирани разлики	$\text{Chi-square} = 45,55$ $\text{df}=1$ $p<0,001$	

За антителото Desmin, во стромата на карциномот 31,43% случаи имаат индекс на пребојување 1, 60% случаи имаат индекс 2, а само 8,57% случаи имаат индекс 3, додека во стромата на бенигната простатична хиперплазија сите случаи имаат индекс на пребојување 3 (Табела 10).

Табела 10. Индекс на пребојување на Desmin кај карцином на простата и ВРН.

Индекс на Пребојување	Карцином Desmin N(%)	ВРН Desmin N(%)
0	0	0
1	22 (31,43%)	0
2	42 (60,0%)	0
3	6 (8,57%)	70 (100%)

Опишаните разлики во јачината на сигналот за антителото Desmin, меѓу стромата на простатичниот карцином и стромата на бенигната хиперплазија и статистички се потврдуваат како сигнификантни ($\text{Chi-square} = 117,89$ $\text{df} = 1$ $p < 0,001$). Експресијата на антителото Desmin е значајно поголема во стромалните клетки на бенигната хиперплазија компарирано со стромалните клетки во карциномот. Сите анализирани случаи имаат позитивен сигнал за антителото Desmin во над 67% од стромалните клетки на бенигната простатична хиперплазија (Табела 11).

Табела 11. Групиран индекс на пребојување на Desmin кај карцином на простатата и ВРН

Индекс на пребојување	Desmin N(%)	Desmin N(%)
0	0	0
1 и 2 – низок	64 (91,43%)	0
3 - умерен	6 (8,57%)	70 (100%)
тестирани разлики	Chi-square = 117,89 df = 1 p < 0,001	

Анализата на интензитетот на сигналот за антителото α -SMA во стромата на простатичниот карцином и во стромата на бенигната хиперплазија, покажува дека индекс 2 се регистрира во стромата на карциномот на простатата и во стромата на бенигната простатична хиперплазија во 18,57% и во 15,71% случаи последователно, додека индекс 3 се регистрира во 81,43% случаи во стромата на карциномот и во 84,28% случаи во стромата на бенигната хиперплазија. (Табела 12).

Табела 12. Индекс на пребојување на α -SMA кај карцином на простата и ВРН

Индекс на пребојување	Карцином α -SMA N(%)	ВРН α -SMA N(%)
0	0	0
1	0	0
2	13 (18,57%)	11 (15,71%)
3	57 (81,43%)	59 (84,28%)

Статистичката анализа покажа дека интензитетот на сигналот за антителото α -SMA несигнификантно (Chi-square = 0,2 df = 1 p = 0,65) се разликува меѓу стромата на простатичниот карцином и стромата на бенигна простатична хиперплазија. α -SMA бојењето има генерално идентична јачина на сигнал кај простатичен карцином и бенигна простатична хиперплазија (Табела 13).

Табела 13. Групиран индекс на пребојување на α -SMA кај карцином на простатата и ВРН

Индекс на пребојување	Карцином α -SMA N(%)	ВРН Actin N(%)
0	0	0
1 и 2 низок	13 (18,57%)	11 (15,71%)
3 умерен	57 (81,43%)	59 (84,28%)
тестирани разлики	Chi-square = 0,2 df=1 p=0,65 NS*	

* NS - несигнификантно

Во табела 14 прикажани се корелациите на бојењето со Trichrome Masson и експресијата на антителата Vimentin, Desmin и α -SMA во стромалните канцерски клетки, со Gleason скорот, со предоперативните вредности на PSA и со екстрапростатичната екстензија на болеста (Т категорија).

Вредностите на Spearman-овиот коефициент и р вредностите покажуваат дека интензитетот на Trichrome Masson бојењето позитивно корелира со

експресијата на Vimentin ($R = 0,68$ $p < 0,001$), Gleason скорот ($R = 0,27$ $p = 0,023$) и со екстрапростатичната екстензија на болеста ($R = 0,24$ $p = 0,049$), додека негативно, односно инверзно корелира со експресијата на Desmin ($R = -0,28$ $p = 0,023$). Интензитетот на пребојувањето со Trichrome Masson во стромата на карциномот расте со зголемувањето на јачината на сигналот на антителио Vimentin, и обратното. Исто така интензитетот на бојењето Trichrome Masson позитивно корелира со ширење на болеста надвор од простата, додека се намалува со зголемената експресија на антителио Desmin.

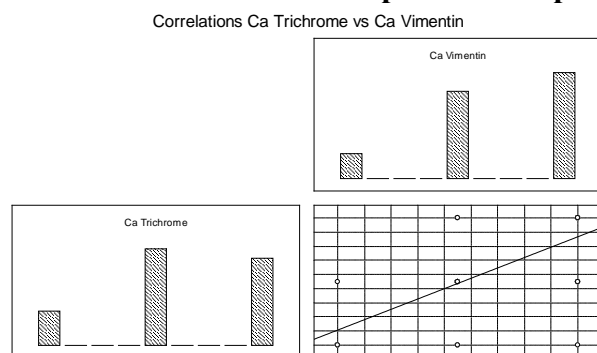
Не е најдена корелација, односно поврзаност меѓу Trichrome Masson пребојувањето и експресијата на антителио α -SMA ($R = 0,068$ $p = 0,57$), Gleason grade group ($R = 0,222$ $p = 0,06$ и предоперативните вредности на PSA ($R = -0,025$ $p = 0,84$). (табела 14, слика 10, 11, 12, 13, 14)

Табела 14. Корелација на бојењето Trichrome Masson со останатите параметри: Vimentin, Desmin и α -SMA во стромата на простатичен карцином, Gleason скор, Gleason grade group, PSA и екстрапростатична екстензија.

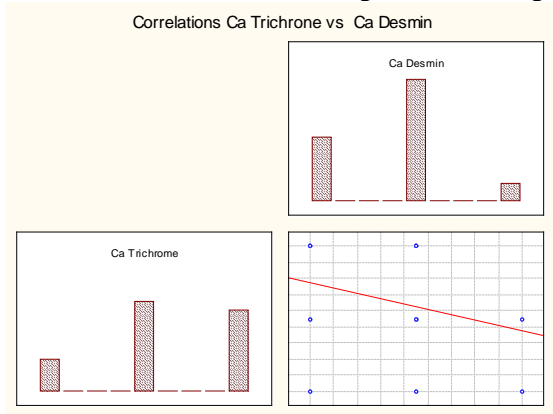
Trichrome Masson јачина на пребојување во стромата на простатичен карцином во корелација со:	Spearman Rank R	p-value
Vimentin	$R = 0,68$	$t = 7,67$ $p < 0,001^{**}$
Desmin	$R = -0,28$	$t = 2,39$ $p = 0,02^*$
α -SMA	$R = 0,068$	$t = 0,56$ $p = 0,57$ NS***
Gleason скор	$R = 0,27$	$t = 2,32$ $p = 0,023^*$
Gleason grade group	$R = 0,222$	$t = 1,9$ $p = 0,06^{***}$
PSA	$R = -0,025$	$t = 0,2$ $p = 0,84$ NS***
екстрапростатична екстензија	$R = 0,24$	$t = 1,99$ $p = 0,049^*$

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ NS*** - несигнификантно

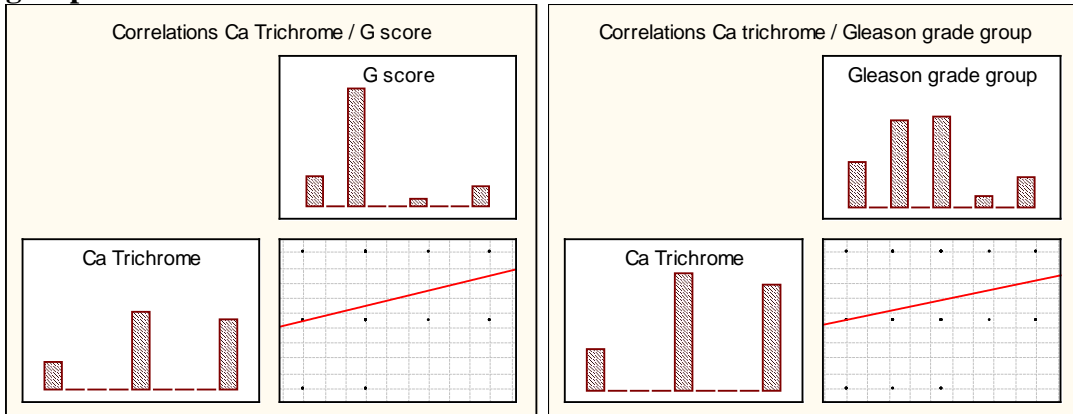
Слика 10. Корелација на бојењето Trichrome Masson со експресијата на антителио Vimentin во стромата на простатичен карцином.



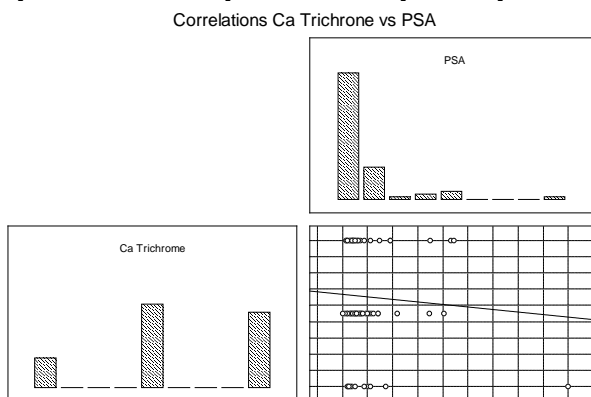
Слика 11. Корелација на боењето Trichrome Masson со експресијата на антителото Desmin во стромата на простатичен карцином.



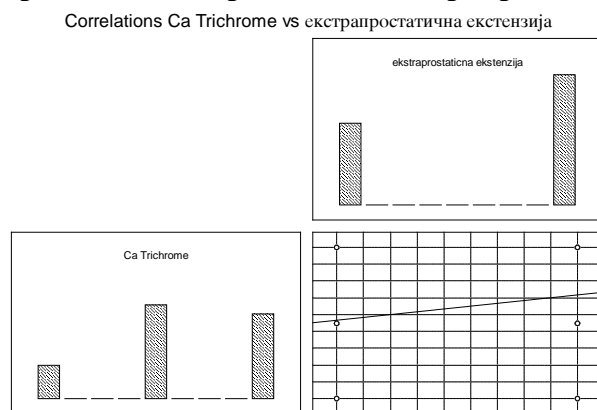
Слика 12. Корелација на боењето Trichrome Masson во стромата на простатичен карцином со Gleason-овиот градус на туморот и Gleason grade group.



Слика 13. Корелација на боењето Trichrome Masson во стромата на простатичен карцином со предоперативното ниво на PSA.



Слика 14. Корелација на боето Trichrome Masson во стромата на простатичен карцином со екстрапростатичната екстензија (Т категорија).



Во стромата на бенигната простатична хиперплазија (BPH) Trichrome Masson корелира единствено со експресијата на антителото Vimentin ($R = 0,51$ $p = 0,00001$), при што оваа поврзаност е право пропорционална, односно, интензитетот на пребојувањето со Trichrome Masson во стромата на бенигната простатична хиперплазија расте со зголемувањето на јачината на сигналот на антителото Vimentin, и обратното.

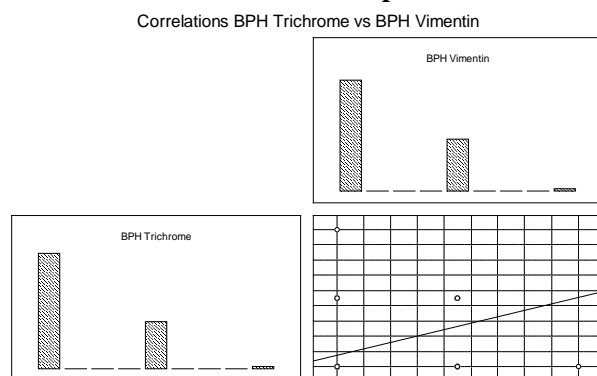
Не е најдена корелација, односно поврзаност меѓу Trichrome Masson пребојувањето во зоните на BPH и експресијата на антителото α -SMA ($R = -0,055$ $p = 0,45$), како и меѓу Trichrome Masson и предоперативните вредности на PSA ($R = -0,006$ $p = 0,96$) (Табела 15, Слика 15, 16, 17).

Табела 15. Корелација на боето Trichrome Masson со Vimentin, α -SMA и PSA во стромата на бенигната простатична хиперплазија.

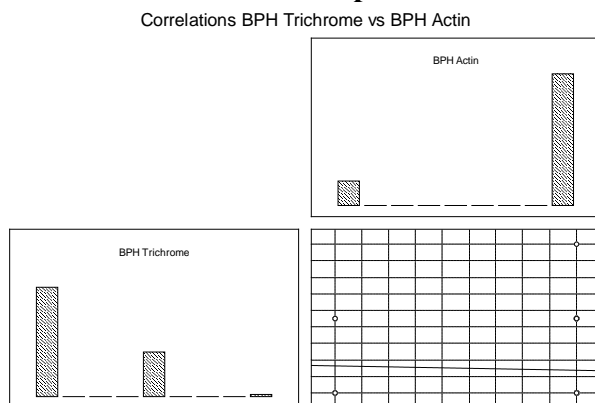
Trichrome Masson јачина на пребојување во стромата на BPH во корелација со:	Spearman Rank R	p-value
Vimentin	$R = 0,51$	$t = 4,8$ $p = 0,00001^{**}$
α -SMA	$R = -0,055$	$t = 0,45$ $p = 0,657$ NS***
PSA	$R = -0,006$	$t = 0,05$ $p = 0,96$ NS***

** $p < 0,01$ *** NS - несигнификантно

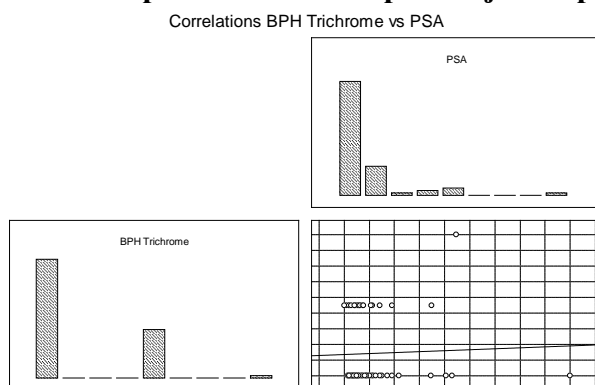
Слика 15. Корелација на боето Trichrome Masson со експресијата на антителото Vimentin во стромата на бенигната простатична хиперплазија.



Слика 16. Корелација на боењето Trichrome Masson со експресијата на антителото α -SMA во стромата на бенигната простатична хиперплазија.



Слика 17. Корелација на боењето Trichrome Masson во стромата на бенигна простатична хиперплазија со предоперативното ниво на PSA.



Во стромата на простатичниот карцином, Vimentin експресијата сигнификантно корелира со интензитетот на Trichrome Masson пребојувањето ($R = 0,68$ $p < 0,001$), со Gleason-овиот скор ($R = 0,35$ $p = 0,003$), со Gleason grade group ($R = 0,351$ $p = 0,003$) и со екстрапростатичната екстензија на болеста ($R = 0,28$ $p = 0,019$). Сите овие поврзаности, според вредноста на Spearman коефициентот се позитивни, што значи дека експресијата на антителото Vimentin и интензитетот на Trichrome Masson имаат ист правец на промена, и дека експресијата на ова антитело расте со зголемување на агресивноста на туморот и неговото екстрапростатично ширење.

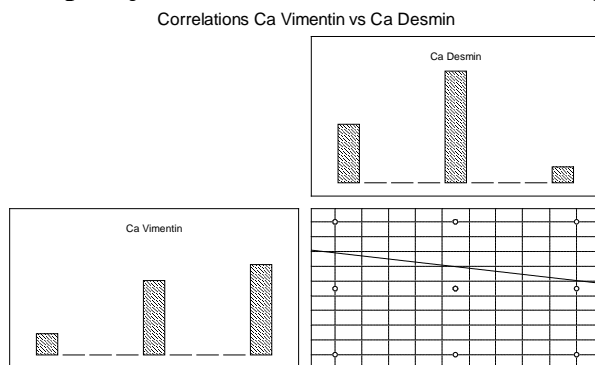
Не е најдена корелација меѓу Vimentin експресијата и експресијата на Desmin ($R = -0,15$ $p = 0,2$) и α -SMA ($R = 0,002$ $p = 0,99$), како и меѓу Vimentin експресијата и предоперативните вредности на PSA ($R = 0,07$ $p = 0,71$), (Табела 16, Слика 18, 19, 20, 21, 22).

Табела 16. Корелација на експресијата на антителото Vimentin со останатите параметри: Trichrome Masson, Desmin, α -SMA, Gleason-овиот градус, предоперативното ниво на PSA и екстрапростатичната екстензија на болеста во стромата на простатичен карцином.

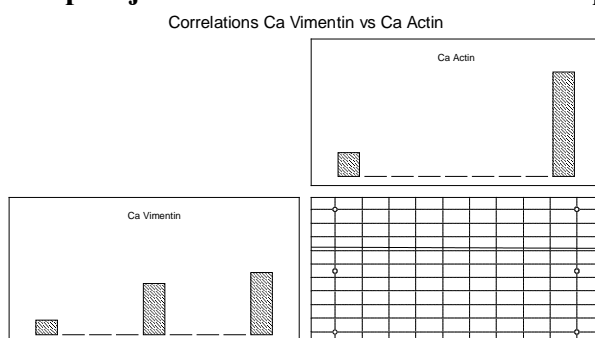
Vimentin експресијата во стромата на простатичен карцином во корелација со:	Spearman Rank R	p-value
Trichrome Masson	R = 0,68	t = 7,67 p < 0,001**
Desmin	R = - 0,15	t = 1,28 p = 0,2 NS***
α -SMA	R = 0,002	t = 0,016 p = 0,99 NS***
Gleason скор	R = 0,35	t = 3,03 p = 0,003**
Gleason grade group	R = 0,351	t = 3,09 p = 0,003**
PSA	R = 0,07	t = 0,38 p = 0,71 NS***
екстрапростатична екстензија	R = 0,28	t = 2,4 p = 0,019*

*p<0,05 **p<0,01 ***NS - несигнификантно

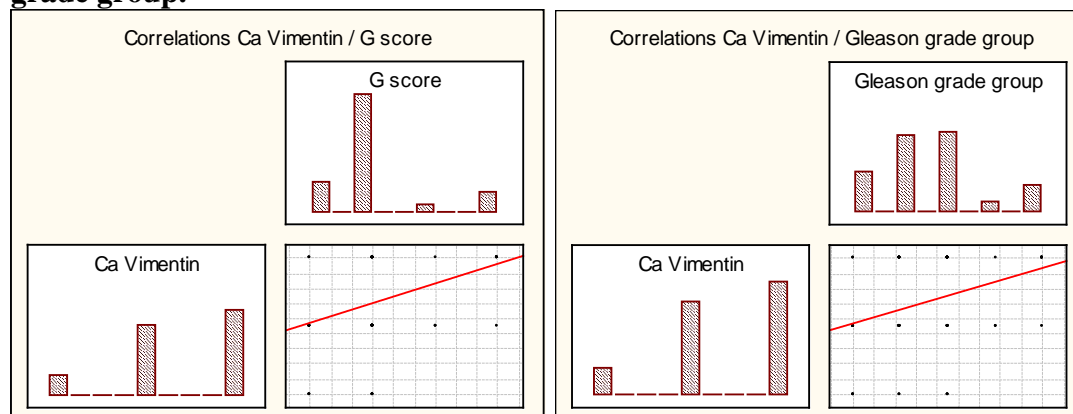
Слика 18. Корелација на експресијата на антителото Vimentin со експресијата на антителото Desmin во стромата на простатичен карцином.



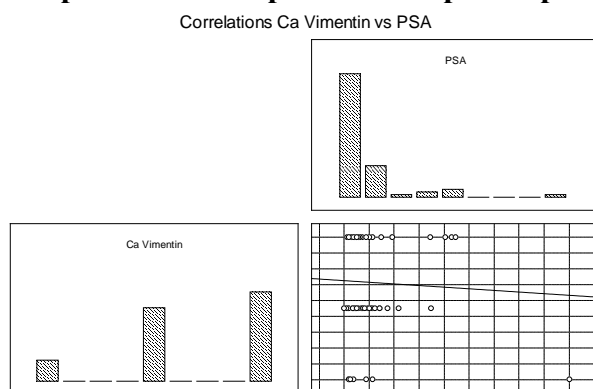
Слика 19. Корелација на експресијата на антителото Vimentin со експресијата на антителото α -SMA во стромата на простатичен карцином.



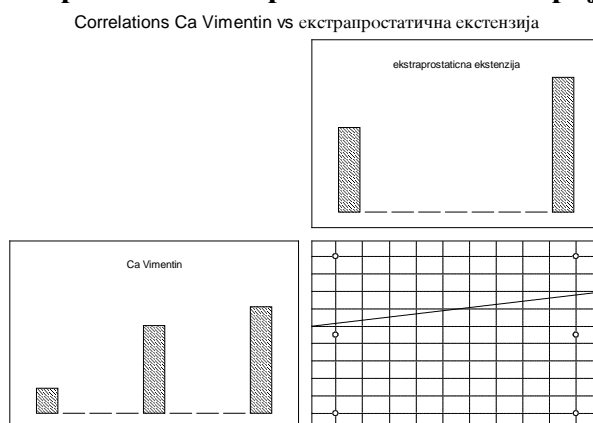
Слика 20. Корелација на експресијата на антителото Vimentin во стромата на простатичен карцином со Gleason-овиот градус на карциномот и Gleason grade group.



Слика 21. Корелација на експресијата на антителото Vimentin во стромата на простатичен карцином со предоперативното ниво на PSA



Слика 22. Корелација на експресијата на антителото Vimentin во стромата на простатичен карцином со T-категиорија (екстрапростатична екстензија)



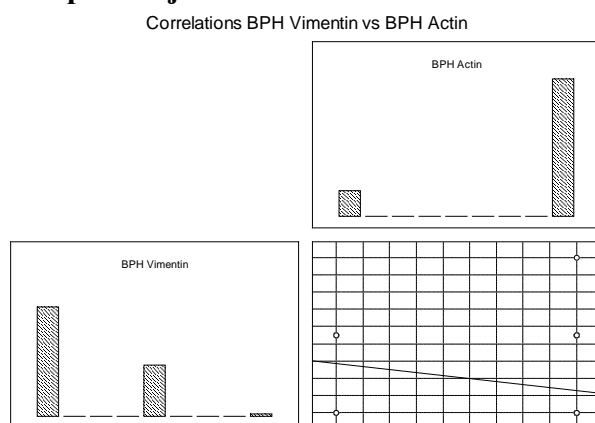
Vimentin експресијата во стромата на ВРН позитивно корелира со интензитетот на Trichrome Masson бојењето ($R = 0,51$ $p = 0,00001$), а инверзно корелира со α -SMA експресијата ($R = - 0,27$ $p = 0,02$). Во стромалните клетки на ВРН не е најдена асоцијација меѓу Vimentin експресијата и предоперативните нивоа на PSA ($R = 0,06$ $p = 0,74$) (Табела 17, Слика 23, 24).

Табела 17. Корелација на експресијата на антителото Vimentin со останатите параметри: Trichrome Masson, α -SMA и предоперативното ниво на PSA во стромата на бенигна простатична хиперплазија

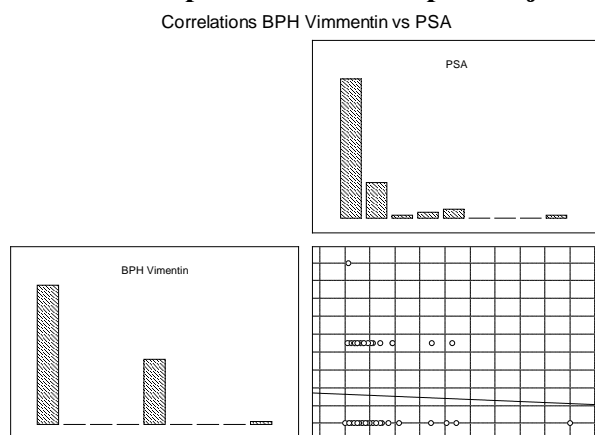
Vimentin експресијата во стромата на BPH во корелација со	Spearman Rank R	p-value
Trichrome Masson	R = 0,51	t = 4,8 p = 0,00001**
α -SMA	R = - 0, 27	t = 2,35 p = 0,02*
PSA	R = 0,06	t = 0,33 p = 0,74 NS***

*p<0,05 **p<0,01 ***несигнификантно

Слика 23. Корелација на експресијата на антителото Vimentin со експресијата на антителото α -SMA во стромата на бенигна простатична хиперплазија



Слика 24. Корелација на експресијата на антителото Vimentin во стромата на бенигна простатична хиперплазија со предоперативното ниво на PSA



Во стромата на простатичниот карцином, Desmin експресијата сигнификантно корелира со Trichrome Masson бојењето ($R = - 0,28$ $p = 0,02$), со Gleason-овиот скор ($R = - 0,25$ $p = 0,035$) и Gleason grade group ($R = -0,279$ $p = 0,019$). Трите корелации се негативни, односно инверзни, што сугерира дека експресијата на антителото Desmin се намалува со зголемување на интензитетот на бојењето на стромата по Trichrome Masson методот, и обратното. Исто така, експресијата на ова антитело се намалува со зголемување на Gleason-овиот скор или Gleason grade group (односно со зголемување на агресивноста на туморот).

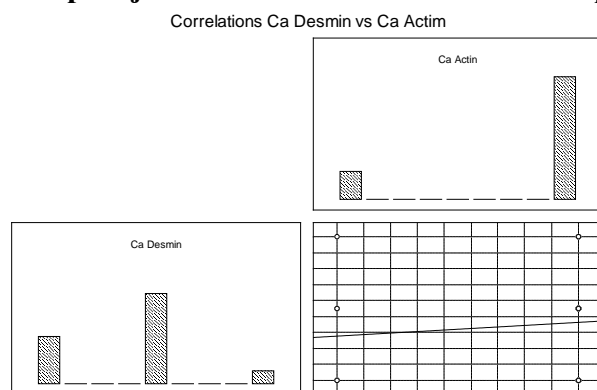
Desmin експресијата несигнификантно корелира со експресијата на Vimentin ($R = -0,15$ $p=0,2$), експресијата на α -SMA ($R = 0,13$ $p = 0,27$), вредностите на предоперативното серумско ниво на PSA ($R = -0,22$ $p = 0,052$) и со екстрапростатичната екстензија односно T категоријата ($R = -0,2$ $p = 0,095$) (Табела 18, Слика 25,26,27,28).

Табела 18. Корелација на експресијата на антителото Desmin со останатите параметри: Trichrome Masson, Vimentin, α -SMA, Gleason-овиот градус, Gleason grade group, предоперативното ниво на PSA и екстрапростатичната екстензија на болеста во стромата на простатичен карцином.

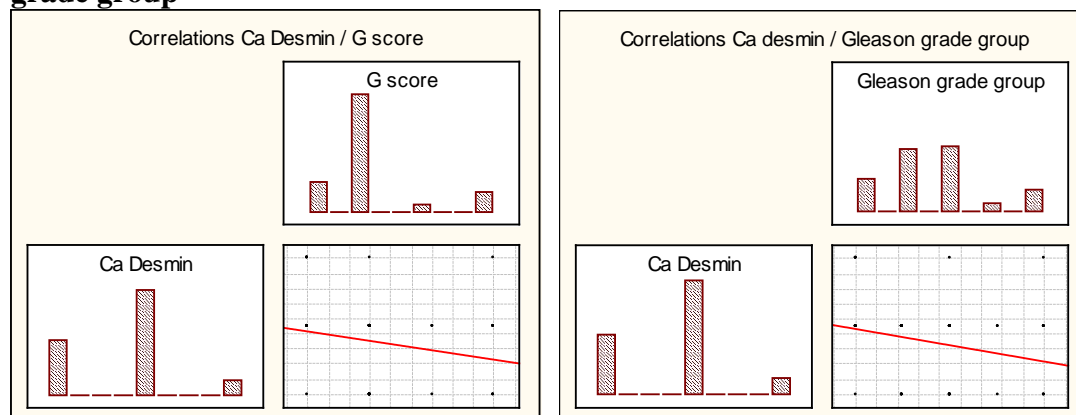
Desmin експресијата во стромата на простатичен карцином во корелација со	Spearman Rank R	p-value
Trichrome Masson	$R = -0,28$	$t = 2,39$ $p = 0,02^*$
Vimentin	$R = -0,15$	$t = 1,28$ $p = 0,2$ NS**
α -SMA	$R = 0,13$	$t = 1,11$ $p = 0,27$ NS**
Gleason скор	$R = -0,25$	$t = 2,14$ $p = 0,035^*$
Gleason grade group	$R = -0,279$	$t = 2,4$ $p = 0,019^*$
PSA	$R = -0,22$	$t = 1,98$ $p = 0,052$ NS**
екстрапростатична екстензија	$R = -0,2$	$t = 1,7$ $p = 0,095$ NS**

* $p < 0,05$ ** NS - несигнификантно

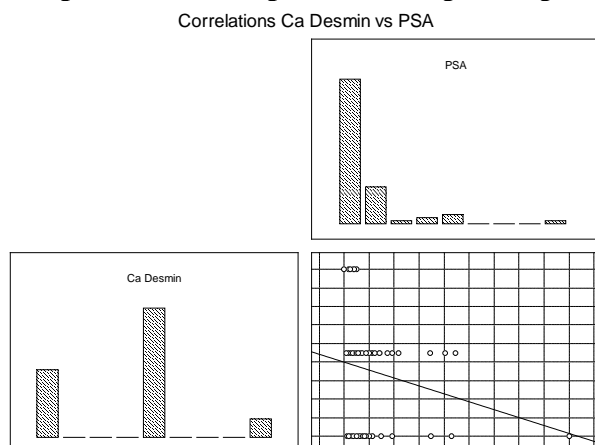
Слика 25. Корелација на експресијата на антителото Desmin со експресијата на антителото α -SMA во стромата на простатичен карцином.



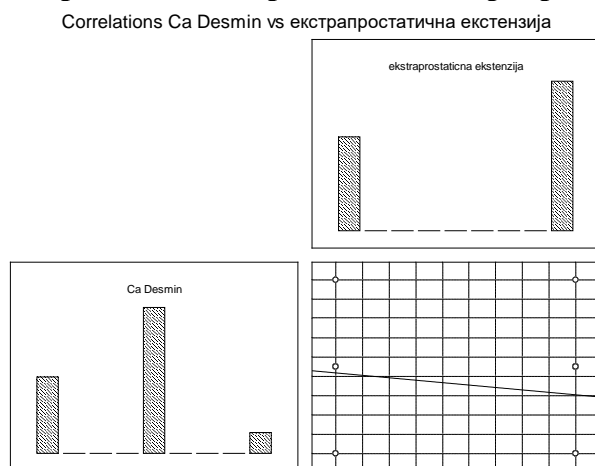
Слика 26. Корелација на експресијата на антителото Desmin во стромата на простатичен карцином со Gleason-овиот градус на карциномот и Gleason grade group



Слика 27. Корелација на експресијата на антителото Desmin во стромата на простатичен карцином со предоперативното ниво на PSA



Слика 28. Корелација на експресијата на антителото Desmin во стромата на простатичен карцином со екстрапростатична екстензија (T-категирија)



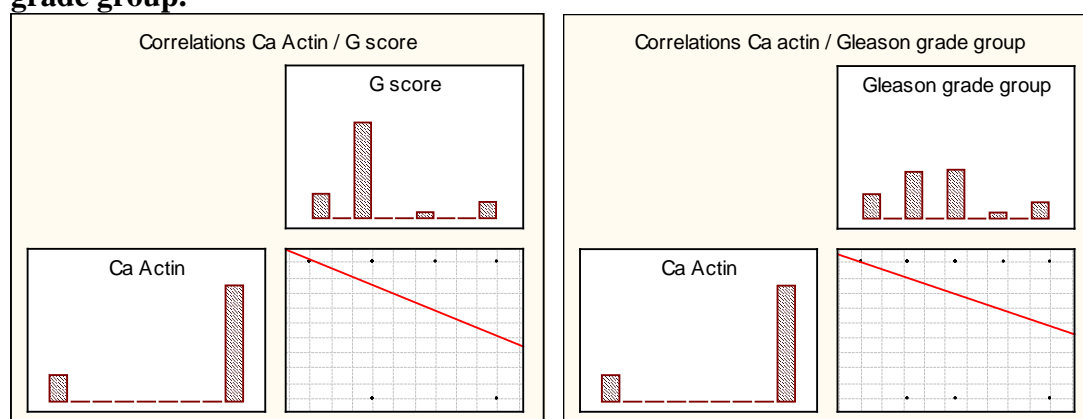
α -SMA експресијата во стромата на простатичниот карцином сигнификантно корелира единствено со диференцираноста на туморот, односно Gleason-овиот скор ($R = -0,35$ $p = 0,005$) или Gleason grade group ($R = -0,298$ $p = 0,012$), при што оваа поврзаност е со спротивна насока, што значи дека со зголемување на вредноста на Gleason-овиот скор, односно со зголемување на агресивноста на туморот се намалува експресијата на антителото α -SMA. Не е најдена значајна корелација меѓу α -SMA експресијата во стромата на простатичниот карцином со интензитетот на Trichrome Masson боењето ($R = 0,068$ $p = 0,57$), Vimentin експресијата ($R = 0,002$ $p = 0,99$), Desmin експресијата ($R = 0,13$ $p = 0,27$), предоперативните серумски нивоа на PSA ($R = -0,095$ $p = 0,76$) и со екстрапростатична екстензија ($R = -0,23$ $p = 0,058$) (Табела 19, Слика 29, 30, 31).

Табела 19. Корелација на експресијата на антителото α -SMA со останатите параметри: Trichrome Masson, Vimentin, Desmin, Gleason-овиот градус, предоперативното ниво на PSA и екстрапростатичната екстензија на болеста во стромата на простатичен карцином

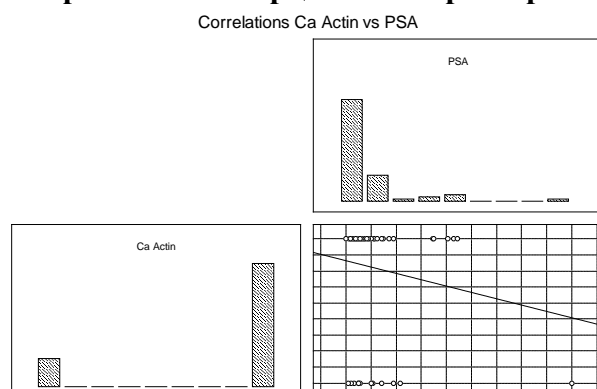
α -SMA експресијата во стромата на простатичен карцином во корелација со	Spearman Rank R	p-value
Trichrome Masson	R = 0, 068	t = 0,56 p = 0,57 NS***
Vimentin	R = 0, 002	t = 0,016 p = 0,99 NS***
Desmin	R = 0, 13	t = 1,11 p = 0,27 NS***
Gleason score	R = - 0,35	t = 2,9 p = 0,005**
Gleason grade group	R = -0,298	t = 2,57 p = 0,012**
PSA	R = - 0,095	t = 0,3 p = 0,76 NS***
екстрапростатична екстензија	R = - 0,23	t = 1,93 p = 0,058 NS***

p<0,01 *NS - несигнификантно

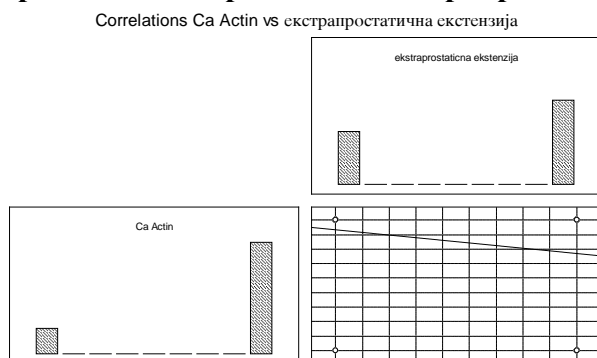
Слика 29. Корелација на експресијата на антителото α -SMA во стромата на простатичен карцином со Gleason-овиот градус на карциномот и Gleason grade group.



Слика 30. Корелација на експресијата на антителото α -SMA во стромата на простатичен карцином со преоперативното ниво на серумското PSA.



Слика 31. Корелација на експресијата на антителото α -SMA во стромата на простатичен карцином со екстрапростатична екстензија (T категорија).



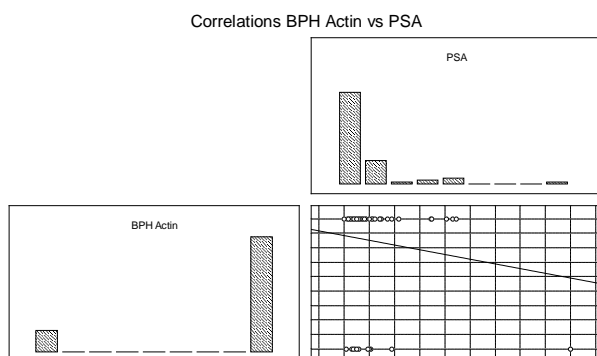
Во стромата на бенигната простатична хиперплазија α -SMA експресијата негативно корелира со експресијата на антителото Vimentin ($R = -0,27$ $p = 0,02$), што значи дека јачината на сигналот на овие две антитела во стромата на бенигната хиперплазија се менува обратно пропорционално, кога јачината на сигналот на едното антитело се зголемува, јачината на сигналот на другото антитело се намалува, и обратното. Испитауваните корелации меѓу експресијата на α -SMA и интензитетот на Trichrome Masson бојењето и предоперативните вредности на PSA се несигнификантни ($R = -0,055$ $p = 0,657$ и $R = 0,36$ $p = 0,86$ консеквентно). (табела 20, слика 32)

Табела 20. Корелација на експресијата на антителото α -SMA со останатите параметри: Trichrome Masson, Vimentin и предоперативното ниво на PSA во стромата на бенигна простатична хиперплазија

α -SMA експресијата во стромата на BPH во корелација со	Spearman Rank R	p-value
Trichrome	$R = -0,055$	$t = 0,45$ $p = 0,657$ NS**
Vimentin	$R = -0,27$	$t = 2,35$ $p = 0,02^*$
PSA	$R = 0,36$	$t = 0,17$ $p = 0,86$ NS**

* $p < 0,05$ **NS - несигнификантно

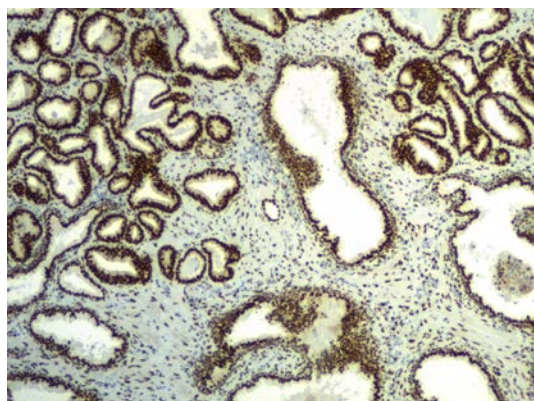
Слика 32. Корелација на експресијата на антителото α -SMA во стромата на бенигна простатична хиперплазија со преоперативното ниво на серумското PSA



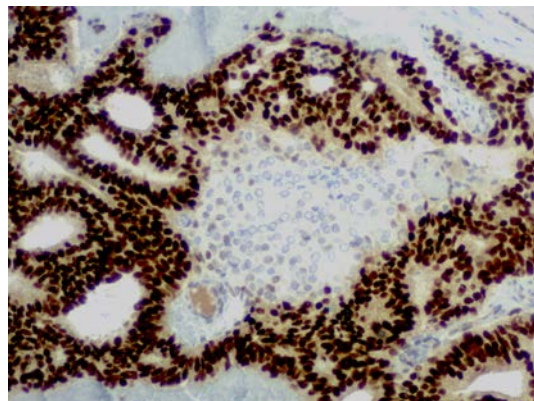
6.4. Експресија на Androgen Receptor

Имунореактивноста на AR беше ексклузивно нуклеарна и беше забележана кај сите туморски епителни клетки, бенигни жлездени епителни клетки и дел од перитуморската строма и интергландуларната строма кај бенигната простатична хиперплазија. Базалните клетки на жлездите кај бенигната простатична хиперплазија беа ретко позитивни (Слика 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40).

Слика 33



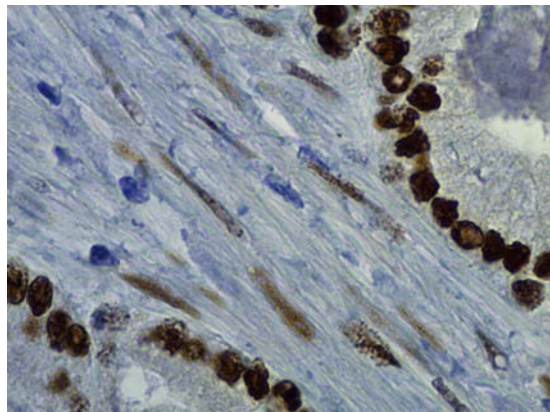
Слика 34



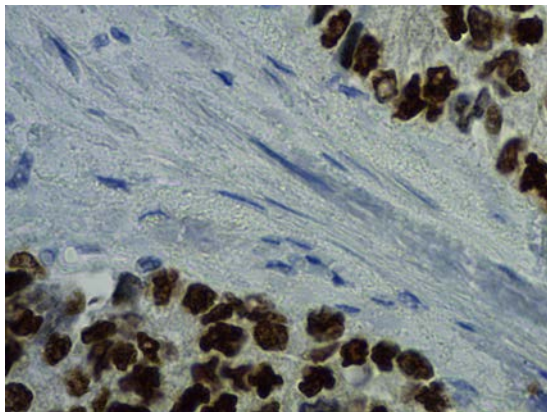
Слика 33: Имуноекспресија на AR во епителните и стромалните клетки кај ВРН (долу десно и средина) и простатичен карцином (горе лево и десно) (Androgen Receptor x 40)

Слика 34: Имуноекспресија на AR во епителните и стромалните клетки кај простатичен карцином (Androgen Receptor x 200)

Слика 35



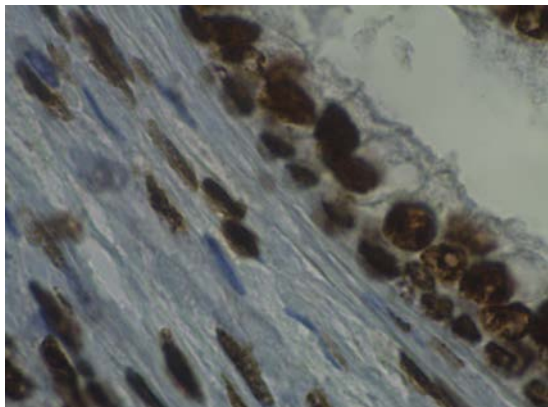
Слика 36



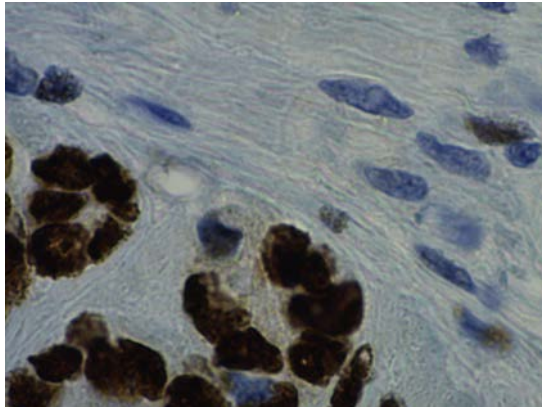
Слика 35: Имуноекспресија на AR во епителните и стромалните клетки кај ВРН (Androgen Receptor x 400)

Слика 36: Имуноекспресија на AR во епителните и стромалните клетки кај простатичен карцином (Androgen Receptor x 400)

Слика 37



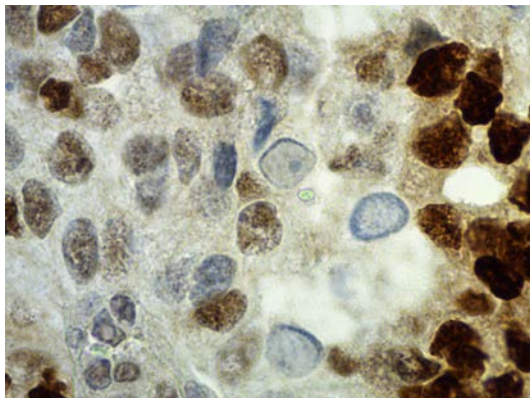
Слика 38



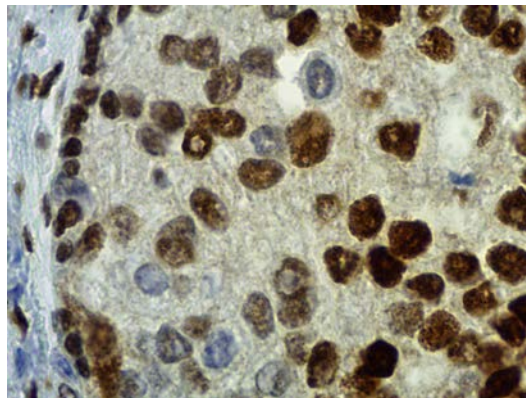
Слика 37: Имуноекспресија на AR во епителните и стромалните клетки кај ВРН (Androgen Reseptor x 600)

Слика 38: Имуноекспресија на AR во епителните и стромалните клетки кај простатичен карцином (Androgen Reseptor x 600)

Слика 39



Слика 40



Слика 39: Хетероген сигнал во епителните клетки кај простатичен карцином (Androgen Reseptor x 600).

Слика 40: Хетероген сигнал во епителните клетки кај простатичен карцином (Androgen Reseptor x 600).

Во табела 21 и табела 22 прикажани се просечните вредности, средните вредности, како и минималните и максимални вредности на Androgen Reseptor во епителот и стромата на простатичниот карцином и на бенигната простатична хиперплазија.

Табела 21. Експресија на AR изразена преку хистолошки скор во епителот и стромата на простатичен карцином и бенигна простатична хиперплазија

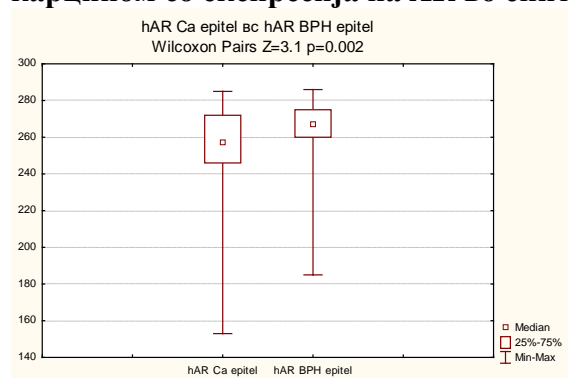
	N	Descriptive Statistics – AR		
		mean ± SD	median	min - max
Ca epitel	70	253,73 ± 22,9	257,5 (246 - 272)	153 - 285
Ca stroma	70	114,2 ± 37,3	114,5 (90 – 142)	37 – 208
ВРН epitel	70	264,14 ± 16,4	267 (260 – 275)	185 – 286
ВРН stroma	70	161,61 ± 22,1	161 (148 – 177)	110 – 212

Табела 22. Експресија на AR изразена преку хистолошки скор изразен како процент од максимална претпоставена вредност од 300 во епителот и стромата на простатичен карцином и бенигна простатична хиперплазија

	N	Descriptive Statistics – AR		
		mean ± SD	median	min - max
Ca epitel	70	84,57 ± 7,6	85,83	51 – 95
Ca stroma	70	38,07 ± 12,4	38,17	12,3 – 69,3
BPH epitel	70	88,05 ± 5,4	89,0	61,7 – 95,3
BPH stroma	70	53,87 ± 7,4	53,67	36,7 – 70,7

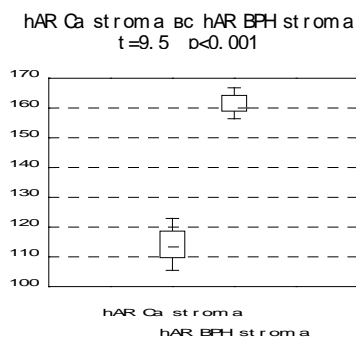
Експресијата на Androgen Receptor во епителот на простатичниот карцином е сигнификантно (Wilcoxon Matched Pairs $Z=3,1$ $p=0,002$) пониска, споредено со експресијата во епителот на бенигната простатична хиперплазија (med 257,5 vs 267). Просечните вредности на Androgen Receptor во епителот на бенигната простатична хиперплазија беа $253,73 \pm 22,9$ и $264,14 \pm 16,4$ соодветно (Слика 41)

Слика 41. Експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином со експресија на AR во епителните клетки на BPH



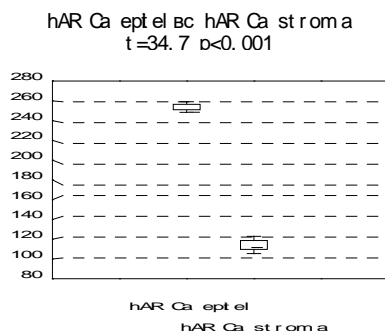
Во стромата на простатичниот карцином се регистрират сигнификантно ($t = 9,5$ $p < 0,001$) пониски просечни вредности на експресијата на AR во споредба со бенигната простатична хиперплазија (114,5 vs 161). (слика 42)

Слика 42. Експресија на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином споредено со експресија на AR во стромалните клетки на BPH



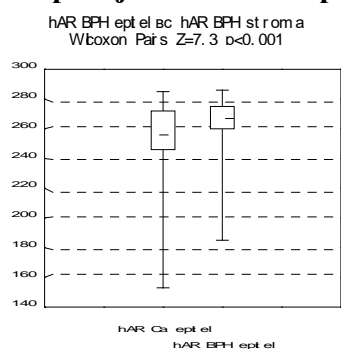
Просечната вредност на експресијата на AR во епителот на простатичниот карцином од $253,73 \pm 22,9$ е сигнификантно повисока од просечната вредност во стромата на простатичниот карцином, која има вредност од $114,2 \pm 37,3$ ($t = 34,7$ $p < 0,01$) (Слика 43).

Слика 43. Експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином споредено со експресија на AR во стромалните клетки на простатичен карцином



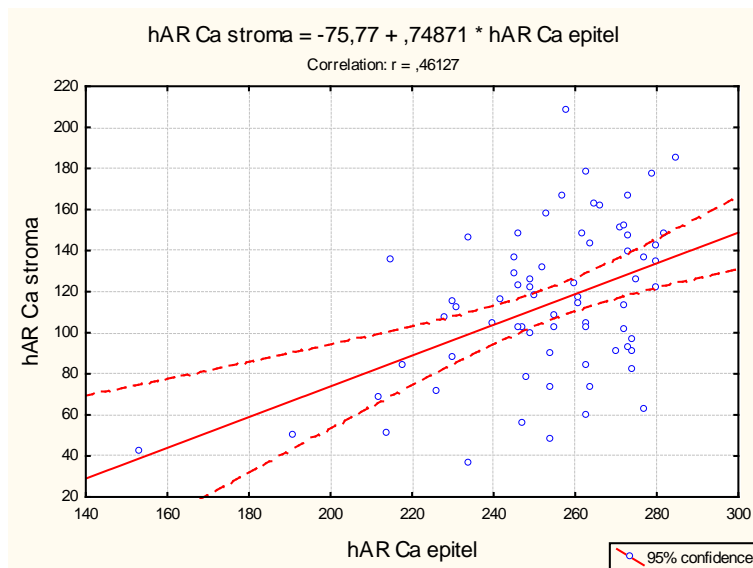
Вредноста на експресијата на AR во епителот на бенигната простатична хиперплазија е сигнификантно (Wilcoxon Matched Pairs $Z=7,3$ $p<0,01$) повисока од вредноста на експресијата на AR во стромата на бенигната простатична хиперплазија. (med 267 vs 161). Во епителот на ВРН беа измерени просечни вредности на AR од $264,14 \pm 16,4$, додека во стромата беа измерени вредности од $161,61 \pm 22,1$. Медијана на AR во епителот на ВРН беше 267 (ранг 260-275) наспроти 161 (ранг 148-177) во стромата на ВРН (Слика 44)

Слика 44. Експресија на AR во епителните клетки на ВРН споредено со експресија на AR во стромалните клетки на ВРН



Во оваа студија е испитана и поврзаноста, односно корелацијата во експресијата на Androgen Receptor помеѓу епителот и стромата на простатичниот карцином. Вредноста на Pearson-овиот коефициент на линеарна корелација од $r = 0,46$ и $p < 0,01$, покажува дека експресијата на AR во стромата на неоплазмата на простата позитивно сигнификантно корелира со експресијата во епителот, односно дека со зголемување на експресијата на овој рецептор во епителот на карциномот се зголемува и експресијата во стромата на карциномот и обратното. (Слика 45)

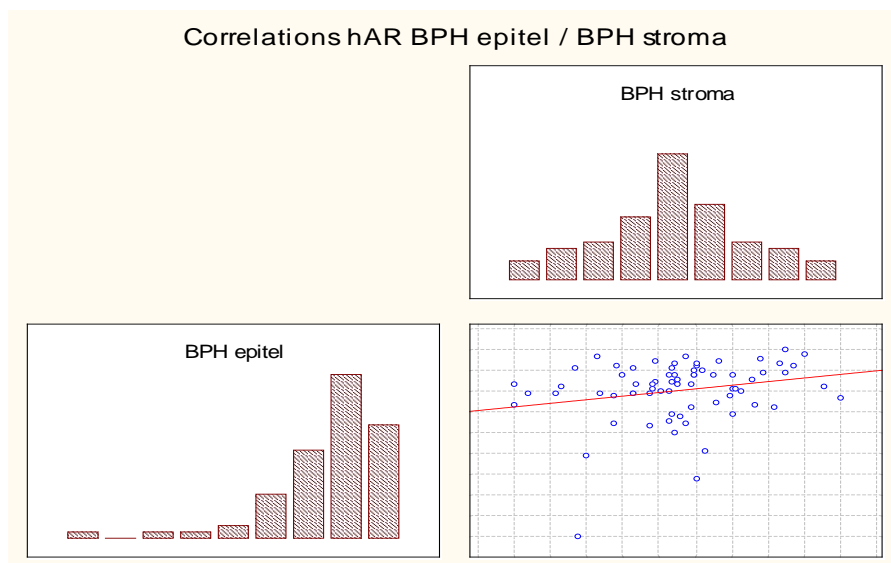
Слика 45. Корелација на експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином со експресија на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином



Pearson r = 0,46 p < 0,01

Испитуваната корелација помеѓу експресијата на Androgen Receptor во епителот и стромата на бенигната простатична хиперплазија е позитивна, но статистички несигнификантна ($R = 0,22$ $p > 0,05$). Експресијата на овој рецептор се менува пропорционално во епителот и стромата на бенигната простатична хиперплазија, но во оваа серија испитаници таа поврзаност не се докажува како значајна. (Слика 46)

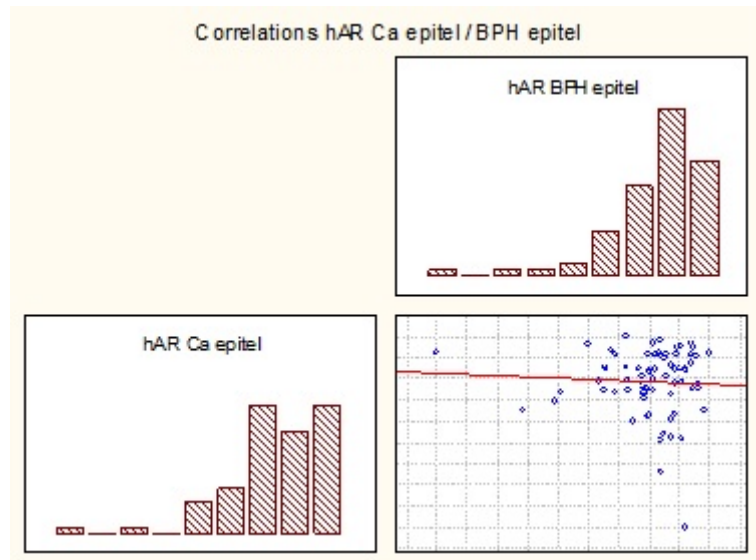
Слика 46. Корелација на експресијата на AR во епителните клетки на BPH со експресијата на AR во стромалните клетки на BPH



Spearman Rank Order correlation R = 0,22 p = 0,06

Позитивна но статистички несигнификантна корелација се регистрира во експресијата на Androgen Receptor меѓу епителните клетки на простатичниот карцином и епителните клетки на ВРН ($R = 0,056$ $p = 0,6$). (Слика 47)

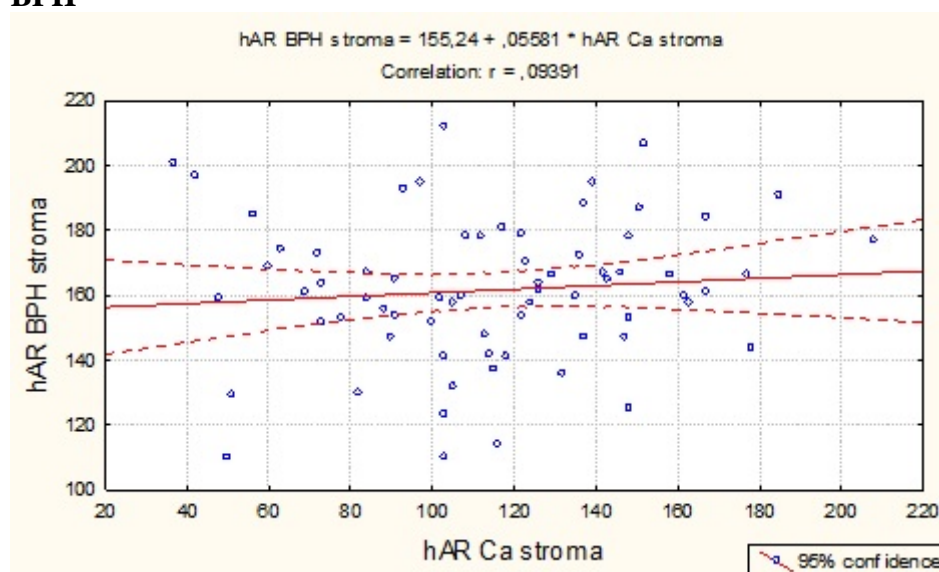
Слика 47. Корелација на експресијата на AR во епителните клетки на простатичниот карцином со експресијата на AR во епителните клетки на ВРН



Spearman Rank Order correlation $R = 0,056$ $p = 0,6$

Помеѓу експресијата на Androgen Receptor во стромата на простатичниот карцином и стромата на ВРН се регистрира позитивна, но статистички несигнификантна поврзаност, односно корелација ($r = 0,094$ $p = 0,44$). (Слика 48)

Слика 48. Корелација на експресијата на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином со експресијата на AR во стромалните клетки на ВРН



Pearson $r = 0,094$ $p = 0,44$

Резултатите од истражувањето покажаа дека возраста на испитаниците нема сигнификантно влијание на просечните вредности на AR во епителот и во стромата на неоплазмата на простата ($F = 0,27$ $p = 0,8$ и $F = 0,26$ $p = 0,86$ консеквентно).

Во табела 23 и табела 24 прикажани се просечните вредности, како и најниските и највисоки измерени вредности на AR, во епителот и стромата на простатичниот карцином, а во зависност од возрастната група на која и припаѓаат испитаниците.

Табела 23. Возрасна дистрибуција на испитаници во однос на хистолошкиот скор на експресијата на AR во епителните клетки на простатичниот карцином

Возрасни групи (години)	N	Descriptive Statistics – AR Ca epitel	
		mean \pm SD	minimum - maximum
≤ 60	10	259,3 \pm 16,7	234 – 280
61 – 65	19	251,16 \pm 19	214 – 279
66 – 70	14	252,93 \pm 23,3	212 – 285
>71	27	253,89 \pm 27,6	153 – 282
тестирани разлики		Analysis of Variance $F = 0,27$ $p = 0,8$ NS*	

* несигнификантно

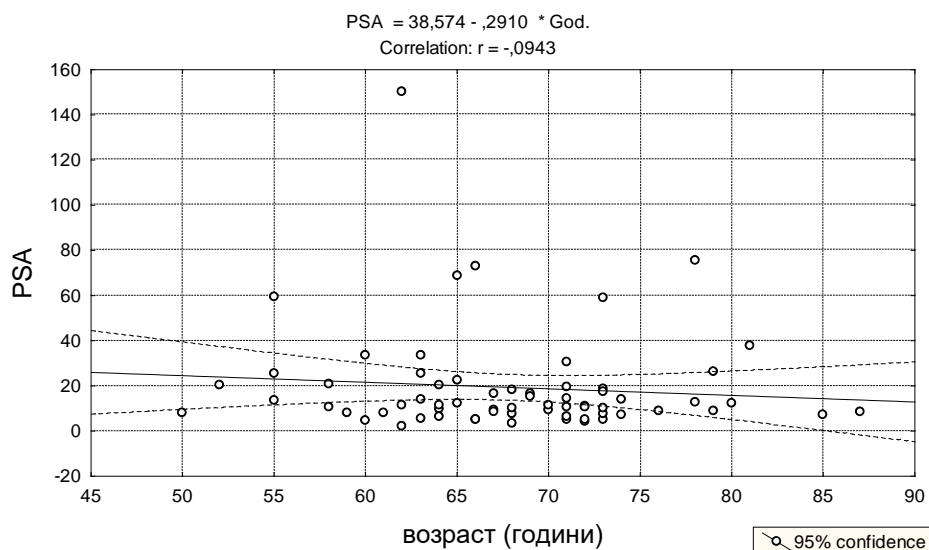
Табела 24. Возрасна дистрибуција на испитаници во однос на хистолошкиот скор на експресијата на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином

Возрасни групи (години)	N	Descriptive Statistics – AR Ca stroma	
		mean \pm SD	minimum - maximum
≤ 60	10	122,4 \pm 49,5	37 – 208
61 – 65	19	116,21 \pm 28,9	51 – 177
66 – 70	14	111,29 \pm 45,9	48 – 185
>71	27	111,26 \pm 34,1	42 – 167
Тестирани разлики		Analysis of Variance $F = 0,26$ $p = 0,86$ NS*	

* несигнификантно

Испитуваната корелација, односно поврзаност меѓу PSA и возраста, покажува дека меѓу нив не постои статистички сигнификантна корелација ($r = -0,09$ $p = 0,45$) (Слика 49).

Слика 49. Корелација меѓу предоперативното серумско ниво на простата специфичниот антиген со возраста на испитаниците



Pearson r = - 0,09 p = 0,45

Просечната вредност на PSA во анализираниите возрастни групи изнесува $19,99 \pm 16,4$; $26,37 \pm 37,9$; $14,54 \pm 17,3$ и $16,36 \pm 16,8$ последователно. Разликите меѓу возрастните групи испитаници во однос на регистрираните вредности на PSA статистички се незначайни ($H = 2,22$ p = 0,53) (Табела 25).

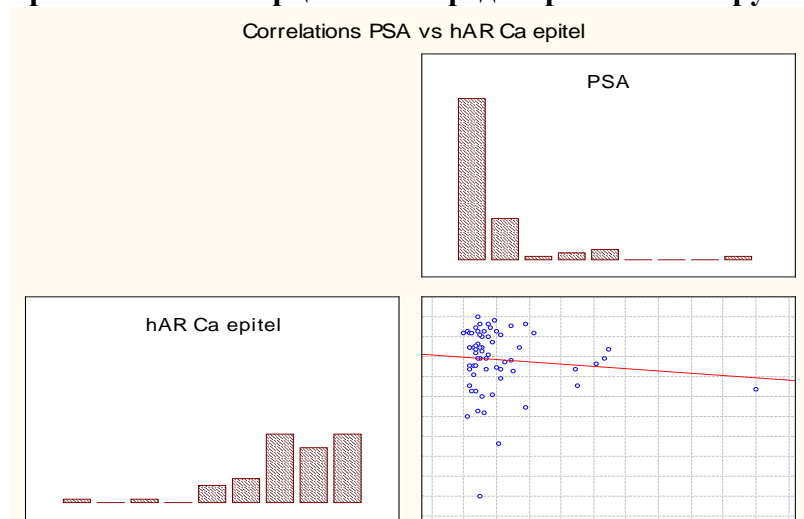
Табела 25. Сооднос помеѓу предоперативното серумско ниво на PSA со возраста на испитаниците

Возрасни групи (години)	N	Descriptive Statistics – PSA		
		mean \pm SD	median	min - max
≤ 60	10	$19,99 \pm 16,4$	16,5	4,17 – 59,0
61 – 65	15	$26,37 \pm 37,9$	12,0	1,5 – 150,0
66 – 70	14	$14,54 \pm 17,3$	9,4	3,1 – 72,6
>71	27	$16,36 \pm 16,8$	10,0	3,7 – 75,0
Тестирани разлики		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks $H = 2,22$ p = 0,53 NS*		

NS* - несигнификантно

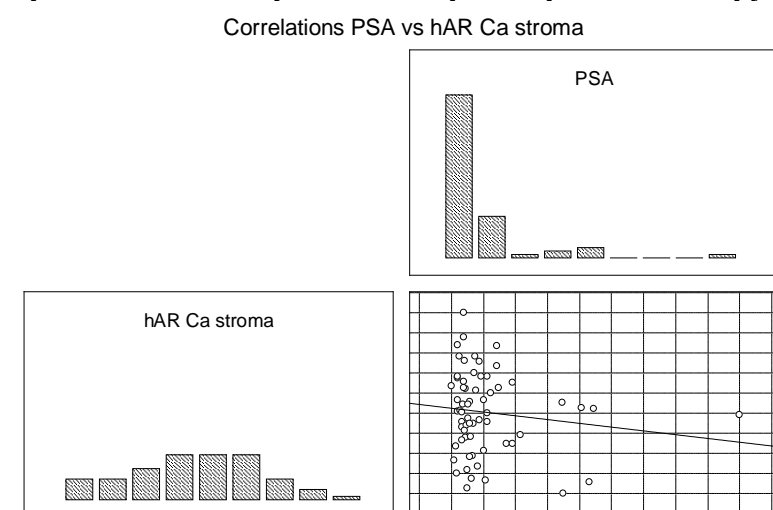
Слика 50 и слика 51 ја презентираат испитуваната корелација помеѓу PSA и експресијата на AR во епителот и стромата на простатичниот карцином. Вредноста на Spearman-овиот коефициент од $R = - 0,056$, p = 0,62 за корелацијата помеѓу PSA и AR во епителот, и вредноста од $R = - 0,11$, p = 0,36 за испитуваната корелација помеѓу PSA и AR во стромата на простатичниот карцином, покажува дека зголемената или намалена експресија на AR и во епителот и во стромата на карциномот, незначайно влијае на промена на концентрацијата на PSA во серумот.

Слика 50. Корелација на експресијата на AR во епителните клетки на простатичниот карцином со предоперативното серумско ниво на PSA



Spearman Rank Order correlation $R = -0,056$ $p = 0,62$

Слика 51. Корелација на експресијата на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином со предоперативното серумско ниво на PSA



Spearman Rank Order correlation $R = -0,11$ $p = 0,36$

Просечната вредност на AR во епителот на простатичниот карцином е највисока во групата G1 карциноми (Gleason скор 2 - 6), односно групата добро диференцирани тумори и изнесува $255,17 \pm 37,2$, пониска е во групата G2 карциноми (Gleason скор 7), односно групата умерено диференцирани тумори и изнесува $254,38 \pm 17,5$ и најниска просечна вредност на AR во епителот, регистрирана е во групата G3 карциноми (Gleason score 8 - 10), односно групата лошо диференцирани тумори и изнесува $249,36 \pm 26,1$. Статистичката анализа покажа несигнификантна поврзаност помеѓу просечната вредност на AR во епителот на простатичниот карцином со агресивноста на туморот односно градусот на туморот. Несигнификантно повисоки се просечните вредности на AR во епителот на добро диференцираните тумори, во споредба со умерено и лошо диференцираните тумори ($F = 0,24$ $p = 0,79$) (Табела 26).

Табела 26. Експресија на AR во епителот на простатичниот карцином во однос на Gleason-ов градус

G скор	N	Descriptive Statistics – AR Ca epitel	
		mean \pm SD	minimum - maximum
G1 (Gleason score 2-6)	12	255,17 \pm 37,2	153 – 285
G2 (Gleason score 7)	47	254,38 \pm 17,5	191 – 282
G3 (Gleason score 8-10)	11	249,36 \pm 26,1	212 – 280
Тестирани разлики		Analysis of Variance F = 0,24 p = 0,79 NS*	

NS* - несигнификантно

Статистички несигнификантна беше и разликата во просечната вредност на AR во епителот на простатичниот карцином и диференцираност на туморот со користење на Gleason grade group (F = 0,25 p = 0,9) (Табела 26a).

Табела 26a. Експресија на AR во епителот на простатичниот карцином во однос на Gleason grade group

Gleason grade group (GGG)	N	Descriptive Statistics – AR Ca epitel	
		mean \pm SD	minimum - maximum
GGG 1	12	255,17 \pm 37,2	153 – 285
GGG 2	23	251,87 \pm 21,2	191 – 282
GGG 3	24	256,79 \pm 12,9	228 – 277
GGG 4	3	251,33 \pm 20,5	234 - 274
GGG 5	8	248,62 \pm 29,2	212 – 280
Тестирани разлики		Analysis of Variance F = 0,25 p = 0,9 NS*	

Просечната вредност на AR во стромата на простатичниот карцином сигнификантно зависи од диференцираноста на туморот (F = 8,16 p = 0,0007). Овој статистички коментар се должи на тестираната разлика во просечната вредност на AR во стромата меѓу групите G1, G2 и G3 карциноми. Во групата G1 карциноми (Gleason score 2 - 6), односно групата добро диференцирани тумори, просечната вредност на AR во стромата е највисока и изнесува 144,0 \pm 41, пониска е во групата G2 карциноми (Gleason score 7), односно групата умерено диференцирани тумори и изнесува 112,91 \pm 32,4 и најниска просечна вредност на AR во стромата е регистрирана во групата G3 карциноми (Gleason score 8 - 10), односно групата лошо диференцирани тумори и изнесува 87,18 \pm 30,6.

Post hoc анализата покажа дека во групата добро диференцирани тумори, просечната вредност на AR во стромата е сигнификантно повисока во однос на групата умерено диференцирани (p = 0,017) и во однос на групата лошо диференцирани тумори (p = 0,0005). Разликата во просечната вредност на AR во стромата меѓу умерено и лошо диференцирани тумори (p = 0,07) е несигнификантна. (Табела 27)

Табела 27. Корелација на експресијата на AR во стромата на простатичниот карцином со градусот на туморот

G скор	N	Descriptive Statistics – AR Ca stroma	
		mean ± SD	minimum - maximum
G1 (Gleason score 2 - 6)	12	114,0 ± 41	42,0 – 208
G2 (Gleason score 7)	47	112,91 ± 32,4	48,0 – 178
G3 (Gleason score 8 - 10)	11	87,18 ± 30,6	37 – 137
Тестирани разлики		Analysis of Variance F = 8,16 p = 0,0007** Post hoc Tukey test G1 vs G2 p=0,017 G1 vs G3 p=0,0005 G2 vs G3 NS***	

*p<0,05 **p<0,01 ***NS – несигнификантно

Просечната вредност на AR во стромата на простатичниот карцином сигнификантно зависеше од диференцираноста на туморот користејќи Gleason grade group (F = 4,33 p = 0,0036).

Во Gleason grade group 1 карциноми, просечната вредност на AR во стромата беше највисока и изнесуваше 140,0 ± 41, сигнификантно повисока од Gleason grade group 3, Gleason grade group 4 и Gleason grade group 5 карциноми (p = 0,033; p = 0,0034; p = 0,0085 консеквентно) (Табела 27а)

Табела 27а. Корелација на експресијата на AR во стромата на простатичниот карцином со Gleason grade group

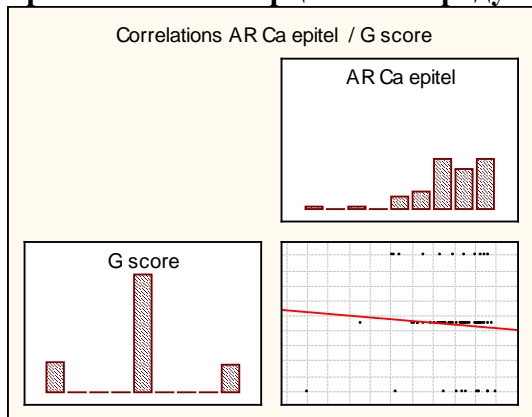
Gleason grade group	N	Descriptive Statistics – AR Ca stroma	
		mean ± SD	minimum - maximum
G1	12	114,0 ± 41	42 – 208
G2	23	117,87 ± 34,4	50 - 167
G3	24	108,17 ± 30,3	48 - 178
G4	3	79,0 ± 36,5	37 – 103
G5	8	90,25 ± 30,4	51 – 137
Тестирани разлики		Analysis of Variance F = 4,33 p = 0,0036** Post hoc Tukey test GGG1 vs GGG3 p=0,033* GGG1 vs GGG4 p=0,0034** GGG1 vs GGG5 p=0,0085**	

*p<0,05 **p<0,01

Диференцираноста на туморот изразена преку G скорот и Gleason grade group несигнификантно корелираше со експресијата на AR во епителот на простатичниот карцином (R = - 0,15 p = 0,2; R = - 0,099 p = 0,42 консеквентно).

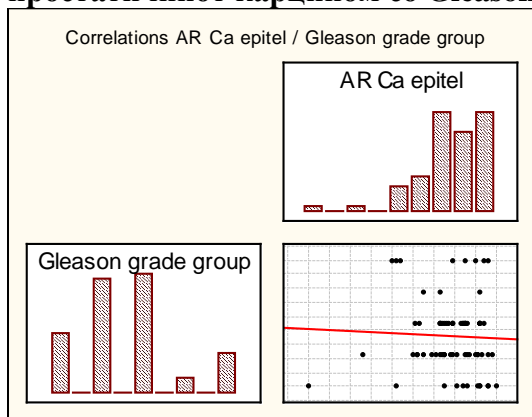
Корелацијата пак меѓу G скорот, односно Gleason grade group и експресијата на AR во стромата е негативна, но статистички сигнификантна (R = - 0,44; R = - 0,436 p<0,01), а тоа значи дека со зголемување на G скорот, односно Gleason grade group, што значи со намалување на диференцираноста на туморот, експресијата на AR во стромата на карциномот се намалува, и обратното. (слика 52, 52а) и (слика 53, 53а).

Слика 52. Корелација на експресијата на AR во епителните клетки на простатичниот карцином со градусот на туморот



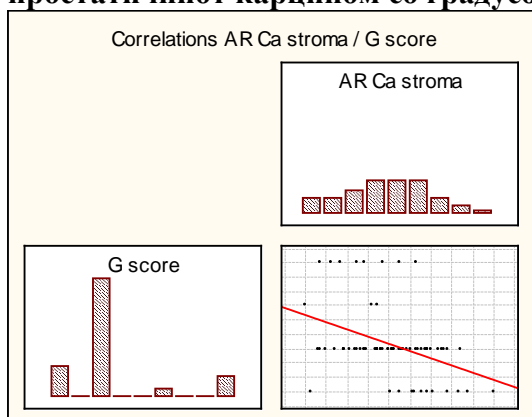
Spearman Rank Order correlation $R = -0,15$ $p = 0,2$

Слика 52а. Корелација на експресијата на AR во епителните клетки на простатичниот карцином со Gleason grade group



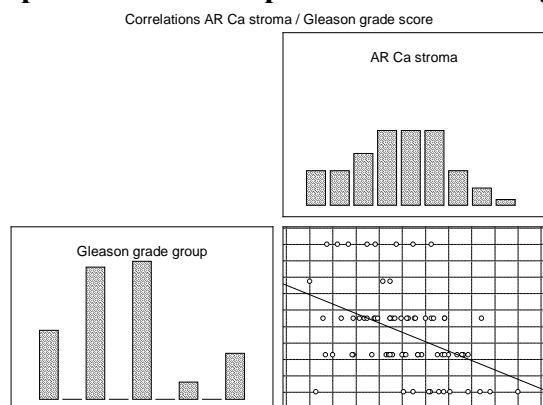
Spearman Rank Order correlation $R = -0,099$ $p = 0,42$

Слика 53. Корелација на експресија на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином со градусот на туморот.



Spearman Rank Order correlation $R = -0,44$ $p < 0,00002^{**}$
 $**p < 0,001$

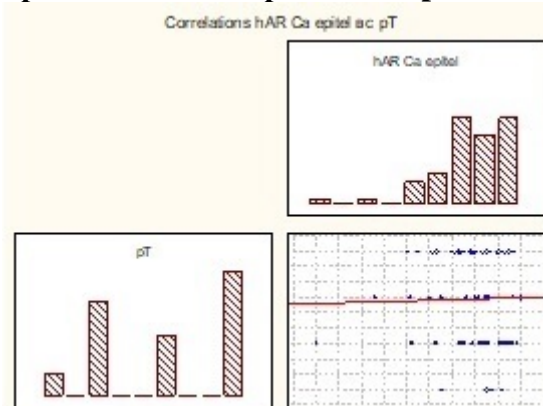
Слика 53а. Корелација на експресија на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином со Gleason grade group.



Spearman Rank Order correlation $R = -0,436$ $p = 0,00016^{**}$
 $**p < 0,001$

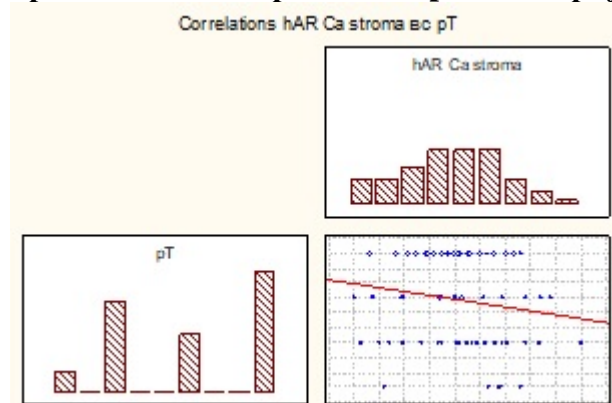
Анализата на поврзаноста на експресијата на Androgen Receptor во епителот и стромата на простатичниот карцином со pT категоријата (локалната проширеност на болеста) покажа статистички несигнификантна корелација меѓу овие две варијабли ($R = -0,019$ $p = 0,87$, и $R = -0,183$ $p = 0,13$ консеквентно) при што посилената експресија на AR и во епителот и во стромата на простатичниот карцином беше асоцирана со понизок pT стадиум на болеста и обратно (Слика 54 и 55)

Слика 54. Корелација на експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином со pT категоријата.



Spearman Rank Order correlation $R = -0,019$ $p = 0,87$

Слика 55. Корелација на експресија на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином со pT категоријата.



Spearman Rank Order correlation $R = -0,183$ $p = 0,13$

Позитивна, односно директна поврзаност беше најдена меѓу диференцираноста на туморот (Gleason grade) и pT категоријата ($R = 0,437$). Тоа покажува дека послабата диференцираност корелираше со повисока pT категорија (стадиум на болеста) и обратно. За вредност на $p = 0,000155$, се потврди дека корелацијата меѓу овие две варијабли се потврди и статистички како сигнификантна, односно значајна.

Корелацијата меѓу вредностите на PSA и pT категоријата покажа Spearman-ов коефициент од $R = 0,371$ што укажува дека промените меѓу овие две варијабли се случуваат право пропорционално, односно зголемени вредности на PSA се асоцирани со повисок стадиум на болеста, и обратно. Вредноста на $p = 0,002$ ја потврдува оваа поврзаност како статистички сигнификантна.

Резултатите добиени при дополнителната анализа на H-SCORE како процент од максималниот претпоставен скор 300 при имунобоењето со AR ги даде истите резултати во однос на испитуваните параметри. Оваа модификација на хистолошкиот скор овозможува инкорпорација на процентот на обоени клетки и јачината на сигналот со цел добивање на поадекватен увид во количината на Androgen Receptor која е присутна во ткивото³³

7. ДИСКУСИЈА

7.1. Прогностички фактори кај простатичен карцином

Прогнозата на пациентите со простатичен карцином се дефинира како предвидување за идното однесување на дијагностицираниот малигном, без оглед на тоа дали претходно е аплицирана терапија.

Факторите на предвидување се делат во 2 категории³⁴: прогностички фактори – фактори кои предвидуваат релапс или прогресија независно од идна терапија и предиктивни фактори – фактори кои предвидуваат одговор, или резистентност на специфична терапија. За простатичниот карцином во моментов не постојат предиктивни фактори.

Прогностичките фактори се групираат во 3 категории^{35,36}:

1. Првата категорија опфаќаат хистопатолошки фактори кои се добро етаблирани и неопходни во рапортирање на простатични карциноми и во оваа група спаѓаат патолошки стадиум и статус на хируршки маргини кои се одредуваат на примероци од радикална простатектомија и Gleason-ов хистолошки градус кој се одредува на сите типови на примероци од простатично ткиво.
2. Втората категорија вклучува фактори кои се смета дека во скоро време ќе се етаблираат и кои се препорачува да се рапортираат и покрај некомплетните податоци за нив. Во оваа група спаѓаат хистолошки подтипови на простатичен карцином, туморски волумен и DNA плоидност која сепак генерално не се изведува во рутинска пракса.
3. Третата категорија на фактори се фактори кои не се препорачуваат за рапортирање поради недоволни докази дека може да претставуваат прогностички фактори. Во оваа група спаѓаат, генетските маркери, неуроендокрините маркери, пролиферативните маркери, перинеруралната инвазија, васкуларната или лимфатичната инвазија, густината на малите крвни садови, нуклеарната морфометрија и статусот на Androgen Receptor (AR). За да се докаже клиничка корист за некои од овие фактори потребни се проспективни рандомизирани студии и потребна е корелација со добро етаблираните прогностички индикатори како патолошкиот стадиум и Gleason-овиот градус³⁷.

Заради можниот бенефит на пациентите од се поголем број на истражувања од областа на третата категорија на прогностички фактори и од областа на разбирањето на карциногенезата, оваа студија беше дизајнирана да анализира Androgen Receptor во епителот и стромата на бенигна простатична хиперплазија (аналогна на нормално простатично ткиво) и карцином на простатата, да ја анализира стромата на туморот во склоп со поновите базични научни истражувања од областа на карциногенезата и да ги спореди наодите со класичните и веќе утврдени прогностички фактори како што се Gleason-овиот скор и локалниот раст на неоплазмата како дел од елементите кои го дефинираат стадиумот на болеста.

7.2. Gleason-ов градуирачки систем

Gleason-овиот градуирачки систем е доминантен градуирачки метод за простатичен карцином низ Светот, како за истражувачки цели така и во рутинката пракса³⁷. Системот е креиран од Dr. Donald Gleason, патолог од Минесота, Соединетите Американски Држави и член на Veterans Administration Cooperative Urological Research Group (VACURG)³⁸⁻⁴³. Овој систем е креиран од 1960 до 1975 година, при што се испитани околу 5000 пациенти со простатичен карцином во проспективна рандомизирана студија. Една од најголемите вредности на овој систем е дека тој е тестиран на голема популација на пациенти со долготрајно следење, кое вклучувало и преживување како крајна точка.

Gleason-овиот градуирачки систем се базира целосно на хистолошки шеми од аранжманот на карциномските клетки на Хематоксилин – Еозин обоени пресеци од простатичен карцином. Овој систем категоризира хистолошки шеми на мало зголемување (x40) каде се одредува степен на glandularна диференцијација и се одредува начин на раст на карциномот во околната простатична строма⁴³. Опишани се 9 шеми на раст кои се вклопени во 5 градуси. Петте основни градуси се користат за да се формира хистолошки скор кој се движи од 2 до 10 со вклучување на примарна и секундарна шема на раст на карциномот. Примарна шема подразбира предоминантно присутна или распространета шема одредена во неопластичното ткиво со визуелна инспекција. Секундарна шема подразбира втора по честота шема на раст. Доколку е присутна само една шема на раст тогаш градусот се помножува со 2 за да се добие Gleason-овиот скор. Според препораките на Gleason од 1977 година, доколку постои секундарна шема на раст во помалку од 3% од тоталниот туморски волумен тогаш истата се игнорира и се дуплира само примарната шема на раст⁴¹. Gleason-ов скор, Gleason-ов градус и комбиниран Gleason-ов скор се синоними за Gleason-ов скор, кој Gleason иницијално го нарекувал хистолошки скор^{39,43}. Доделување на Gleason-ов скор во суштина го одредува просекот од двете најчести шеми на раст. Ова е уникатна карактеристика за простатичниот карцином со оглед на фактот дека кај други малигноми само најлошиот градус се зема како конечен градус бидејќи најлошиот градус го детерминира исходот на болеста. Ваквото градуирање е поткрепено и со фактот дека кај пациенти кои имаат две Gleason-ови шеми на раст степенот на смртност од простатичниот карцином се наоѓа помеѓу степенот на смртност на пациентите кои поседуваат само помал Gleason-ов градус и пациентите кои поседуваат само повисок Gleason-ов градус⁴¹⁻⁴³.

Gleason-овиот градус овозможува одредување на две шеми на раст, иако простатичниот карцином е многу похетероген. Во една студија⁴⁴ најдени се во просек 2,7 шеми на раст а во други 2 студии најдени се 14-18% од пациенти кои поседувале повеќе од 2 шеми на раст⁴⁵⁻⁴⁶. Во една од овие студии⁴⁶ најдени се 3% случаи каде биле присутни дури 4 различни шеми на раст. Бројот на градуси зависи и од типот на примерокот. Во примероци од трансуретрална ресекција на простата најдени се 28% од случаи кои поседувале повеќе од 2 градуси на раст споредено со иглени трансректални биопсии каде само 4% од случаевите покажале повеќе од 2 градуса. Автори заклучиле дека тумор поголем од 1 см³ има тенденција да даде повеќе од 2 шеми на раст^{44,46}. Gleason не дал солуција за овој проблем бидејќи немал доволно случаи за да може да го одреди

однесувањето на карциномите кои поседуваат повеќе од 2 шеми на раст⁴². Скорешни податоци од анализа на примероци од радикална простатектомија индицираат дека висок Gleason-ов градус од 4 и 5 како терциерна компонента која окупира помалку од 5% од целиот волумен на туморот влијае на патолошкиот стадиум и прогресијата на болеста⁴⁷ па поради тоа во тие случаи треба да се рапортира и присуство на терциерна компонента. Други автори даваат препораки дека во иглени биопсии каде има повеќе од 2 градуси треба да се рапортира главната шема на раст а потоа најлошата шема на раст, иако истата е трета по честота⁴⁸. Групирање на шемите на раст не се препорачува. Често се групираат Gleason скорови 2 - 4 како добро диференцирани карциноми, 5 - 7 како умерено диференцирани тумори и 8 - 10 како лошо диференцирани тумори. Главен проблем во ова групирање претставува Gleason-ов скор 7 кој во себе вклучува и елементи на карцином со висок градус, но припаѓа на групата на умерено диференцирани карциноми помеѓу шемите 2 - 6 и 8 - 10, а некои автори препорачуваат да се води како карцином со висок градус⁴⁹⁻⁵¹. Доколку групирање е неопходно, на пример во истражувачки цели, се препорачува групирање 2 - 6 добро диференцирани карциноми, 7 умерено диференцирани карциноми и 8 - 10 лошо диференцирани карциноми. Од 2016 година Светската Здравствена Организација го модифицира Gleason-овиот градуирачки систем: Градус 1 (Gleason скор 2 - 6), Градус 2 (Gleason скор 3+4 = 7), Градус 3 (Gleason скор 4+3 = 7), Градус 4 (Gleason скор 8), Градус 5 (Gleason скор 9 - 10)⁵².

Хистолошки градус се рапортира кај нетретиран карцином во сите видови на простатични ткивни примероци: трансректални биопсии, трансуретрални ресекции, трансвезикални простатектомии и ретропубични радикални простатектомии. Висок градус терциерна шема (Gleason 4 и 5) треба да се инкорпорира во Gleason скорот како секундарна шема на раст. Скорирање треба да се изведе и на минимално туморско ткиво. Кај примероци од трансуретрална ресекција, трансвезикална простатектомија и радикална простатектомија се препорачува стандардното рапортирање на примарна и секундарна шема на раст со описно додавање на терциерна шема на раст, доколку истата е од висок градус 4 или 5³⁷.

Gleason-овиот градуирачки систем како моќен прогностички фактор за прогресија на простатичен карцином го издржал тестот на времето. Но сепак, овој градуирачки систем исто така покажал и недостатоци. Постојат 2 клучни проблеми со оригиналниот Gleason-ов градуирачки систем. Првиот проблем се јавува кај одредување на Gleason-ови шеми на раст 1 и 2 кои се многу ретки и присутни единствено во периуретралните зони, односно само во примероците од трансуретрална ресекција на простата па затоа на биоптични примероци овие шеми на раст не се забележуваат. Вториот проблем претставува Gleason-ов збир 7 кој може да биде Gleason score 3+4 или Gleason score 4+3 во зависност од предоминантната шема на раст. Проблемот се јавува во различната прогноза кај пациентите со Gleason-ов скор 3+4 и пациентите со Gleason-ов скор 4+3. Од таа причина Светската Здравствена Организација направила модификација на оригиналниот Gleason-ов градуирачки систем во 2016 година⁵².

Според оваа модификација на Gleason-овиот градуирачки систем се формирани 5 таканаречени Gleason прогностички градус групи (Gleason prognostic grade group или скратено Gleason grade group) на следниов начин:

Gleason grade group 1 – Gleason score 3+3

Gleason grade group 2 – Gleason score 3+4

Gleason grade group 3 – Gleason score 4+3

Gleason grade group 4 – Gleason score 4+4

Gleason grade group 5 – Gleason score 4+5; 5+4; 5+5

Овој нов модифициран систем на градуирање го употребивме во нашата студија.

Од друга страна за подобра стратификација на пациентите се предложуваат нови прогностички фактори и нови градуирачки системи а со напредокот во проучувањата на стромалната компонента на простатичниот карцином се воведуваат стромални скорирања за кои е потребно време за детални испитувања со цел да се изнајде адекватен градуирачки стромален систем кои се предложува да биде дополние на веќе етаблираниот Gleason-ов градуирачки систем.

7.3. Стадиум на болест

Стадиумот на болеста, односно стадиумот на простатичниот карцином, се одредува според препораките на “American Joint Committee on Cancer” (AJCC)³. Одредување на стадиум на болест се изведува на примероци од радикална простатектомија.

T категоријата се дели на орган ограничен тумор, тумор со екстрапростатична екстензија и локално напреднат тумор. Орган ограничен тумор (pT2) се дели во 3 подгрупи и тоа:

pT2a – тумор присутен во еден лобус во помалку од 50% од лобусот,

pT2b – тумор локализиран на еден лобус во над 50% од лобусот и

pT2c – тумор локализиран во двата лобуса на простатата без оглед на количината на туморска маса.

Тумор со екстрапростатична екстензија (pT3) се дели во 2 подгрупи и тоа:

pT3a – тумор кој пробива простатична капсула или инфилтрира врат на мочен меур и

pT3b – тумор кој инфилтрира во семинални везикули.

Локално напреднати тумори (pT4) се тумори кои вршат инвазија на соседни структури како ректум, леватор мускул и / или пелвичен сид.

N категоријата опфаќа отсуство на метастази во регионални лимфни јазли (pN0) и присуство на метастази во регионални лимфни јазли (pN1).

M категоријата опфаќа отсуство на далечни метастази M0 и присуство на далечни метастази (M1), а во оваа група има и 3 подгрупи и тоа присуство на метастази во нерегионални лимфни јазли M1a, присуство на метастази во коски M1b и присуство на далечни метастази во други локализации без оглед на присуство или отсуство на метастази во коски M1c³.

Со групирање на статусот на туморот и лимфните јазли, но и со групирање на серумското ниво на простата специфичниот антиген и Gleason-овиот градус кај локализирана болест се добиваат 4 стадиуми на болеста³.

Стадиумот на болеста исто така претставува еден од главните прогностички фактори кај простатичен карцином. Постои јасна корелација помеѓу Gleason-овиот градус на болеста и серумско ниво на простата специфичниот антиген и TNM стадиумот на болеста³⁷. Патолошкиот стадиум е најрелевантен предиктор за прогноза на болеста по направена радикална простатектомија. Неговата предиктивна моќ е најголема кај индивидуи со локализирана болест поради прогностички и терапевтски импликации⁵³.

Со оглед на тоа дека во оваа студија материјалот кој беше обработуван претставува оперативен материјал од радикална простатектомија со

лимфаденектомија без позитивен наод на метастатски депозити во регионалните лимфни јазли тогаш патолошки одредениот Т статус и клиничкиот податок за отсуство на далечни метастази M=0 всушност го дава и патолошкиот стадиум на болеста, како што следи (Табела 27 и 28):

Табела 27. Патолошка Т категорија (pT)

pT2	Орган ограничена болест
T2a	Унилатерална болест - тумор присутен во помалку од половина од еден лобус на простатата
T2b	Унилатерална болест - тумор присутен во повеќе од половина од еден лобус на простатата
T2c	Билатерална болест
T3	Екстрапростатична екстензија
T3a	Екстрапростатична екстензија со пробив на простатична капсула или микроскопска инвазија на врат на мочен меур
T3b	Инвазија на семинални везикули
T4	Инвазија на ректум, леватор мускули и/или пелвичен сид

Табела 28. Одредување на стадиум кај простатичен карцином според TNM класификацијата (AJCC 2010)³

Стадиум	T	N	M	PSA	Gleason
I	T1a-c	N0	M0	PSA < 10	Gleason ≤ 6
	T2a	N0	M0	PSA < 10	Gleason ≤ 6
	T1-2a	N0	M0	PSA x	Gleason x
IIA	T1a-c	N0	M0	PSA < 20	Gleason 7
	T1a-c	N0	M0	PSA ≥ 10 < 20	Gleason ≤ 6
	T2a	N0	M0	PSA ≥ 10 < 20	Gleason ≤ 6
	T2a	N0	M0	PSA < 20	Gleason 7
	T2b	N0	M0	PSA < 20	Gleason ≤ 7
	T2b	N0	M0	PSA x	Gleason x
IIb	T2c	N0	M0	Било кое PSA	Било кој Gleason
	T1-2	N0	M0	PSA ≥ 20	Било кој Gleason
	T1-2	N0	M0	Било кое PSA	Gleason ≥ 8
III	T3a-b	N0	M0	Било кое PSA	Било кој Gleason
IV	T4	N0	M0	Било кое PSA	Било кој Gleason
	Било кој T	N1	M0	Било кое PSA	Било кој Gleason
	Било кој T	Било кој N	M1	Било кое PSA	Било кој Gleason

7.4. Третман на простатичен карцином

Неопходно е да се потенцира дека простатичниот карцином се разликува од другите по своите две уникатни карактеристики, односно спориот раст и неговото појавување ексклузивно кај мажи над 50 години. Поради спориот раст на овој малигном потребни се многу години да се увиди ефект од различни терапевтски модалитети.

Локализиран простатичен карцином вклучува тумори кои се клинички локализирани на ниво на простатата (T1 и T2 тумори). Третманот на локализиран простатичен карцином зависи од неколку клучни фактори како возраста на пациентот и присутни коморбидитети, биолошките карактеристики

на туморот односно Gleason-овиот градус, процентот на туморско ткиво во биоптичен материјал, клиничкиот и радиолошкиот стадиум на болеста, изборот на пациентот соочен со разните терапевтски процедури и можни компликации. Со цел да се олесни донесувањето на одлука за терапија на локализиран простатичен карцином конструирани се ризик групи според ризик од појава на рецидиви и според времето на севкупно преживување⁵⁴.

Простатични карциноми со низок ризик се карциноми со преоперативно серумско ниво на простата специфичен антиген под 10 ng/mL и Gleason-ов скор од 1 - 6 и клинички стадиум T1 и T2a

Простатични карциноми со среден ризик се карциноми со преоперативно серумско ниво на простата специфичен антиген од 10-20 ng/mL или Gleason-ов скор од 7 или клинички стадиум T2b и T2c.

Простатични карциноми со висок ризик се карциноми со преоперативно серумско ниво на простата специфичен антиген над 20 ng/mL или Gleason-ов скор од 8 - 10 или клинички стадиум T3 и T4.

Мажи со низок ризик на простатичен карцином може да се третираат радикално со хирургија, радијациона терапија или брахитерапија или може да се третираат конзервативно преку “внимателно следење“ и “активно набљудување“. Радикален третман вклучува радикална простатектомија, “external beam” радијациона терапија и брахитерапија.

Радикална простатектомија подразбира хируршко отстранување на простатата со семиналните везикули и претставува златен стандард за третман на простатичен карцином со низок ризик и среден ризик. Постојат неколку модалитети на хируршки техники како ретропубична, перинеална, лапароскопска и роботска радикална простатектомија. Европската Асоцијација на Уролози дава насоки и препораки за како и кога да се изведува радикална простатектомија⁵⁵. Според овие препораки индикации за радикална простатектомија се низок и среден ризик на простатичен карцином (T1a - T2b и Gleason-ов скор 2 - 7 и PSA под 20ng/mL) и очекуван животен век над 10 години. Како опција оваа операција се нуди и на пациенти со стадиум T1a и очекуван животен век над 15 години или Gleason-ов скор 7, кај селектирани пациенти со простатичен карцином со низок волумен и висок ризик (T3a или Gleason-ов скор 8 - 10 или PSA над 20ng/mL) и кај високо селектирани пациенти со простатичен карцином со многу висок ризик (T3b - T4 N0 или N1) но само во контекст на мултимодалитетен третман.

External beam радијациона терапија претставува третирање на простата со околу 74Gy радијација поделено на фракции во период од 6 до 7 недели. Во зависност од тоа дали болеста е од низок, среден или висок ризик конкурентно се дава неoadјувантна терапија во рок од 3 месеци, адјувантна терапија во рок од 2,5 години или хормонална терапија. Кај адјувантната терапија се користи лутеинизирачки хормон ослободувачки хормон агонист, а кај хормоналната терапија се дава анти-андрогена медикација.

Компјутеризирана томографија или магнетна резонанца се користи да се дефинира таргет подрачје за администрација на радиотерапијата. External beam радијационата терапија дава долготрајно преживување слично на радикалната простатектомија и овозможува скоро идентичен квалитет на живот како хируршкиот третман. Оваа терапија се спроведува кај постари пациенти над 65 годишна возраст со поголема веројатност од метастатска болест или кај пациенти кои одбиваат хируршки третман.

Брахитерапија или ниска доза трансперинеална брахитерапија вклучува поставување на мали радиоактивни “семиња” под анестезија. По мапирање на простатата 80 - 100 семиња на јод-125 или цезиум-135 се поставуваат со цел да се покрие целосно простатата. Како несакани ефекти се појавуваат уринарна ретенција, хематурија и инфекција. Постои помал морбидитет кај брахитерапија споредено со радикална простатектомија или external beam радијациона терапија, но со понагласени несакани ефекти како инконтиненција, симптоми на долни уринарни патишта, фекална ургентност, ректални симптоми сексуална дисфункција и уретрални стриктури. Оваа терапија се препорачува кај пациенти со Gleason-ов скор под 6, иницијално ниво на PSA под 10ng/mL, под 50% зафатеност на цилиндри од биопсија со туморско ткиво и волумен на простата под 50cm³.

Хормонална терапија кај локализиран простатичен карцином се дава обично како неоадјувантен агенс, што овозможува простатичниот волумен да се намали за 30-40% при што се намалува и волуменот на туморот и се овозможува намалување на терапевтското поле. Се користи заедно со брахитерапија за да се редуцира волуменот на простатата со цел да се подобри брахитерапијата.

Нова терапија претставува висок интензитет фокусирана ултрасонографија, при што се користи енергија на зраци за да се предизвика коагулативна некроза на простатичното ткиво. Се користи кај локализиран простатичен карцином со низок волумен.

Криотерапија е апликација на ниски температури користејќи течен аргон или азот преку шупливи игли кои се инсертираат во простатата трансперинеално. Оваа терапија дава тешки несакани ефекти како ректовезикални фистули, инконтиненција или еректилна дисфункција поради што се користи само како третман откако другите терапевтски пристапи како external beam радијациона терапија или брахитерапија се покажале како неуспешни⁵³.

Конзервативен третман се користи кај мажи со локализиран карцином на простата со низок ризик а бројот на вакви рано дијагностицирани простатични карциноми е во пораст. Со цел да се спречи непотребен третман се појавиле две шеми на конзервативен менаџмент на пациенти со простатичен карцином а тоа се “внимателно следење“ и “активно набљудување“.

“Активно набљудување” се базира на претпоставката дека некои, но не сите, пациенти може да имаат бенефит од третманот на примарниот простатичен карцином. Активното набљудување има две цели:

(1) да се даде дефинитивен третман за мажи со локализиран карцином, кај кои болеста најверојатно ќе прогредира и

(2) да се редуцира ризикот од третман поврзани компликации кај мажи со карцином кој најверојатно нема да прогредира.

Ова набљудување подразбира периодични физикални прегледи и тестирање на нивото на серумско PSA и периодични повторувања на простатични биопсии за утврдување на прогресија на болеста. Пациенти со тумори со низок ризик, кои подразбираат низок Gleason-ов скор, ниско ниво на серумско PSA и низок клинички стадиум на болеста, кај кои има низок ризик за клиничка прогресија на болеста во период од првите 10 до 15 години по поставување на дијагнозата, се идеални пациенти за активно набљудување⁵⁶⁻⁵⁸.

Се користи со цел да се избегне морбидитет кој се јавува кај радикален третман, но и да не се пропушти можноста за ефективен третман. Тоа подразбира следење на серумско ниво на PSA, дигитален ректален преглед,

повторувачки биопсии на простата и магнетна резонанца. Кандидати за активно набљудување се пациенти со простатичен карцином со клинички стадиум T1c/T2, Gleason-ов скор 1-6, PSA под 10ng/mL, PSA густина под 0,15 ng/mL, помалку од 3 позитивни цилиндри од 10 - 12 цилиндри по направена иглена биопсија на простата, присуство на тумор во под 10мм од цилиндер, пациенти кои се физички спремни за радикален третман и пациенти помеѓу 50 - 80 годишна возраст.

“Внимателно следење” се базира на претпоставката дека некои пациенти, односно пациентите со висок ризик на болест, што се манифестира со високо серумско ниво на простата специфичниот антиген, висок градус и клинички стадиум на болеста нема да имаат бенефит од дефинитивниот третман на примарниот простатичен карцином. Одлуката за “внимателно следење” се носи во моментот на дијагностицирање на болеста при што се отфрла друг тип на терапија и единствено се користи палијативен третман за локалната или метастатска прогресија на болеста. Палијативниот третман подразбира трансуретрална ресекција заради опструкција на уринарните патишта и хормонална терапија или радиотерапија за палијација на метастатските лезии⁵⁵. Опфаќа конзервативен менаџмент на пациентите со простатичен карцином со одредување на серумското ниво на PSA и набљудување на симптомите, се до појава на локална или системска прогресија на болеста кога кај пациентот се третираат уринарните симптоми, или се дава палијативен третман за метастатска болест, како што е погоре кажано. Овој пристап се користи за пациенти со над 75 годишна возраст или помлади пациенти со други назначени коморбидитети. Селективни критериуми за внимателно следење се присуство на асимптоматска клинички локализирана болест, клинички стадиум T1 - 3, Gleason-ов скор 1 - 7, било кое ниво на серумско PSA и најважен критериум е неможност за радикален третман обично поради возраст на пациент или присуство на коморбидитети⁵⁶⁻⁵⁸.

Земајќи ги во предвид овие факти, поради уникатноста на простатичниот карцином, кој е споро растечки малигном кај постарата популација на мажи, а со цел надоградба на терапевтските модалитети како внимателно следење и активно набљудување, во Светот се прават базични истражувања, кои би можеле кај овие пациенти да утврдат дополнителни карактеристики на туморот за одредување на агресивноста на туморот и евентуална прогресија на туморот, со конечна цел за формулирање на нови неинвазивни терапевтски стратегии. Досега многу истражувачи се задржале на испитување на епителните клетки на простатичниот карцином, кои не довеле до голем успех, но во денешно време почнува и интензивно да се истражува стромалниот компартман на карциномот асоциран со тумор. Првичните резултати даваат голема надеж, бидејќи укажуваат на голема улога на стромалните клетки во близина на простатичниот карцином, кои би можеле да бидат критични во одредување на инвазивниот потенцијал на малигните епителни клетки^{1,13,21,28}.

Напреднат простатичен карцином, кој подразбира присуство на метастази од простатичен карцином, е неизлечива болест. Целта на терапијата е единствено палијација. Главната карактеристика е дека простатичниот карцином е хормон сензитивен тумор и дека кастрација или давање на естрогени има терапевтска активност кај метастатски простатичен карцином. Метастатски хормон сензитивен простатичен карцином се третира со хормон депривација. Наједноставна андроген супресија е кастрација. Главен несакаан ефект е губиток на потенција. Прва линија на хормон супресија е кастрација со

билатерална орхидектомија, или администрација на агонисти на лутеинизиращки хормон ослободувачки хормон (LH-RH) при што се добива комплетна андрогена блокада. Оваа комплетна андрогена блокада не доведува до сигнификантно преживување кај пациенти со метастатски простатичен карцином.

Прогресијата на простатичниот карцином во хормон резистентен карцином е универзален феномен, кој не е потполно разбран. Кај хормон-резистентниот карцином не постои третман кој влијае на преживувањето. Се користи радиотерапија за третман на болката и радиофармацевтици за третман на коскените болки (стронциум). Како втора и трета линија на хормонална терапија се користат анти-андрогени, инхибитори на ароматаза и естрогени⁵⁹.

Туморогенезата на простатичниот карцином примарно е регулирана со врзување на лиганди за AR и следствена појава на транскрипционални сигнали кои доведуваат до клеточна пролиферација и преживување на туморските клетки. Напреднатиот метастатски простатичен карцином, како што погоре е кажано, се лекува со медицинска или хируршка кастрација која доведува до андроген депривација со што настанува ремисија на болеста во времетраење од 14 до 30 месеци. Иако сите пациенти иницијално реагираат на хормон депривациона терапија кај повеќето пациенти болеста прогредира а рекурентниот тумор активно ре-експресира AR. Повратокот на AR сигнализирањето кај кастрирани пациенти може да е резултат на неколку механизми посредувани преку AR, како што се независна продукција на андрогени од страна на туморските клетки, амплификација на AR протеинот, или преку механизми кои не се посредувани преку AR односно механизми кои прават bypass на AR како што се коактиватори и трансактиватори.

Кога ќе се појави рекурентен тумор, кај околу 10-30% од пациентите ќе има одговор на секундарни хормонални терапии како што се естрогени, антиандрогени или адренална андроген таргет терапија. Кај пациенти кај кои болеста и понатаму прогредира се дава Docetaxel со преднизон хемотерапија, која е единствена терапија кај хормон резистентни простатични тумори. Друг терапевтски пристап во моментот не постои, но затоа интензивно се истражуваат нови терапевтски модалитети. Терапевтски стратегии кои даваат надеж за третирање на пациенти со андроген резистентен простатичен карцином се оптималното користење на андроген депривационата терапија со користење на инхибитори на биосинтезата на андроген од адреналната жлезда, како и пронаоѓање на нови андроген антагонисти. Доведување до деплеција на AR сигнализирањето може да делува кај пациентите кои претходно биле резистентни на хормонска терапија⁶⁰.

7.5. Стромални маркери

7.5.1. Реактивна строма во простатична карциногенеза

Нормалните простатични стромални клетки во адултната простата се одговорни за контролата на раст на простатичното ткиво, односно за одржување на мирната непролиферативна состојба на простатичното ткиво. Многу автори ја испитувале улогата на стромалните клетки во иницијација и промоција на карциногенеза. Јасно се забележани сличности со стромалната микросредина при процес на заздравување на рана, опишана уште од Dvorak кој канцерот го

нарекол рана која не заздравува⁶¹. Туморската строма која е позната под повеќе имиња како канцер асоцирана строма, канцер асоцирани фибробласти, тумор асоцирана строма или реактивна строма се разликува од нормалната строма²¹.

Нормалниот хуман стромален компартман еволуирал со вродена пластичност, со цел брзо да одговори на секакви новонастанати ситуации, како што е заздравување на рана и нарушена хомеостаза што може да доведе и до појава на рак. Со оглед на оваа улога, стромалниот компартман во микросредината, непосредно до епителниот компартман, делува координирано кога епителот ќе биде оштетен. Микроорганизмите се потенцијално присутни во луменот на дуктусите на епителните ацинуси и на апикалната површина на епителните клетки. Тие може да предизвикаат оштетување на клетките. При такво оштетување се јавува брз и координиран стромален одговор за да се спречат микроорганизмите да стигнат до микроциркулацијата и да се спречи нивно системско ширење што може да доведе до смрт.

Фенотипските и генотипските алтерации кои се случуваат во клетките во тек на одговорот на оштетување на ткивото се наречени реактивна строма. Оваа алтерирана реактивна строма е многу слична на стромата која се појавува во процесот на заздравување на рана и вклучува матрикс ремоделирање и алтерирана експресија на фактори на раст и цитокини⁶²⁻⁶³. Во простатичниот карцином реактивна строма се појавува во тек на премалигна простатична интраепителна неоплазија и ко-еволуира со карциномот, се до карцином од висок градус локализиран на ниво на простатата^{28,64-66}. Реактивната строма во простатичниот карцином е составена од карцином асоцирани фибробласти и миофибробласти. Клеточниот тип или клеточните типови како и потеклото на овие клетки не е потполно разбрано. Реактивната строма може да еволуира со активација на претходно постоечките фибробласти, од vimentin позитивните периацинарни клетки, од циркулирачките прогенитор клетки кои потекнуваат од масната срцевина, од перицитите на крвните садови или од други мезенхималните стем/прогенитор клетки присутни во простатата^{28,65}. Точното потекло и биологијата на овие клетки сеуште не е разјаснето иако неколку автори идентифицирале различни извори на овие уникатни реактивни стромални клетки⁶⁷⁻⁷⁰.

Стромалната микросредина се појавува како клучен играч во растот и развитокот на рак^{13,28,71-72}. Добро е познато дека прогресијата на орган ограничен тумор е под влијание на ангиогенезата и инфламаторните клетки^{67,73-79}. Реактивните стромални клетки во туморската микросредина координирано ја модулираат прогресијата и агресивноста на карциномот и регулираат одредени аспекти на ангиогенезата и инфламацијата^{13,71,78-81}.

Фибробластите можат да покажат неколку различни фенотипски и генотипски карактеристики. Претходната категоризација на активирани фибробласти најверојатно претставува симплифицирање на овој феномен. Пластичноста на активираните реактивни фибробласти почнува полака да се открива исто како и фенотипската разноликост на макрофагите во туморската микросредина. Неколку автори внимателно ги проучувале активираните форми на фибробластите кои се наречени миофибробласти, или карцином асоцирани фибробласти во простатичниот карцином^{13,79,81-85}. Не е до крај разјаснето дали карцином асоцираните фибробласти, или миофибробласти претставуваат различни клеточни типови, или се ист клеточен тип со различна генска експресија. Уште помалку е разјаснето потеклото на овие клетки и механизмот кој доведува до нивна активација при појава на карцином. И покрај овие

недоразбирања широко е прифатен фактот дека активираните фибробласти се важни модулатори во туморогенеза⁸⁶.

7.5.2. Миофибробласт концепт

Карцином асоцираните фибробласти и миофибробластите ја формираат реактивната строма во фокуси на добро диференциран карцином²⁸. Миофибробластите функционираат и во тек на процесот на заздравување на рана во повеќе ткива. Присуство на миофибробласти прв пат било идентификувано уште пред 45 години како vimentin-позитивни, desmin-негативни клетки во склоп на фибриларната мрежа на гранулационото ткиво^{87,88}.

Морфолошки и врз база на експресија на цитоскелетни протеини миофибробластите се наоѓаат помеѓу фибробластите и мазномускулните клетки⁸⁹. Тие се карактеризираат со проминентен груб ендоплазматски ретикулум како кај фибробластите и со контрактилни миофиламенти како кај мазномускулните клетки со зголемена експресија на Vimentin и мазномускулен актин и намалена експресија на калпонин и мазномускулен миозин⁹⁰⁻⁹¹. Миофибробластите се широко имплицирани како клетки кои промовираат канцер во стромата^{13,92-93}.

Миофибробластите пролифрираат и синтетизираат протеини и имаат контрактилни способности, а сите овие карактеристики ги делат и фибробластите и мазномускулните клетки⁹⁴. Овие уникатни клетки имаат и дополнителна способност да формираат гранулационо ткиво и матрикс во исто време, кога прават и контракции со цел да ја затворат раната. Оваа вродена разноликост го сместува миофибробластот во централна позиција во темелно оркестрираниот процес за одржување на ткивна хомеостаза.

Подоцна овие клетки се идентификувани и во склоп на дезмоплатична реакција кај карцином на дојка и други типови на аденокарцином⁹⁵⁻⁹⁹. Миофибробластот фаворизира преживување на клетките од својата околина со создавање на средина која овозможува заздравување на рана⁹⁴.

Реактивната строма е асоцирана со зголемен број на миофибробласти, зголемена капиларна густина и депозиција на колаген тип I, како и други екстрацелуларни матрикс супстрати^{28,66,72,100}. Во простатичниот карцином реактивната строма во Gleason градус 3 простатичен канцер е составена од околу 50% фибробласти и 50% миофибробласти додека во фокуси на Gleason градус 4 простатичен карцином стромата е претежно составена од миофибробласти^{28,66}. Стромалните маркери pro-collagen I, tensin, fibroblast activation protein, vimentin и α -smooth muscle actin се експресираат кај миофибробластите рано во создавањето на реактивна строма кај простатичен карцином²⁸. Истите маркери се експресираат и кај процес на заздравување на рана и овие биомаркери се типични за реактивна строма која се појавува кај процесот на заздравување на рана^{63,65}. Додека нормалните фибробласти се гледаат како главни клетки во одржување на ткивна хомеостаза во отсуство на инсулт, нивните активирани сродници (миофибробласти, карцином асоцирани фибробласти) промовираат туморска прогресија најверојатно преку способноста за репарација и преживување што е неопходно и за нов раст и ангиогенеза.

Активацијата на миофибробластите или карцином асоцираните фибробласти е предвидлив одговор на нарушен или оштетен епител без оглед дали оштетувањето настанало заради појава на рана, заради појава на бенигна

простатична хиперплазија, појава на хронична инфламација, или појава на карцином. Оваа активација доведува до репарација и според тоа влијае на биологијата на околниот епител. Неколку фактори влијаат на ткивна хомеостаза, инфламаторниот одговор и ангиогенезата кои се инволвирани во активацијата и биологијата на реактивната строма. При појава на оштетување од било која природа се појавува реактивна строма која најверојатно може да промовира појава и на тумор. Поради тоа про-туморогените механизми на факторите на раст кои се појавуваат кај реактивната строма може во иднина да претставуваат фокус за нови терапевтски пристапи¹⁰¹.

Потеклото на фибробласти и миофибробласти во реактивната строма е активно подрачје на истражување. Зависно од типот на ткивото кое се ремоделира прекурзорите на миофибробластите се регрутираат од различни клеточни компартмани, од кои најчести се резидентните фибробласти^{90,102}. Други мезенхимални клетки кои служат како прогенитори на миофибробластите се перипитите и мазномускулните клетки од крвните судови кои играат и важна улога и во репарацијата на самите крвни садови^{103,104}. Епителни клетки се исто така предложени како прогенитори на миофибробластите во реактивната строма, преку епително-мезенхимална транзиција^{67,105-106}. Како алтернативни извори за миофибробластите предложени се уште и циркулирачки клетки познати како фиброцити¹⁰⁷⁻¹¹¹ или хематопоеетски клетки, иако за овие клетки не се знае дали се одговорни за инфламаторниот процес во реактивната строма, или се трансформираат во миофибробласти. Без оглед на потеклото во генезата на реактивната строма на миофибробластите, истражувањата се фокусираат на резидентните стромални клетки. Кај мали повреди фибробласти може да мигрираат од околно неоштетено ткиво, додека кај големи повреди може да се регрутираат и циркулирачки фиброцити кои ќе се трансформираат во миофибробласти.

Иако реактивната строма во процесот на заздравување на рана е слична со реактивната строма кај карциномот сепак лимитирачката природа на заздравувањето на раната е отсутна кај карциномот. Стромалниот и епителниот компартман кај карциномот наликува дека ко-еволуираат и се самоодржуваат во текот на прогресијата на карциномот⁶⁵. За да се регулира стромалниот компартман, канцер асоцираните фактори работат во координација со протеините и факторите кои ги секретираат крвните садови, имуно асоцираните клетки, па дури и нервите¹¹²⁻¹¹³. Конечниот резултат е одговор од страна и на циркулирачките клетки и на резидентните фибробласти за повторно да создадат хомеостаза. Главната разлика кај канцерот најверојатно претставува потенцијалот на овие стромални клетки да ко-еволуираат со карциномските клетки на оркестриран и прилично индолентен начин кој трае со месеци па и години, многу повеќе отколку типичното сценарио на заздравување на рана. Можно е дека како што туморот расте така истиот да вклучува се повеќе и повеќе стромални клеточни елементи за да се развијат во реактивна строма, бидејќи потребите во микросредината се зголемуваат, што доведува до одржлив воспалителен одговор, кој се гледа во модели на простатични канцери¹¹²⁻¹¹³.

Модификациите на стромалната средина во карциногенезата јасно се забележуваат при набљудување на стромата веднаш до епителните клетки на простатичниот карцином^{28,64,72,114}. Во тек на карциногенеза составот на простатичната строма често се менува со појава на стромален фенотип кој се карактеризира со губиток на добро диференцираните мазномускулни клетки,

појава на миофибробласти и зголемување на количината на екстрацелуларниот колаген^{28,64-65}.

Молекуларните промени во простатичната туморска строма вклучуваат промени во експресијата на клеточното сигнализирање и имуномодулаторни протеини¹¹⁵⁻¹¹⁶. Постојат сугестии дека туморската строма има потенцијал да стане цел на терапија што покажува и преклиничкиот развој на некои иновативни пристапи као активација на венот од пчела со протеази кои се експресирани во строма на простатичен канцер.

7.5.3. Заздравување на рана како аналогича за карциногенеза на строма

Во хипотезата за реактивна строма⁶⁶, стромата на простатата се корелира со гранулационо ткиво кај процесот на заздравување на рана поради сличните биолошки ефекти. Заздравување на рана и создавање на туморска строма делат многу важни карактеристики. Во двата процеса прво се случува инфилтрација на плазматски протеини, вклучувајќи фибриноген, фибронектин и плазминоген. Екстраваскуларниот тромб составен од фибрин-фибронектин служи како временска строма создавајќи матрикс за миграција на макрофаги, фибробласти и нови капилари⁶¹.

Во простатичната карциногенеза како и кај секое заздравување на рана микросредината е направена да промовира раст што корелира со промовирање на преживувањето и пролифракцијата на карциномските клетки од страна на стромалните клетки.

Карцином асоцираната строма може да промовира карциногенеза во генетски иницирани простатични епителни клетки^{13,20}. Некои автори покажале дека присуството и квалитетот на реактивната строма во туморот било сигнификантен предиктор за рецидив на простатичен карцином⁶⁴. Волуменот на стромата се покажал како независен предиктор за прогресија на тумори кои припаѓаат на групата Gleason скор 7, кои претставуваат тумори кои се на граница помеѓу тумори со низок и висок ризик за прогресија. Користејќи ги традиционалните методи за предвидување на ризик за прогресија кај туморите од група со Gleason скор 7 тешко може да се предвиди однесувањето на туморот поради што стромално скорирање може да ја подобри прецизноста на прогнозата²¹.

7.5.4. Стромални промени кај карцином на простатата и експресија на стромални маркери

Во оваа студија се користеа стромалните маркери Vimentin, α - SMA и Desmin и се користеше хистохемиско бојење Trichrome Masson. Стромата асоцирана со простатичен карцином покажува јасна “диференцијација” кон примитивен фенотип кој подразбира губење на експресија на “високо диференцираниот” мазномускулен маркер Desmin и појава на експресија на “примитивниот” стромален маркер Vimentin. Оваа “примитивна” строма се должи на појавата на стромални миофибробласти (карцином асоцирани фибробласти) кои коекспресираат Vimentin и α -SMA^{1,13}.

Како што веќе погоре е кажано во тек на прогресија на простатичен карцином се случуваат стромални реакции при што се создава стромална микросредина која е фундаментално различна од стромата во нормална

простатична жлезда или како во нашата студија во стромата на бенигна простатична хиперплазија²⁸.

Мазно-мускулните клетки се преобладајќи во нормална простатична строма и ВРН, додека реактивната строма во склоп на простатичен карцином е збогатена со присуство на миофибробласти и фибробласти и покажува значителен пад во бројот на мазномускулни клеточни елементи²⁸. Некои студии кои користеле двојно имунохистохемско пребојување користејќи ги антителата Vimentin и α -SMA јасно дефинирале дека во зоните на реактивна строма бројот на миофибробласти кои коекспресираат Vimentin и α -SMA досега над 50%²⁸. Не е до крај разјаснето како се случува зголемувањето на бројот на миофибробластите, или карцином асоцираните фибробласти во реактивната туморска строма. Според една претпоставка алтерациите во фенотипот на стромалните клетки и покачената синтеза на компонентите на екстрацелуларниот матрикс кои се јавуваат уште во подрачјата на простатична интраепителна неоплазија може да доведат до абнормално епително-мазно-мускулно сигнализирање во тек на простатичната карциногенеза, што секундарно доведува до мазно-мускулна дедиференцијација¹¹⁷. Според други автори миофибробластите во реактивната строма најверојатно потекнуваат од периацинарен прстен на фибробласти, кои се во непосредна близина на фокуси на простатична интраепителна неоплазија, а не потекнуваат од самите мазномускулни клетки со нивна дедиференцијација²⁸. Стромалните промени паралелно се зголемуваат со појавата на и прогресијата на простатичниот карцином. Канцерските клетки наместо буквално да вршат инвазија на околната простатична строма тие индуцираат појава на реактивна строма која коеволуира со карциномските клетки. Заедно карциномските клетки и реактивната строма го истиснуваат околното нормално ткиво за да создадат карциномски фокуси кои конечно ќе го создадат туморот²⁸.

Откако ќе се создаде реактивна строма главното прашање е како таа реактивна строма делува на степенот на туморогенеза на простатичниот карцином. Познато е дека стромално-епителните интеракции се важни во простатичниот развој и одржување на адултен фенотип, па според тоа, замената на нормална со реактивна строма најверојатно ги нарушува овие интеракции и влијае врз прогресија на простатичен карцином^{28,117}.

За одговор на овие прашања правени се студии на молекуларно и генетско ниво. Експериментално е потврдено дека фибробластите можат да ја појачаат туморогенезата и дека оваа особина не се однесува на фибробластите генерално туку на одредени фибробластични клетки¹³.

Се претпоставува дека иницијација на простатичната карциногенеза инволвира генетски промени на простатичниот епител по кои настанува секвенцијално нарушување на реципрочни хомеостатски интеракции помеѓу простатичната мазна мускулатура и асоцираниот епител. Оваа алтерирана сигнализација доведува до дедиференцијација и на простатичниот карцином и на околната мазна мускулатура. Иако фенотипот на мазната мускулатура се менува, тумор-асоцираните стромални клетки се претпоставува дека остануваат генетски нормални^{1,13,28}. Оваа претпоставка се должи на *in vivo* експериментални модели каде се користени генетски нормални карцином асоцирани фибробласти, што се увидело со кариотипски анализи и компаративна геномска хибридизација, при што се увидело дека овие карцином асоцирани фибробласти не покажале раст кога биле засадени во ткиво самостојно, додека истите клетки, кога биле помешани со имортализирани

епителни клетки од бенигна простатична хиперплазија (ткивна рекомбинација), индуцирале развој на лошо диференциран простатичен карцином кој покажал брз раст.

Користејќи *in vivo* модел, испитувани се ефектите на карцином-асоцираните фибробласти врз епителните клетки. Доколку претходната хипотеза е точна хуманите карцином асоцирани фибробласти би требало да имаат различни ефекти врз епителната пролиферација и диференцијација за разлика од нормалните фибробласти кои потекнуваат од бенигно хумано простатично ткиво^{1,13}.

Повеќе студии демонстрирале дека стромалните клетки кои потекнуваат од бенигни и малигни извори биле способни да доведат до диференцијациони ефекти врз нетуморогените хумани простатични епителни клетки *in vivo*.

Карцином асоцираните фибробласти, за разлика од нормалните фибробласти, биле способни да индуцираат инвазивен фенотип кај имортализирани, но нетуморогени, хумани простатични епителни клеточни линии. Истите фибробласти не успеале да го индуцираат овој фенотип кај генетски нормални хумани простатични епителни клетки, иако биле забележани ефекти врз епителната диференцијација¹.

Од овие податоци произлегува дека:

1) во хумана простатична карциногенеза можат да бидат важни и генетски и епигенетски промени,

2) карцином асоцираните фибробласти се способни да стимулираат прогресија на инициран епител додека нормалните фибробласти се неспособни за стимулирање на прогресија и

3) дека карцином асоцираните фибробласти се неспособни да предизвикаат иницијација кај генетски нормален епител¹.

In vivo и *in vitro* студиите покажале дека:

1) карцином асоцираните фибробласти не формираат тумори кога растат во отсуство на епител,

2) карцином асоцираните фибробласти стимулираат прогресија на генетски алтериран нетумороген хуман простатичен епител кон карциноматозен фенотип,

3) истите фибробласти се неспособни да стимулираат иницијација на генетски нормален хуман простатичен епител и

4) стромалните клетки од немалигни извори не промовираат туморогенеза кај генетски алтериран хуман простатичен епител под идентични состојби¹.

Скорешни податоци, добиени при користење на *in vitro* системи на ко-култура, укажуваат дека карцином асоцираните фибробласти може да бидат способни да ја зголемат пролиферацијата и да го намалат степенот на смртност на хуманите простатични епителни клетки кај бенигна простатична хиперплазија^{1,13}.

Стромалните алтерации во склоп на простатичниот карцином се евидентни во сите досегашни истражувања. Во моментов се бараат начини да се квантифицираат стромалните алтерации кои би можеле да се употребат и во рутинската пракса. Има студии кои укажуваат на корисноста на дефинирање и скорирање на реактивната строма кај простатичните карциноми. Други автори креираат и скорирачки системи за квантифицирање на реактивни стромални промени во клинички напреднати форми на простатичен карцином^{28-30,64}. Се предложува и користење на таканаречен стромален градус кој идентификува

количина на реактивна строма асоцирана со простатичен карцином како процент од тотален волумен на тумор⁶⁴. Според овие автори се добиваат два посебни типа на простатичен карцином: простатични карциноми со Gleason-ов градус 1 или 2 со обилна реактивна строма со стромален скор 2 или 3 кои имаат подобра прогноза од простатични карциноми со стромален скор 0 и Gleason-ов градус 3 што укажува на тумори со скудна стромална компонента или строма независни напреднати простатични карциноми⁶⁴. Отсуството на стромална компонента кај туморите е придружена со висок епителен градус и лоша прогноза кај пациентите во споредба со пациенти кај кои туморот содржи одредена количина на туморска строма. Во случаи на скудна строма за преживувањето на пациентите предиктивно може да биде само градуирањето на епителната компонента на туморот⁶⁴.

Некои автори за да ја прикажат структурата на стромата кај простатичен карцином, да го одредат стромалниот градус и да ја одредат нејзината улога во карциногенезата и прогресијата на туморот користеле хистохемиски бојења со Trichrome Masson и имунохистохемиски бојења со Vimentin, α - SMA и Desmin како и ние во нашата студија^{28-30,64}

Во голем број студии, како и во нашата, се покажала директна позитивна корелација помеѓу индексот на пребојување одредуван со бојењето Trichrome Masson и експресијата на стромалните клетки на антителото Vimentin^{28-30,64}. Овие студии покажале и инверзна корелација помеѓу пребојувањето Trichrome Masson со експресијата на антителото Desmin. Во една од овие студии покажана е инверзна корелација помеѓу пребојувањето Trichrome Masson и Gleason-овиот скор³⁰ без наод на корелација помеѓу пребојувањето Trichrome Masson и PSA или екстрапростатична екстензија на болеста³⁰. Во нашата студија вредноста на Spearman-овиот коефициент и r вредноста покажаа дека интензитетот на Trichrome Masson бојењето позитивно корелира со експресијата на Vimentin ($P = 0,68$ $p < 0,001$) а корелацијата е високо сигнификантна. Од останатите клиничко патолошки параметри во нашата студија се покажа корелација на Trichrome Masson во однос на Gleason-овиот градус ($R = 0,27$ $p = 0,023$), со екстрапростатичната екстензија на болеста ($R = 0,24$ $p = 0,049$) и инверзна корелација со експресијата на антителото Desmin ($R = - 0,28$ $p = 0,023$).

Проспективни студии покажале дека експресијата на Vimentin антителото во клетките на туморската строма е асоцирана со пократок период на отсуство на болест односно со побрз релапс на болеста поради што Vimentin експресијата во туморската строма може да служи како корисен маркер за идентификација на пациенти кои би имале подобар или полош одговор на кастрациона терапија^{28,30}. Значи пациенти кои претрпеле кастрациона терапија и кои имаат идентична или несигнификантно различна експресија на AR, а во тумор асоцираната строма имаат поголемо количество на карцином асоцирани миофибробласт се очекува да имаат побрз релапс. Една студија покажала позитивна корелација помеѓу Vimentin експресија и интензитет на пребојувањето Trichrome Masson, PSA, екстрапростатична екстензија на болеста и инверзна корелација со експресија на антителото Desmin без наод на корелација со Gleason скорот³⁰. Друга студија покажала статистички сигнификантна корелација на меѓу експресијата на антителото Vimentin со Gleason-овиот градус²⁸. Во нашата студија Vimentin експресијата сигнификантно корелира со интензитетот на пребојувањето Trichrome Masson ($R = 0,68$ $p < 0,001$), Gleason-овиот скор ($R = 0,35$ $p = 0,003$) и со екстрапростатичната екстензија ($R = 0,28$ $p = 0,019$).

Desmin експресијата во една студија инверзно корелирала со интензитетот на пребојувањето Trichrome Masson со Vimentin експресијата со PSA и со екстрапростатичната екстензија на болеста без наод на корелација со Gleason-овиот градус³⁰. Во нашата студија Desmin експресијата покажа инверзна корелација со Trichrome Masson пребојувањето ($R = - 0,28$ $p = 0,02$) и со Gleason-овиот градус ($R = - 0,25$ $p = 0,035$). Desmin експресијата во нашата студија покажа инверзна корелација со Trichrome Masson индексот на пребојување што е во согласност и со многу други студии^{28-30,64}. Губитокот на Desmin експресијата покажува губиток на високо специјализираната мазномускулна строма во склоп на простатичниот карцином. Некои автори укажуваат на поголема предиктивна моќ на Desmin експресијата во однос на Vimentin експресијата за рекурентност на туморот⁶⁴ но повеќето автори укажуваат дека Vimentin антителото е супериорно во однос на Desmin антителото или хистохемиското бојење Trichrome Masson²⁸⁻³⁰.

Експресијата на α -SMA ја проучувале само двајца автори^{28,29} од достапната литература, од кои еден автор покажал блага редукција на α -SMA експресијата кај полошо диференцираните простатични карциноми но овој автор користел двојно имунохистохемиско бојење на α -SMA со антителата Vimentin и Calponin²⁸ додека вториот автор²⁹ не покажал сигнификантна разлика во интензитетот на пребојувањето за антителото α -SMA помеѓу стромалните клетки на бенигната простатична хиперплазија и простатичниот карцином²⁹. α -SMA експресијата во нашата студија покажа сигнификантна инверзна корелација единствено со диференцираноста на туморот односно Gleason-овиот градус ($R = - 0,35$ $p = 0,005$). Со зголемување на недиференцираноста на туморот се покажа помала експресија на антителото α -SMA. Нема сигнификантна корелација на антителото α -SMA со другите параметри односно Trichrome Masson, Vimentin, Desmin, нивото на серумското PSA и екстрапростатична екстензија на туморот. Постои негативна корелација на α -SMA експресија со Vimentin експресија во стромата на бенигна простатична хиперплазија.

7.6. Androgen Receptor (AR):

7.6.1 Стромален Андроген Рецептор (AR) во развој на простатата и простатична карциногенеза

Улогата на стромата во развојот на простатата, функционирањето на простатата и одржувањето на ткивна диференцијација е добро утврдена^{22,118-119}. Главните стромални клетки во простатата се фибробласти и мазно-мускулни клетки кои учествуваат во синтеза на екстрацелуларен матрикс. Стромалните клетки и екстрацелуларниот матрикс, заедно создаваат микросредината која го регулира развојот на соседните епителни клетки. AR игра критична улога во простатичниот развој преку регулација на андрогените ефекти врз епителните клетки. Најголем дел од оваа активност се смета дека е посредувана преку ослободување на паракрини фактори кои се независни од присуството на AR на епителните клетки¹²⁰. Во експериментални модели на животни потврдено е дека AR експресијата во глумци и стаорци е претежно локализирана во мезенхимното ткиво во текот на феталниот период, додека епителната експресија на AR е претежно локализирана во простатична жлезда во тек на пост-наталниот период¹²¹⁻¹²³.

За развој на простататата од урогениталниот синус неопходни се интеракции помеѓу мезенхималните и епителните клетки¹²⁴. Целиот развоен процес го координираат андроген зависни сигнали, кои потекнуваат од мезенхимот на урогениталниот синус¹²⁵. Од урогениталниот синус се формираат пупки на епител, кои подоцна формираат солидни ленти кои растат, се разгрануваат и канализираат, за да конечно се формира епител составен од високи цилиндрични луминални клетки под кои се гледа слој на базални клетки^{124,125}. Заедно со епителната диференцијација, мезенхималните клетки под епителот диференцираат кон мазномускулни клетки^{121,123}.

Експериментално е потврдено¹²⁴⁻¹²⁸ дека мезенхималниот AR ја поттикнува и контролира пролиферацијата и диференцијацијата на епителните клетки, додека епителниот AR игра улога во функционирањето на диференциранта простатична жлезда преку секреција на различни протеини¹²⁴⁻¹²⁸. Според ова, стромално-епителните интеракции се реципрочни во развојот на матурно простатично ткиво, каде епителот експресира високо диференциран секреторен фенотип со специфични секреторни протеини, додека матурната строма е предоминантно составена од мазно-мускулни клетки. Ова покажува дека природата на паракрините сигнали експресирани од феталниот мезенхим и од адултната простатична строма како одговор на андрогените сигнали е различна и резултира со различни ефекти врз епителот. Функцијата на диференцираниот епител се регулира со епителни рецептори¹²⁹.

Неколку автори^{119,130} покажале дека пред и во тек на простатичниот развој мезенхималните (стромални) клетки експресираат високи нивоа на AR додека AR иницијално не се забележува во простатичниот епител.

Појавата на AR во епителот во подоцнежните фази на простатичниот развој е потврдено од повеќе автори¹³¹⁻¹³³ со што се зацврстува фактот дека андрогените ефекти врз епителот во раниот развој се независни од епителниот AR. Иако андрогените може да делуваат директно, преку епителниот AR за извршување на диференцирана функција, постојат многу случаи каде андрогените делуваат на епителот индиректно преку стромален AR¹³⁴ преку паракрини медијатори, како EGFR и FGF¹³⁵⁻¹³⁹ или цитокини¹³⁹. Овие медијатори е покажано дека дифундираат од стромалниот компартман до епителните клетки и влијаат на нивниот раст и диференцијација¹³⁵⁻¹³⁷. Експериментално е покажано дека отсуството на стромални AR кај фибробластите и мазномускулните клетки супримираат раст и развој на простатичните епителни клетки¹³⁸⁻¹³⁹ со што се потенцира улогата на стромалниот AR во простатичниот развој.

7.6.2. Прогресивен губиток на AR експресија кај стромални клетки во транзиција од бенигнен кон малигнен тумор и во тек на прогресија на малигнен тумор“

Бројни студии се фокусирале на AR експресија кај епителните клетки во тек на генезата и прогресијата на простатичниот карцином од примарен до метастатски карцином и од хормон сензитивен до хормон резистентен простатичен карцином. Покажано е дека функцијата на епителните AR се менува со прогресијата на болеста, така што пролиферативниот одговор на андрогените станува до одреден степен автономен кај карциномскиот епител, за разлика од комплетната контрола од страна на стромата која се јавува во развојот на простататата¹⁴⁰. Од страна на некои автори е покажано и дека

покачената експресија на епителниот AR кај туморите е асоцирана со агресивна болест и намалено преживување¹⁴¹. Експресијата и функцијата на стромалниот AR може да се разликува од епителниот AR. Иако некои автори не мислат така, други автори сметаат дека како резултат на генетски модификации¹⁴²⁻¹⁴⁵ кај стромалните клетки постојат и функционални модификации во тумор асоцираната строма.

Експресијата на стромалните AR прогресивно опаѓа во тек на транзиција од бенигно ткиво, преку *in situ* карцином и во тек на прогресија на простатичен карцином од низок до висок градус, од примарен до метастатски карцином како и од хормон сензитивен до хормон резистентен карцином^{21,23,146-149}

Споредено со нормална простата, експресијата на стромален AR е најдено дека опаѓа многу рано во развојот на простатичен карцином дури и кај висок градус интраепителна простатична неоплазија²³. Анализата на стромалното ткиво во близина на простатичен карцином кај пациенти со трансуретрална ресекција на простата или радикална простатектомија покажува губиток на експресија на стромален AR кој е во линеарна негативна корелација со хистолошкиот градус на карциномот, односно експресијата линеарно опаѓа со покачувањето на хистолошкиот градус на карциномот²³. Други автори покажале статистички сигнификантен пад на експресија на стромалниот AR во подрачја во непосредна близина околу простатичниот карцином односно во зоните на периферен фронт на раст на туморот споредено со подрачја на ВРН на оддалеченост од простатичниот карцином¹⁴⁹

Некои автори покажале дека губитокот на AR позитивни стромални клетки во карциномските подрачја корелира со стадиумот на болеста и Gleason-овиот скор¹⁴⁹. Оваа корелација била забележлива и кај локализирана болест T2 со Gleason-ов скор 7, и кај локално напредната болест со T3 и T4 со Gleason-ов скор 8 - 10, при што корелацијата била и посилна.

Намалената експресија на стромален AR исто така корелира и со прогресија на болеста, вклучувајќи и појава на метастази и андроген резистенција.

Во одредени студии е утврдено дека примероците од метастатска болест покажуваат значително помала експресија на стромални AR споредено со примероците од примарниот тумор¹⁴⁷. Само 1,6% од клетките биле позитивни во туморската строма на примероците од метастатските подрачја, споредено со 18% позитивни клетки во нормалната строма. Во примероците од примарен простатичен карцином 13% од туморските клетки на стромата биле позитивни за AR споредено со 48% позитивни клетки во нормална строма што е еквивалентно на 3,5 пати пад на експресија на AR во карцином асоцираната строма.

Значаен пад во експресијата на стромални AR постои и во тек на транзицијата на простатичен карцином од хормон сензитивен во хормон резистентен. Кај хормон резистентните простатични карциноми тој пад во експресија на стромален AR е статистички сигнификантен и експресијата на AR е 3 пати помала во однос на хормон сензитивен простатичен карцином¹⁴⁸.

7.6.3. Механизам на губиток на AR експресија во туморот

Механизмот кој се наоѓа зад губитокот на експресијата на стромалните AR во карциномската строма не е добро утврден. Се претпоставува дека во тек на малигната трансформација постои пресвртница во AR оската од стромално

клеточни зависни паракрини патишта кон стромално независни, автокрино зависни патишта на епителот¹⁴⁰.

Кога овие карциномски (епителни) клетки ќе се преориентираат кон автокрин механизам на пролиферација изгледа дека AR регулира нова серија на гени за преживување и пролиферација на клетките кои не се експресираат кај простатичните нормални епителни клетки¹³⁵. Како резултат на оваа транзиција малигните епителни клетки повеќе не зависат од стромално-епителните интеракции и стромалните AR посредувани фактори на раст за преживување и пролиферација. Во тек на развојот на простатата андроген регулираните паракрини сигнали кои се продуцирани од стромата иницијално доведуваат до епителна пролиферација која станува прогресивно поорганизирана како што стромата постепено диференцира во AR експресирачка мазна мускулатура. За разлика од тоа со прогресија на карциномот стромата прогресивно станува се помалку диференцирана што упатува на фактот дека тоа е резултат на губиток на сигнализација, која нормално прави рестрикција на растот на епителот и одржува мирна диференцирана состојба^{21,117,150,151}.

7.6.4. Експресија на Андроген Рецептор

Во нашата студија AR експресијата беше сигнификантно поголема кај епителните клетки на ВРН отколку кај епителните клетки во простатичниот карцином (Wilcoxon Matched Pairs $Z=3,1$ $p=0,002$) (med 267 vs 257,5). Некои студии покажуваат слични резултати^{23,28} со наод на зголемена експресија на AR во епителните клетки на ВРН иако во една од овии студии не се покажа статистичка сигнификантност во корелацијата, но некои покажуваат сигнификантно поголема експресија на AR кај епителните клетки на простатичниот карцином споредено со епителните клетки на ВРН³¹. Постојат повеќе претпоставки за оваа дискрепанца но најверојатно различните резултати се должат на непостоење на унифициран метод за одредување на адекватни подрачја за анализа.

Од друга страна експресијата на AR кај стромалните клетки на простатичниот карцином покажува поголеми разлики. Во стромата на простатичниот канцер се регистрират сигнификантно ($t = 9,5$ $p < 0,01$) пониски просечни вредности на експресијата на AR во споредба со експресијата во стромалните клетки на ВРН ($114,2 \pm 37,3$ vs $161,61 \pm 22,1$). Оваа разлика, односно присуството на пад на експресија на AR во јадрата на стромалните клетки, кај простатичниот карцином ја евидентираат и други студии^{23,31}.

Што се однесува до експресијата на AR кај епителните и стромални клетки на ВРН, експресијата на AR во епителот на ВРН е сигнификантно (Wilcoxon Matched Pairs $Z = 7,3$ $p < 0,01$) повисока од вредноста во стромата на ВРН (med 267 vs 161).

Експресијата на AR кај епителните и стромалните клетки на простатичниот карцином покажа дека епителните клетки на простатичниот карцином имаат сигнификантно поголема експресија на AR ($t = 34,7$, $p < 0,01$ во однос на стромалните клетки на простатичниот карцином ($253,73 \pm 22,9$ vs $114,2 \pm 37,3$).

Во оваа студија ја испитувавме и поврзаноста, односно корелацијата на експресијата на AR во епителот и стромата на простатичниот карцином.

Вредноста на Pearson-овиот коефициент на линеарна корелација од $r=0,46$ и $p<0,01$, покажува дека експресијата на AR во стромата на неоплазмата

позитивно сигнификантно корелира со експресијата во епителот, односно дека со намалување на експресијата на овој рецептор во канцерскиот епител, се намалува и експресијата во канцерската строма, и обратното. Испитуваната корелација помеѓу експресијата на AR во епителот и стромата на BPH е позитивна, но статистички несигнификантна ($R = 0,22$ $p > 0,05$). Експресијата на AR се менува пропорционално во епителот и стромата на BPH, но во оваа серија испитаници таа поврзаност не се докажува како значајна. Корелацијата помеѓу експресијата на AR во епителот на простатичниот карцином и епителот на BPH ($R = 0,056$ $p = 0,6$) и помеѓу експресијата на AR во стромата на простатиниот карцином и стромата на BPH ($R = 0,094$ $p = 0,44$) исто така е несигнификантна.

Во однос на корелацијата на експресијата на AR со други патолошки и клинички параметри во нашата студија испитувана е корелација на AR експресија во епителот и стромата на простатичниот карцином со возраста на пациентите при што не е најдена корелација помеѓу овие 2 параметри ($F = 0,27$ $p = 0,8$ и $F = 0,26$ $p = 0,86$) што се покажало и во други студии³¹. Корелација не е најдена и помеѓу нивото на серумското PSA и експресијата на андроген рецепторот во епителот и стромата на простатичниот карцином (Spearman-ов коефициент $R = -0,056$ $p > 0,05$ за корелацијата помеѓу PSA и AR во епителот и $R = -0,11$ $p > 0,05$ за корелација помеѓу PSA и AR во стромата) што е утврдено и во други студии³¹.

Во однос на Gleason-овиот градус просечната вредност на AR во епителот на простатичниот карцином е:

А) највисока во групата на G1 карциноми, односно групата на добро диференцирани карциноми и изнесува $255,17 \pm 37,2$;

Б) пониска е во групата G2 карциноми, односно групата умерено диференцирани тумори и изнесува $254,38 \pm 17,5$;

В) најниска просечна вредност на AR во епителот, регистрирана е во групата G3 карциноми, односно групата лошо диференцирани карциноми и изнесува $249,36 \pm 26,1$.

Корелацијата помеѓу Gleason-овиот градус и просечната вредност на AR во епителот на простатичниот карцином беше статистички несигнификантна. Просечните вредности на андроген рецепторот кај добро диференцираните простатични карциноми (G1) беа повисоки во однос на умерено и лошо диференцираните простатични карциноми (G2 и G3) ($F = 0,24$ $p = 0,79$). Вакви резултати се гледаат и во другите студии³¹. Статистички несигнификантна беше и разликата во просечната вредност на AR во епителот на простатичниот карцином и диференцираност на туморот со користење на Gleason grade group ($F = 0,25$ $p = 0,9$)

Просечната вредност на AR во стромата на простатичниот карцином сигнификантно зависи од диференцираноста на туморот ($F = 8,16$ $p = 0,0007$). Овој статистички коментар се должи на тестираната разлика во просечната вредност на AR во стромата меѓу групите G1, G2 и G3 карциноми. Во групата G1 карциноми (Gleason score 2 - 6), односно групата добро диференцирани тумори, просечната вредност на AR во стромата е највисока и изнесува $144,0 \pm 41$, пониска е во групата G2 карциноми (Gleason score 7), односно групата умерено диференцирани тумори и изнесува $112,91 \pm 32,4$ и најниска просечна вредност на AR во стромата е регистрирана во групата G3 карциноми (Gleason score 8 - 10), односно групата лошо диференцирани тумори и изнесува $87,18 \pm 30,6$.

Post hoc анализата покажа дека во групата добро диференцирани тумори, просечната вредност на AR во стромата е сигнификантно повисока во однос на групата умерено диференцирани ($p = 0,017$) и во однос на групата лошо диференцирани тумори ($p = 0,0005$). Разликата во просечната вредност на AR во стромата меѓу умерено и лошо диференцирани тумори ($p = 0,07$) е несигнификантна. Просечната вредност на AR во стромата на простатичниот карцином сигнификантно зависеше од диференцираноста на туморот користејќи Gleason grade group ($F = 4,33$ $p = 0,0036$)

Овие податоци покажуваат јасна асоцијација помеѓу експресијата на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином и агресивноста на болеста, додека таква асоцијација сеуште не може да се постави во однос на експресијата на AR кај епителните клетки и покрај фактот што епителните клетки на карциномот се тие што се повеќе поврзани со другите клинички параметри за хистолошка агресивност на туморот. Ова покажува дека експресијата на AR во фибробластите (карцином асоцираните фибробласти) игра покритична протективна улога за да се спречи прогресија на простатичен карцином¹⁵².

Во однос на корелацијата на AR експресијата и T категоријата односно стадиумот на болеста во нашата студија се најде статистички несигнификантна корелација помеѓу експресијата на AR рецепторот во епителните клетки на простатичниот карцином ($R = - 0,019$ $p = 0,87$) и стромалните клетки на простатичниот карцином ($R = - 0,183$ $p = 0,13$) при што посилената експресија на AR рецепторот и во епителните и во стромалните клетки беше асоцирана со понизик стадиум на болеста. Несигнификантна корелација е најдена и во други студии³¹.

Дополнително неколку проспективни студии покажуваат присуство на корелација на падот на експресија на AR кај стромалните клетки на простатичниот карцином и рекурентноста на болеста, мерена со повторно покачување на нивото на серумското PSA по радикална простатектомија па дури и корелација со смртноста од простатичен карцином. Ваква корелација не се воспоставува во овие студии ако се мери нивото на експресија на AR кај епителните малигни клетки. Иста корелација е потврдена во некои студии помеѓу AR експресијата кај карциномските епителни клетки и други параметри како што се стадиумот на болеста, Gleason-овиот градус или постоперативното ниво на PSA но не е утврдена корелација со исходот на болеста. Обратно, во дел од овие студии се покажала јасна обратно пропорционална корелација на експресија на AR во стромалните клетки на простатичниот карцином со смртноста кај пациентите од простатичен карцином¹⁵².

Екстензивни анализи за експресија на AR на *епителните клетки* на простатичниот карцином не успеале значително да ја подобрат предиктивната моќ за прогресија на простатичниот карцином. Во денешно време, со набљудување на промените во канцерската строма, покажана е обратно пропорционална поврзаност на AR експресијата во стромалните клетки со Gleason-овиот скор, одговорот на терапија, присуството на метастази и биохемиска рекурентност на болеста (PSA).

Понатамошни студии покажуваат иста таква поврзаност на AR експресијата во стромалните клетки со смртност кај пациентите поврзана со простатичен канцер. Оваа поврзаност може да се докаже и кај постари пациенти со напредната болест во време на дијагностицирање на болеста и при иницијалниот третман, поради тоа што не постојат ограничувања за тоа кога

може да се добијат корисни прогностички информации со мерење на AR експресијата кај стромалните клетки¹⁵².

Gleason-овиот скор е јасно поврзан со други параметри за прогноза на болеста како што се преоперативното ниво на простата специфичниот антиген, смртноста поврзана со рак и експресијата на AR во епителните туморски клетки.

Падот на експресијата на AR во стромалните клетки на туморот може да се појави порано пред појавата на другите јасно етаблирани горенаведени параметри, па од тука произлегува и значењето на експресијата на AR во стромалните клетки на туморот како можен прогностички фактор¹⁵².

Податоците од горенаведените студии, покрај потврдување на протективната улога на експресијата на AR кај стромалните клетки во однос на прогресијата на простатичниот карцином, покажуваат и дека со одредување на оваа AR експресија може да се добијат корисни информации во однос на агресивноста на туморот и појавата на рани метастази и тоа би можело да биде додатна алатка за клиничко одлучување за понатамошен третман и кај помлади и кај постари пациенти со оглед и на претпоставката дека постарите мажи почесто починуваат со, а не од, простатичен карцином¹⁵².

Студиите за експресијата на AR кај *епителните* клетки се многу побројни, но истите покажуваат многу поразлични резултати споредбено со анализите за експресија на андроген рецепторот кај стромалните клетки на простатичниот карцином. Одредени автори нашле поврзаност помеѓу добро диференцирани простатични карциноми (G1) и поголема експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином, споредено со умерено диференцирани и лошо диференцирани простатични карциноми (G2, G3).

Некои автори се обиделе, но не докажале дека AR експресијата во епителот може да претставува прогностички фактор за туморска прогресија¹⁵³⁻¹⁵⁸. Ниско ниво на AR експресијата во епителот се смета за потенцијално негативен прогностички фактор за одговор на хормонална терапија и исход кај пациенти со метастатски простатичен карцином^{31,154,156}. Според некои автори зголемена експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином како резултат на генска амплификација може да доведе до губиток на контрола на раст овозможувајќи им на туморските клетки да станат хиперсензитивни на ниски нивоа на андрогени во простатата. Во овие студии авторите демонстрирале дека висока експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином укажува на поголем степен на малигност на туморот (G), понапредната болест (pTNM) и побрза биохемиска рекурентност (PSA). Според нив зголемената активност на AR е асоцирана со побрз раст на туморот^{141,146,159}.

Други автори не покажале корелација со горенаведените клиничко патолошки параметри^{31,160-163}. Некои автори покажале дека амплификацијата на AR резултира со зголемена протеинска експресија на AR во епителните клетки на простатичниот карцином, но тоа не влијаело на преживувањето по андроген депривациона терапија кај напреднати простатични карциноми^{163,164}. Некои автори, кои правеле проспективни студии, потврдиле дека AR негативен простатичен карцином има полоша прогноза од AR позитивен простатичен карцином, но притоа не е најдена корелација на AR експресијата во епителот на простатичниот карцином со градусот на туморот, или стадиумот на болеста¹⁶⁵. Во друга студија покажан е тренд помеѓу AR експресијата во епителот на

простатичниот карцином и Gleason-овиот градус, но корелацијата не била статистички сигнификантна¹⁶¹.

Во нашата студија просечната вредност на AR во епителот на простатичниот карцином е највисока во групата G1 карциноми, односно групата добро диференцирани тумори и изнесува $255,17 \pm 37,2$, пониска е во групата G2 карциноми, односно групата умерено диференцирани тумори и изнесува $254,38 \pm 17,5$, најниска просечна вредност на AR во епителот, регистрирана е во групата G3 карциноми, односно групата лошо диференцирани тумори и изнесува $249,36 \pm 26,1$. Несигнификантно повисоки се просечните вредности на AR во епителот на добро диференцираните тумори, во споредба со умерено и лошо диференцираните тумори ($F = 0,24$ $p = 0,79$) што се покажало и кај поголем дел од горенаведените студии.

Постојењето на дискрепанца помеѓу овие бројни студии може да се должи на неколку фактори. Некои од авторите студиите ги вршеле на биоптичен материјал^{154,156,165}, некои на материјал од трансуретрална ресекција^{155,156,161,163} а повеќето на оперативен материјал^{31,149,155-160,162}. Биоптичниот материјал е само мал примерок од целиот волумен на карциномот и притоа може да се добијат погрешни резултати. Од друга страна примероците од трансуретрална ресекција дополнително може да бидат термички оштетени поради природата на интервенцијата и притоа може да го оштетат AR, кој е осетлив на термални нокси. Дополнителни фактори се типот на антителото кое се користи и различните шеми на скорирање³¹.

Како дополнителен проблем во анализата на експресијата на AR во епителот на простатичниот карцином се појавува феноменот на хетерогеност на сигналот. Овој феномен подразбира појава на подрачја, особено во зони на лошо диференциран карцином, каде има групи на клетки со различни сигнали, од клетки со интензивен сигнал до клетки кои не поседуваат сигнал. Ваквиот феномен на хетерогеност на сигналот се покажа и во неколку случаи во нашата студија. Поради овој проблем некои автори предложиле да не се користи процентот на позитивни клетки за анализа на AR експресија во епителните клетки на простатичниот карцином туку да се одреди степенот на имунохистохемиска хетерогеност¹⁶⁶, или да се воведат таканаречен просечен имунохистохемски интензитет, а тоа би корелирало со прогнозата на болеста¹⁶⁷. Некои автори на овој начин анализирале примероци пред хормонална терапија и нашле дека хомогеноста на сигналот била сигнификантен предиктор за субсеквентен одговор на туморот на хормонална терапија¹⁶⁶⁻¹⁶⁷.

Поради присуство на хетероген AR сигнал во епителот кај простатичниот карцином тешко е да се одреди адекватен регион за анализа. Во оваа студија се користеше најчесто употребуваниот метод каде се бара најлошо диференцирана зона на тумор каде на мало зголемување има најинтензивен сигнал^{31,155,159} со цел да се анулира влијанието на хетерогеноста на сигналот врз интерпретација на резултатите. Некои автори користеле подрачја по случаен избор^{141,162}, додека други автори не рапортираат кои подрачја ги користеле за анализа^{146,160,161}. Во нашата студија увидени се случаи каде се добиваат многу различни резултати доколку се избераат подрачја каде што има најмала епителна експресија на AR, во кои најчесто и во најголем дел во тие подрачја постои назначена хетерогеност на сигналот. Дискрепанците во бројните горенаведени студии може да се должат на овој феномен на хетероген сигнал. Како дополнителен проблем се појавува и феноменот на мултифокалност на туморот кој е чест кај

простатични карциноми. Според тоа можеби се потребни нови евалуациони методи каде што ќе се испитуваат повеќе подрачја, или можеби треба да се направат неколку мерења со различни методи и потоа истите да се споредат за да се добијат поточни резултати³¹.

Експресијата на AR во *стромалните клетки* е многу помалку истражувана кај простатичниот карцином. Со појавата на бројни откритија кои ја покажуваат улогата на стромата во карциногенезата се поголем број на студии во денешно време се ориентираат во правец кон одредување на AR експресијата во стромалните клетки. Со оглед на фактот дека андроген регулираните интеракции помеѓу епителни и стромални клетки се обврзни како за нормален така и за абнормален раст на простатата, одредување на AR експресија само во еден компартман на органот може да даде грешки во резултатите, или грешна интерпретација на резултатите. Поради тоа паралелна анализа за експресијата на AR и кај епителните и кај стромалните клетки на простатичниот карцином, но и кај бенигната простатична хиперплазија се смета за неопходна со цел да се подобри нашето разбирање за механизмот кој е одговорен за прогресија на простатичниот карцином²³.

Историски првите наоди за отсуство на сигнал во стромалниот компартман кај простатичниот карцином биле случајно откриени во студии каде биле испитувани други хипотези^{157,168,169}. Во првите рапорти забележани се зони на намалена експресија на стромален AR во подрачја каде туморот дедиференцира, или забележано е отсуство на сигнал во зони на напреднат карцином. Мал број на студии досега се бавеле со паралелно истражување на експресијата на AR во епителот и стромата кај простатичен карцином, но и кај бенигна простатична хиперплазија^{23,170} како што е случај во нашата студија. Исто така ретко се правела анализа на ист примерок, односно ист пресек во кој има и подрачја на простатичен карцином и подрачја на бенигна простатична хиперплазија како во нашиот случај²³.

Појавата на отсуство или редуција на AR сигнал во простатичните карциноми се објаснува на повеќе начини. Една можна причина е присуство на аберантен рецептор во карциномските простатични ткива, но генерално овој феномен се смета за многу редок кај примарните простатични карциноми. Друго објаснување е присуство на абнормални интеракции помеѓу стромалните и епителните елементи кај простатичниот карцином¹⁷¹⁻¹⁷³. Докажано е дека митотски активниот епител е способен за индукција на неопластични промени во соседната строма, но механизмот кој е одговорен за овие промени не е разјаснет^{174,175}. Присуството на постепена редуција на сигналот на стромалниот AR рецептор во близина на алтерирани жлездени структури и наод на комплетно отсуство на сигнал во стромата во непосредна околина на малигни епителни клетки може да е резултат на сеуште неодредени туморогени сигнали од трансформираните епителни клетки. Во некои студии се утврдила и постепена транзиција на AR експресијата во стромалните клетки од централните подрачја на туморот каде има отсуство на сигнал, преку зони во непосредна близина на тумор до зони оддалечени од тумор каде има најголемо присуство на сигнал. Поради ова се претпоставува дека експресијата на AR во стромалните клетки зависи првенствено од близината на стромалните клетки до малигниот фокус без оглед на хистологијата на соседната жлезда односно без оглед на Gleason-овиот градус. Оваа претпоставка ја поткрепуваат студии кои покажуваат дека локалната екстензија на примарниот и метастатски канцер може, барем делумно, да се должи на таканаречен “ефект на мутагено поле” врз

променетата околна строма¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Со оглед на тоа дека според некои автори има пад на AR експресијата во соседните бенигни епителни клетки кои се наоѓаат во непосредна околина на простатичниот карцином, можно е присуство на “ефект на онкогено поле” и во епителниот компартман. Потребни се дополнителни истражувања за да се потврдат овие претпоставки²³.

На генетско ниво се смета дека губитокот или мутацијата на AR се едни од патиштата кои се одговорни за хормон сензитивен тумор да прејде во хормон резистентен тумор. Оттука постои можност дека промените во експресијата на стромалниот AR во простатичните карциноми може да бидат значајни во оваа промена кон хормон резистентност, ако се земе во предвид посредничката улога која стромалните клетки ја вршат преку андрогената контрола на простатичната жлезда¹⁷⁶. Со оглед на тоа дека AR е неопходен за експресија на пептидни фактори на раст, можно е да со губитокот на овој AR стромалните клетки престанат да ги експресираат овие протеини рано во малигната трансформација на простатата. Во тој случај преживувањето на малигните клетки би зависело од нивната способност да се пренасочат кон хормон независни клеточни патишта порано отколку подоцна по трансформацијата. Обратно, AR генска амплификација во епителни клетки се детектира само кај мал број на тумори, кои постепено станале хормон резистентни¹⁷⁹⁻¹⁸⁰. Според ова, можно е алтерациите во молекуларната биологија во стромалниот компартман на простатичната жлезда кои се инволвирани во прогресијата кон хормон резистентност да се јават во текот или непосредно по малигната трансформација на епителните клетки, најверојатно пред појавата на генетските промени во епителните клетки за кои се смета дека доведуваат до појава на ист фенотип²³.

8. ЗАКЛУЧОЦИ

1. Реактивната карцином асоцирана строма покажува квалитативни и квантитативни разлики во однос на стромата кај бенигната простатична хиперплазија
2. Во карцином асоцираната строма се појавуваат миофибробласти или карцином асоцирани фибробласти кои коекспресираат Vimentin и α -smooth muscle actin и го губат сигналот за Desmin за разлика од стромата кај бенигната простатична хиперплазија која коекспресира α -smooth muscle actin и Desmin и не експресира Vimentin.
3. Количината на реактивна строма и степенот на диференцираност на стромата корелираат со градусот, T категоријата и стадиумот на болеста
4. Поради тоа скорирање на стромалната компонента на простатичниот карцином може да претставува дополнителна алатка за одредување на агресивност на карциномот.
5. Експресијата на Androgen Receptor во епителот на простатичниот карцином е сигнификантно пониска споредено со експресијата на Androgen Receptor во епителот на бенигна простатична хиперплазија.
6. Експресијата на Androgen Receptor во стромата на простатичен карцином е сигнификантно пониска споредено со експресијата на Androgen Receptor во стромата на бенигна простатична хиперплазија.
7. Експресија на Androgen Receptor во епителот на простатичниот карцином е сигнификантно повисока споредено со експресијата на Androgen Receptor во стромата на простатичниот карцином со наод на позитивна сигнификантна корелација.
8. Експресијата на Androgen Receptor во епителот на бенигната простатична хиперплазија е повисока споредено со експресијата на Androgen Receptor во стромата на бенигна простатична хиперплазија без наод на сигнификантна корелација.
9. Експресијата на Androgen Receptor во стромалните клетки на простатичниот карцином позитивно сигнификантно корелира со експресијата во стромалните клетки на ВРН.
10. Експресијата на Androgen Receptor во стромата на простатичниот карцином сигнификантно корелира со Gleason-овиот градус на туморот односно постои сигнификантен пад во експресијата на Androgen Receptor кај полошо диференцираните тумори додека експресијата на Androgen Receptor не корелира со серумското преоперативно ниво на PSA и со возраста.
11. Експресијата на Androgen Receptor во епителот на простатичниот карцином не корелира сигнификантно со Gleason-овиот градус, серумското преоперативно ниво на PSA и со возраста на испитениците
12. Интензитетот на пребојувањето со хистохемиското бојење Trichrome Masson и индексот на пребојување со имунохистохемиските бојења со антителата Vimentin и Desmin може да се користат како градуирачки систем на стромата како дополнителен градуирачки систем на веќе етаблираниот Gleason-ов градуирачки систем кој ја анализира епителната компонента на карциномот.
13. Употребата на стромални маркери и Androgen Receptor експресијата може да има и клинички импликации со цел разграничување на клинички индолентни од клинички агресивни карциноми кои имаат идентичен

- Gleason-ов градус со што притоа ќе може адекватно да се модулираат терапевтските стратегии кај секој поединечен случај на простатичен карцином.
14. Хистолошкиот скор за Androgen Receptor експресија во стромата на простатични карциноми може да се користи како дополнителен градуирачки систем како дополнителен градуирачки систем на веќе етаблираниот Gleason-ов градуирачки систем кој ја анализира епителната компонента на карциномот.
 15. Употребата на стромални маркери и Androgen Receptor експресијата може да има и клинички импликации со цел:
 - А) утврдување на локализирана болест или локално напредната болест,
 - Б) утврдување на агресивност на неоплазмата и разграничување помеѓу хормон сензитивна и хормон резистентна неоплазма,
 - В) а во иднина можно е утврдување на нови онколошки терапевтски модалитети кои ќе ја таргетираат стромалната компонента на туморот.
 16. Теоријата на соматски мутации која е цврсто етаблирана како теорија за развој на неоплазија е доведена во прашање. Карциномот на простата не може да се гледа единствено како тумор на епителните клетки бидејќи во иницијацијата и прогресијата на неоплазмата неопходно е учество на стромалните клетки кои го диригираат целиот процес на простатична карциногенеза.
 17. Анализата на стромалната компонента во иднина ќе стане неодвоен дел од анализата на епителната компонента на простатичниот карцином при што се работи на утврдување на скорирачки системи за стромалната компонента на туморот кои ќе се надоврзат на веќе етаблираниот Gleason-ов скорирачки систем кој ја анализира само епителната компонента на туморот.

9. РЕФЕРЕНЦИ

1. Grossfeld GD, Hayward SW, Tlsty TD, Cunha GR. The role of stroma in prostatic carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer*. 1988;5:253-70
2. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2004 Mar;17(3):292-306
3. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC cancer staging manual (7th ed)*. New York, NY: Springer; 2010.
4. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ (Jan 2003). "Biology of prostate-specific antigen". *Journal of Clinical Oncology*. 21 (2): 383–91.
5. Hellstrom WJG, ed. (1999). "Chapter 8: What is the prostate and what is its function?". *American Society of Andrology Handbook*. San Francisco: American Society of Andrology.
6. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL (May 1994). "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". *The Journal of Urology*. 151 (5): 1283–90.
7. D'Amico, A. V.; et al. (1998). "Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer.". *JAMA* 280, 969-974.
8. Sonnenschein C, Soto AM. Are times a' changin' in carcinogenesis? *Endocrinology*. 2005 Jan;146(1):11-2.
9. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002;347:1593-604
10. Soto AM, Sonnenschein C. The somatic mutation theory of cancer: Growing problems with the paradigm? *Bioessays* 2004;26:1097-107
11. Van Regenmortel MH. Biological complexity emerges from the ashes of genetic reductionism. *J Mol Recognit*. 2004;17:145-8
12. Fukino K, Shen L, Matsumoto S, Morrison CD, Mutter GL, Eng C. Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Res*. 2004;64:7231-6
13. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 1999;59:5002-11
14. Barcellos-Hoff MH, Ravani SA. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res*. 2000;60:1254-60
15. Maffini MV, Soto AM, Calabro JM, Ucci AA, Sonnenschein C. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci*. 2004;117:1495-502
16. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes-the Achilles heal of cancer. *Science*. 2002;297:63-4
17. Sonnenschein C, Soto AM. Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced. *Mol Carcinog*. 2000;29:205-11
18. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001;1:46-54.
19. Maffini MV, Geck P, Powell CE, Sonnenschein C, Soto AM. Mechanism of androgen action on cell proliferation: AS3 protein as a mediator of proliferative arrest in the rat prostate. *Endocrinology*. 2002;143:2708-14

20. Barclay WW, Woodruff RD, Hall MC, Cramer SD. A system for studying epithelial-stromal interactions reveals distinct inductive abilities of stromal cells from benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Endocrinology* 2005;146:13-8
21. Singh M, Jha R, Melamed J, Shapiro E, Hayward SW, Lee P. Stromal androgen receptor in prostate development and cancer. *Am J Pathol.* 2014;184(10):2598-607
22. Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev Biol.* 2003;253(2):165-74
23. Olapade-Olaopa EO, MacKay EH, Taub NA, Sandhu DP, Terry TR, Habib FK. Malignant transformation of human prostatic epithelium is associated with the loss of androgen receptor immunoreactivity in the surrounding stroma. *Clin Cancer Res.* 1999;5(3):569-76
24. McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am.* 1990;17(3):477-486.
25. Schauer IG, Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82(4-5):200-10.
26. De Nunzio C1, Kramer G, Marberger M, Montironi R, Nelson W, Schröder F, Sciarra A, Tubaro A. The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *Eur Urol.* 2011 Jul;60(1):106-17.
27. Ørsted DD1, Bojesen SE. The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2013 Jan;10(1):49-54.
28. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 2002;8(9):2912-23.
29. Tomas D, Kruslin B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate.* 2004;61(4):324-31.
30. Tomas D, Spajić B, Milosević M, Demirović A, Marusić Z, Kruslin B. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol.* 2010;44(5):284-90.
31. Qiu YQ, Leuschner I, Braun PM. Androgen receptor expression in clinically localized prostate cancer: immunohistochemistry study and literature review. *Asian J Androl.* 2008 Nov;10(6):855-63.
32. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 May;88(5):2309-17.
33. Filipovski V, Janevska V, Kubelka Sabit K, Jasar Dz. Correlation of androgen receptor expression in epithelial and stromal cells of prostatic carcinoma with tumor grade. *Int J Curr Res.* 2016;8(07):34168-34172
34. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, et al. Tumor marker grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1456-1466
35. Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond EH, et al. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:995-1000
36. Bostwick DG, Foster CS. Predictive factors in prostate cancer: current concepts from the 1999 College of American Pathologists Conference on Solid Tumor Prognostic Factors and the 1999 World Health Organization

- Second International Consultation on Prostate Cancer. *Semin Urol Oncol* 1999;17:222–272.
37. Gleason DF. Classification of prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:125–128.
 38. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2004 Mar;17(3):292-306
 39. Mellinger GT, Gleason D, Bailar. III J. The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol* 1967;97:331–337
 40. Gleason DF, Mellinger GT. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974;111:58–64
 41. Gleason DF. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum M (ed). *Urologic Pathology: The Prostate*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1977, pp 171–197; (Chapter 9)
 42. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992;23:273–279
 43. Gleason DF. Histologic grading of prostatic carcinoma. In: Bostwick DG (ed). *Pathology of the Prostate*. Churchill Livingstone: New York, 1990, pp 83–93
 44. Aihara M, Wheeler TM, Ohori M, Scardino PT. Heterogeneity of prostate cancer in radical prostatectomy specimens. *Urology* 1994;43:60–66
 45. McGowan DG, Bain GO, Hanson J. Evaluation of histological grading (Gleason) in carcinoma of the prostate: adverse influence of highest grade. *Prostate* 1983;4:111–118
 46. Ruijter ET, van de Kaa CA, Schalken JA, et al. Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. Biological and clinical implications. *J Pathol* 1996;180:295–299
 47. Pan CC, Potter SR, Partin AW, Epstein JI. The prognostic significance of tertiary Gleason patterns of higher grade in radical prostatectomy specimens: a proposal to modify the Gleason grading system. *Am J Surg Pathol* 2000;24:563–569
 48. Srigley JR, Amin MB, Bostwick DG, et al. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:1034–1039
 49. Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, et al. Prediction of progression following radical prostatectomy: a multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 1996;20:286–292
 50. Albertsen PC, Hanley JA, Gleason DF, et al. Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998;280:975–980
 51. Barry MJ, Albertsen PC, Bagshaw MA, et al. Outcomes for men with clinically nonmetastatic prostate carcinoma managed with radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or expectant management. *Cancer* 2001;91:2302–2314
 52. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016 Feb;40(2):244-52

53. Feneley MR1, Partin AW. Indicators of pathologic stage of prostate cancer and their use in clinical practice. *Urol Clin North Am.* 2001 Aug;28(3):443-58.
54. Abu-Ghanem Y, Madhavan SG, Kirby R, Challacombe B. Treatment modalities for localised prostate cancer. *Trends Urol. Mens Health* 3(2), 21–25 (2012).
55. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F; European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol.* 2011 Jan;59(1):61-71.
56. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Garmo H, et al. Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* 2014; 370:932-942.
57. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, et, al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jul 19;367(3):203-13.
58. Akduman B, Crawford ED. Treatment of localized prostate cancer. *Rev Urol.* 2006;8 Suppl 2:S15-21.
59. Droz JP1, Fléchon A, Terret C. Prostate cancer: management of advanced disease. *Ann Oncol.* 2002;13 Suppl 4:89-94.
60. Hoimes CJ, Kelly WK. Redefining hormone resistance in prostate cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2010 Mar; 2(2): 107–123.
61. Dvorak HF: Tumors: wounds that do not heal: similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986, 315:1650-1659
62. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005; 13:7–12
63. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200:500–503
64. Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Ohori M, Wheeler M, Spitler J, Rowley DR. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:4792–4801
65. Rowley DR. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev.* 1998; 17:411–419
66. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 2001; 166:2472–2483
67. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003; 112:1776–1784
68. Placencio VR, Li X, Sherrill TP, Fritz G, Bhowmick NA. Bone marrow derived mesenchymal stem cells incorporate into the prostate during regrowth. *PLoS One.* 2010; 5:e12920
69. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer.* 2008; 99:1375–1379
70. Zeisberg EM, Kalluri R. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res.* 2010; 107:1304–1312
71. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144:646–674
72. Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev.* 1996; 76:69–125
73. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420:860–867

74. de Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*. 2005; 7:411–423
75. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285:1182–1186
76. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:422–433
77. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993; 362:841–844
78. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. *Cancer Res*. 2002b; 62:3298–3307
79. Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD, Rowley DR. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005; 65:8887–8895
80. Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K, Hayward SW. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 2007; 67:4244–4253
81. Kiskowski MA, Jackson RS 2nd, Banerjee J, Li X, Kang M, Iturregui JM, Franco OE, Hayward SW, Bhowmick NA. Role for stromal heterogeneity in prostate tumorigenesis. *Cancer Res*. 2011; 71:3459–3470
82. Li X, Placencio V, Iturregui JM, Uwamariya C, Sharif-Afshar AR, Koyama T, Hayward SW, Bhowmick NA. Prostate tumor progression is mediated by a paracrine TGF-beta/Wnt3a signaling axis. *Oncogene*. 2008; 27:7118–7130
83. Franco OE, Jiang M, Strand DW, Peacock J, Fernandez S, Jackson RS 2nd, Revelo MP, Bhowmick NA, Hayward SW. Altered TGF-beta signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis. *Cancer Res*. 2011; 71:1272–1281
84. Singh H, Dang TD, Ayala GE, Rowley DR. Transforming growth factor-beta1 induced myofibroblasts regulate LNCaP cell death. *J Urol*. 2004; 172:2421–2425
85. Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR. Inhibition of transforming growth factorbeta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res*. 2002c; 62:6021–6025
86. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:839–849
87. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971; 27:549–550
88. Hirschel BJ, Gabbiani G, Ryan GB, Majno G. Fibroblasts of granulation tissue: immunofluorescent staining with antismooth muscle serum. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1971; 138:466–469
89. Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G. Granulation tissue as a contractile organ: a study of structure and function. *J Exp Med* 1972, 135:719-734

90. Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR: Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 1971, 173:548-550
91. Gabbiani G: Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. *Pathol Res Pract* 1994, 190:851-853
92. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL: TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 2004, 303:848-851
93. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G: The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004, 48:509-517
94. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999; 277:C1-9
95. Ahmed A. The myofibroblast in breast disease. *Pathol Annu*. 1990; 25(Pt 2):237-286
96. Barsky SH, Green WR, Grotendorst GR, Liotta LA. Desmoplastic breast carcinoma as a source of human myofibroblasts. *Am J Pathol*. 1984; 115:329-333
97. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005; 45:657-687
98. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest*. 2003; 83:1689-1707
99. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007; 127:526-537
100. Yanagisawa N, Li R, Rowley D, Liu H, Kadmon D, Miles BJ, Wheeler TM, Ayala GE. Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after radical prostatectomy. *Hum Pathol*. 2007; 38:1611-1620
101. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Oct 30;19(6):R187-204
102. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5:1640-1646
103. Hao H, Gabbiani G, Camenzind E, Bacchetta M, Virmani R, Bochaton-Piallat ML. Phenotypic modulation of intima and media smooth muscle cells in fatal cases of coronary artery lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:326-332
104. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7:R1113-1123
105. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119:1420-1428
106. Zavadil J, Haley J, Kalluri R, Muthuswamy SK, Thompson E. Epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2008; 68:9574-9577

107. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol.* 2001; 166:7556–7562
108. Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Preston SL, Poulosom R, Hodivala-Dilke K, Alison MR, Wright NA. Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells.* 2003; 21:514–520
109. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2004; 126:955–963
110. Ishii G, Sangai T, Oda T, Aoyagi Y, Hasebe T, Kanomata N, Endoh Y, Okumura C, Okuhara Y, Magae J, et al. Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 309:232–240
111. Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L, Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol.* 2003; 171:380–389
112. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell.* 2006; 124:263–266
113. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:259–270
114. Howlett AR, Bissell MJ: The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epithelial Cell Biol* 1993, 2:79-89
115. Henke A, Grace OC, Ashley GR, Stewart GD, Riddick AC, Yeun H, O'Donnell M, Anderson RA, Thomson AA: Stromal expression of decorin, Semaphorin6D, SPARC, Sprouty1 and Tsukushi in developing prostate and decreased levels of decorin in prostate cancer. *PLoS One* 2012, 7:e42516
116. Zhao H, Peehl DM: Tumor-promoting phenotype of CD90hi prostate cancer-associated fibroblasts. *Prostate* 2009, 69:991-1000
117. Hayward SW1, Cunha GR, Dahiya R. Normal development and carcinogenesis of the prostate. A unifying hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Apr 30;784:50-62.
118. Thomson AA, Timms BG, Barton L, Cunha GR, Grace OC: The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development* 2002, 129:1905-1912
119. Donjacour AA, Cunha GR: Induction of prostatic morphology and secretion in urothelium by seminal vesicle mesenchyme. *Development* 1995, 121:2199-2207
120. Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour AA, Boutin EL, Foster BA: Normal and abnormal development of the male urogenital tract: role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions and growth factors. *J Androl* 1992, 13:465-475
121. Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR: Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)* 1996, 155:94-103
122. Takeda H, Chang C: Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of androgen receptor expression during the development of the mouse prostate gland. *J Endocrinol* 1991, 129:83-89

123. Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Cunha AR, Foster BA, Dahiya R, Prins GS, Cunha GR: Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel)* 1996, 155:81-93
124. Cunha GR, Chung LW: Stromal-epithelial interactions: induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem* 1981, 14:1317-1324
125. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura Y: The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 1987, 8:338-362
126. Cunha GR, Fujii H, Neubauer BL, Shannon JM, Sawyer L, Reese BA: Epithelial-mesenchymal interactions in prostatic development, I: morphological observations of prostatic induction by urogenital sinus mesenchyme in epithelium of the adult rodent urinary bladder. *J Cell Biol* 1983, 96:1662-1670
127. Cunha GR, Sekkingstad M, Meloy BA: Heterospecific induction of prostatic development in tissue recombinants prepared with mouse, rat, rabbit and human tissues. *Differentiation* 1983, 24:174-180
128. Donjacour AA, Cunha GR: Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology* 1993, 132:2342-2350
129. Kurita T, Lee KJ, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR: Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod* 2000, 62:821-830
130. Cooke PS, Young P, Cunha GR: Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* 1991, 128: 2867-2873
131. Cunha GR, Alarid ET, Turner T, Donjacour AA, Boutin EL, Foster BA: Normal and abnormal development of the male urogenital tract: role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions and growth factors. *J Androl* 1992, 13:465-475
132. Hayward SW, Haughney PC, Lopes ES, Danielpour D, Cunha GR: The rat prostatic epithelial cell line NRP-152 can differentiate in vivo in response to its stromal environment. *Prostate* 1999, 39:205-212
133. Hayward SW, Wang Y, Cao M, Hom YK, Zhang B, Grossfeld GD, Sudilovsky D, Cunha GR: Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line. *Cancer Res* 2001, 61:8135-8142
134. Cunha GR, Bigsby RM, Cooke PS, Sugimura Y: Stromal epithelial interactions in adult organs. *Cell Differ Dev* 1985, 17:137-148
135. Arnold JT, Isaacs JT: Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr Relat Cancer* 2002, 9:61-73
136. Wong YC, Wang YZ: Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. *Int Rev Cytol* 2000, 199:65-116
137. Cunha GR: Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer* 1994, 74:1030-1044
138. Yu S, Yeh CR, Niu Y, Chang HC, Tsai YC, Moses HL, Shyr CR, Chang C, Yeh S: Altered prostate epithelial development in mice lacking the androgen receptor in stromal fibroblasts. *Prostate* 2012, 72:437-449

139. Yu S, Zhang C, Lin CC, Niu Y, Lai KP, Chang HC, Yeh SD, Chang C, Yeh S: Altered prostate epithelial development and IGF-1 signal in mice lacking the androgen receptor in stromal smooth muscle cells. *Prostate* 2011, 71:517-524
140. Gao J, Arnold JT, Isaacs JT: Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. *Cancer Res* 2001, 61:5038-5044
141. Li R, Wheeler T, Dai H, Frolov A, Thompson T, Ayala G: High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 2004, 28:928-934
142. Haviv I, Polyak K, Qiu W, Hu M, Campbell I: Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle* 2009, 8:589-595
143. Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, Polyak K: Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet* 2005, 37:899-905
144. Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Muller-Holzner E, Marth C, Laird PW, Widschwendter M: Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. *Cancer Res* 2006, 66:29-33
145. Dakhova O, Ozen M, Creighton CJ, Li R, Ayala G, Rowley D, Ittmann M: Global gene expression analysis of reactive stroma in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009, 15:3979-3989
146. Henshall SM, Quinn DI, Lee CS, Head DR, Golovsky D, Brenner PC, Delprado W, Stricker PD, Grygiel JJ, Sutherland RL: Altered expression of androgen receptor in the malignant epithelium and adjacent stroma is associated with early relapse in prostate cancer. *Cancer Res* 2001, 61:423-427
147. Wikstrom P, Marusic J, Stattin P, Bergh A: Low stroma androgen receptor level in normal and tumor prostate tissue is related to poor outcome in prostate cancer patients. *Prostate* 2009, 69: 799-809
148. Wang LG, Johnson EM, Kinoshita Y, Babb JS, Buckley MT, Liebes LF, Melamed J, Liu XM, Kurek R, Ossowski L, Ferrari AC: Androgen receptor overexpression in prostate cancer linked to Pur alpha loss from a novel repressor complex. *Cancer Res* 2008, 68: 2678-2688
149. Li Y, Li CX, Ye H, Chen F, Melamed J, Peng Y, Liu J, Wang Z, Tsou HC, Wei J, Walden P, Garabedian MJ, Lee P: Decrease in stromal androgen receptor associates with androgen-independent disease and promotes prostate cancer cell proliferation and invasion. *J Cell Mol Med* 2008, 12:2790-2798
150. Cunha GR, Hayward SW, Dahiya R, Foster BA: Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat (Basel)* 1996, 155:63-72
151. Hayward SW, Rosen MA, Cunha GR: Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* 1997, 79(Suppl 2):18-26
152. Leach DA, Need EF, Toivanen R, Trotta AP, Palethorpe HM, Tamblyn DJ, Kopsaftis T, England GM, Smith E, Drew PA, Pinnock CB, Lee P, Holst J, Risbridger GP, Chopra S, DeFranco DB, Taylor RA, Buchanan G: Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome. *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):16135-50.
153. Husain I, Shukla S, Soni P, Husain N. Role of androgen receptor in prostatic neoplasia versus hyperplasia. *J Cancer Res Ther*. 2016 Jan-Mar;12(1):112-6.

154. Takeda H, Akakura K, Masai M, Akimoto S, Yatani R, Shimazaki J. Androgen receptor content of prostate carcinoma cells estimated by immunohistochemistry is related to prognosis of patients with stage D2 prostate carcinoma. *Cancer*. 1996 Mar 1;77(5):934-40.
155. Theodoropoulos VE, Tsigka A, Mihalopoulou A, Tsoukala V, Lazaris AC, Patsouris E, Ghikonti I. Evaluation of neuroendocrine staining and androgen receptor expression in incidental prostatic adenocarcinoma: prognostic implications. *Urology*. 2005 Oct;66(4):897-902.
156. Segawa N, Mori I, Utsunomiya H, Nakamura M, Nakamura Y, Shan L, Kakudo K, Katsuoka Y. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation, proliferation activity and androgen receptor expression in prostate cancer. *Pathol Int*. 2001 Jun;51(6):452-9.
157. Miyamoto KK, McSherry SA, Dent GA, Sar M, Wilson EM, French FS, Sharief Y, Mohler JL. Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue. *J Urol*. 1993 May;149(5):1015-9.
158. de Winter JA, Trapman J, Brinkmann AO, Boersma WJ, Mulder E, Schroeder FH, Claassen E, van der Kwast TH. Androgen receptor heterogeneity in human prostatic carcinomas visualized by immunohistochemistry. *J Pathol*. 1990 Apr;160(4):329-32.
159. Inoue T1, Segawa T, Shiraishi T, Yoshida T, Toda Y, Yamada T, Kinukawa N, Kinoshita H, Kamoto T, Ogawa O. Androgen receptor, Ki67, and p53 expression in radical prostatectomy specimens predict treatment failure in Japanese population. *Urology*. 2005 Aug;66(2):332-7.
160. Sweat SD, Pacelli A, Bergstralh EJ, Slezak JM, Bostwick DG. Androgen receptor expression in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *J Urol*. 1999 Apr;161(4):1229-32.
161. Noordzij MA, Bogdanowicz JF, van Krimpen C, van der Kwast TH, van Steenbrugge GJ. The prognostic value of pretreatment expression of androgen receptor and bcl-2 in hormonally treated prostate cancer patients. *J Urol*. 1997 Nov;158(5):1880-4; discussion 1884-5.
162. Gaston KE, Kim D, Singh S, Ford OH 3rd, Mohler JL. Racial differences in androgen receptor protein expression in men with clinically localized prostate cancer. *J Urol*. 2003 Sep;170(3):990-3.
163. Ford OH 3rd, Gregory CW, Kim D, Smitherman AB, Mohler JL. Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol*. 2003 Nov;170(5):1817-21.
164. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, Palotie A, Tammela T, Isola J, Kallioniemi OP. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*. 1995 Apr;9(4):401-6.
165. Pertschuk LP, Schaeffer H, Feldman JG, Macchia RJ, Kim YD, Eisenberg K, Braithwaite LV, Axiotis CA, Prins G, Green GL. Immunostaining for prostate cancer androgen receptor in paraffin identifies a subset of men with a poor prognosis. *Lab Invest*. 1995 Aug;73(2):302-5.
166. Sadi MV, Barrack ER. Image analysis of androgen receptor immunostaining in metastatic prostate cancer. Heterogeneity as a predictor of response to hormonal therapy. *Cancer*. 1993 Apr 15;71(8):2574-80.
167. Tilley WD, Lim-Tio SS, Horsfall DJ, Aspinall JO, Marshall VR, Skinner JM. Detection of discrete androgen receptor epitopes in prostate cancer by

- immunostaining: measurement by color video image analysis. *Cancer Res.* 1994 Aug 1;54(15):4096-102.
168. Chodak GW, Kranc DM, Puy LA, Takeda H, Johnson K, Chang C. Nuclear localization of androgen receptor in heterogeneous samples of normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. *J Urol.* 1992 Mar;147(3 Pt 2):798-803.
 169. Leav I, McNeal JE, Kwan PW, Komminoth P, Merk FB. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate.* 1996 Sep;29(3):137-45.
 170. Van der Kwast TH, Tetu B, Fradet Y, Dupont A, Gomez J, Cusan L, Diamond P, Labrie F. Androgen receptor modulation in benign human prostatic tissue and prostatic adenocarcinoma during neoadjuvant endocrine combination therapy. *Prostate.* 1996 Apr;28(4):227-31.
 171. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij HC, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Dec 14;173(2):534-40.
 172. Newmark JR, Hardy DO, Tonb DC, Carter BS, Epstein JI, Isaacs WB, Brown TR, Barrack ER. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 15;89(14):6319-23.
 173. Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993 Dec;46(6):759-65.
 174. Goldenberg DM, Pavia RA. Malignant potential of murine stromal cells after transplantation of human tumors into nude mice. *Science.* 1981 Apr 3;212(4490):65-7.
 175. Pathak S, Nemeth MA, Multani AS, Thalmann GN, von Eschenbach AC, Chung LW. Can cancer cells transform normal host cells into malignant cells? *Br J Cancer.* 1997;76(9):1134-8.
 176. Chung LW, Gleave ME, Hsieh JT, Hong SJ, Zhou HE. Reciprocal mesenchymal-epithelial interaction affecting prostate tumour growth and hormonal responsiveness. *Cancer Surv.* 1991;11:91-121.
 177. Gregoire M, Lieubeau B. The role of fibroblasts in tumor behavior. *Cancer Metastasis Rev.* 1995 Dec;14(4):339-50.
 178. Radinsky R. Modulation of tumor cell gene expression and phenotype by the organ-specific metastatic environment. *Cancer Metastasis Rev.* 1995 Dec;14(4):323-38. Review.
 179. Ruizeveld de Winter JA, Janssen PJ, Sleddens HM, Verleun-Mooijman MC, Trapman J, Brinkmann AO, Santerse AB, Schröder FH, van der Kwast TH. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *Am J Pathol.* 1994 Apr;144(4):735-46.
 180. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, Kallioniemi OP. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 1997 Jan 15;57(2):314-9.