

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI
STUDIJ MEDICINE

Massimo Bembić

PROCJENA ANGIOGENEZE U TRANSREKTALNOJ ULTRAZVUČNO
VOĐENOJ BIOPSIJI PROSTATE

Diplomski rad

U Rijeci, 2018. g.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI
STUDIJ MEDICINE

Massimo Bembić

PROCJENA ANGIOGENEZE U TRANSREKTALNOJ ULTRAZVUČNO
VOĐENOJ BIOPSIJI PROSTATE

Diplomski rad

U Rijeci, 2018. g.

MENTOR: Izv. prof. dr. sc. Gordana Đorđević, dr. med.

Diplomski rad ocijenjen je dana 13. lipnja 2018. godine na Medicinskom fakultetu u Rijeci pred povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Sanja Štifter

2. Prof. dr. sc. Elvira Mustać

3. Doc. dr. sc. Romano Oguić

Rad sadrži 34 stranica, 8 slika, 10 tablica i 34 literaturna navoda.

Prije svega zahvaljujem svojoj mentorici Izv. prof. dr. sc. Gordani Đorđević na uloženom trudu i vremenu kojim je uvelike pridonijela izradi mog diplomskog rada. Uvelike se moram zahvaliti i kolegici Katarini Božić koja mi je pomogla u očitavanju preparata, te doc.dr.sc. Ivanu Dražiću za statističku obradu podataka. Zahvaljujem i svima onima koji su na bilo koji način sudjelovali u mom fakultetskom obrazovanju te ga svojom prisutnošću učinili zanimljivim i kvalitetnim. To su redom svi moji profesori, asistenti, kolege i prijatelji. Naposljetku, velike zahvale upućujem svojoj obitelji koja mi je bila najveća potpora, kako u životu, tako i tijekom studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 ANATOMIJA, HISTOLOGIJA I FUNKCIJA.....	1
1.2 BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE	2
1.3 KARCINOM PROSTATE	6
1.4 UPALA PROSTATE (PROSTATITIS).....	10
1.5 ANGIOGENEZA	10
1.6 TUMORSKA ANGIOGENEZA.....	11
2. SVRHA RADA	14
3. MATERIJALI I POSTUPCI.....	15
4. REZULTATI	16
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČAK	27
7. SAŽETAK	28
8. SUMMARY	29
9. LITERATURA	30
10. ŽIVOTOPIS	34

Popis skraćenica i akronima

BHP – benigna hiperplazija prostate

HE – hematoksilin - eozin bojenje

LUTS – simptomi donjeg mokraćnog sustava

IPSS - ljestvica za međunarodni sustav bodovanja simptoma prostate

DRP - digitorektalni pregled

PSA - prostata-specifični antigen

TURP - transuretralna resekcija prostate

TULIP - laserska ablacija tkiva prostate te transvezikalna adenektomija

TRUS – transrektalni ultrazvuk prostate

PHD – patohistološka dijagnoza

ISUP – Internacionalno društvo urološke patologije

LHRH – otpuštajući lutenizirajući hormon

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta

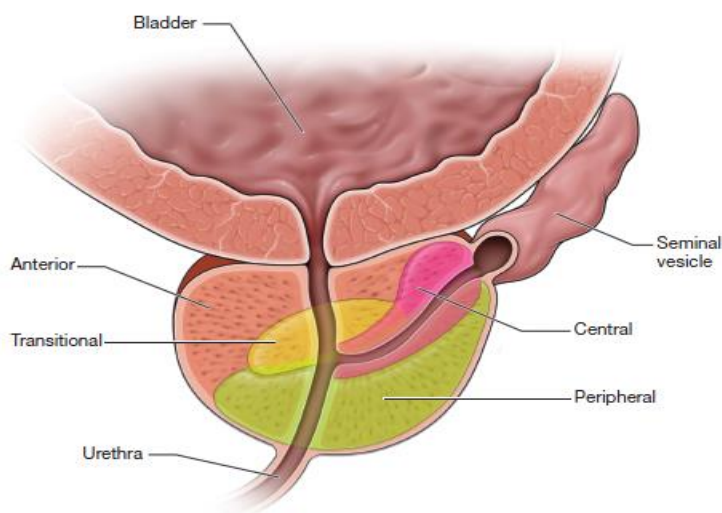
ECM – ekstracelularni matriks

MMP – matriksne metaloproteinaze

1.UVOD

1.1. ANATOMIJA, HISTOLOGIJA I FUNKCIJA

Prostata je najveća žlijezda muškog spolnog sustava. Smještena je u zdjelici, a okružuju je rektum, mokraćni mjehur, dorzalni i periprostatični venski kompleks, zdjelična muskulatura, zdjeličnim plexus i kavernozni živci. Vršak prostate se nalazi na genitourinarnoj dijafragmi, a baza prostate je u izravnom dodiru s mokraćnim mjehurom. Okružena je fibroznom kapsulom koja potječe od strome, a kapsula je okružuje svugdje osim na području vrška i baze. Puboprostatični ligamenti fiksiraju je za kosti zdjelice, a stražnja strana odijeljena je od rektuma retrovezikalnim septumom. Lateralni rubovi prostate su okruženi m. levator ani, a endopelvična fascija prekriva ventralnu stranu, proteže se na obje strane i prekriva m. levator ani. Prostatu irigiraju unutarnja pudendalna arterija, donja vezikalna arterija i središnja hemoroidalna arterija, a inervira pelvični plexus koji sadrži simpatička i parasimpatička vlakna (1).



Slika 1. Zone prostate (preuzeto s interneta <https://steemit.com/health/@alpharay/why-men-suffer-from-benign-prostatic-hyperplasia-bph> Zadnji datum pristupa informaciji 17.2.2018.)

Prostata se sastoji od središnje zone (25%), periferne zone (70%) i prijelazne zone (5-10%).

Prijelazna zona okružuje mokraćnu cijev između vrata mjehura i sjemenih mjehurića (2). Kod mlađih muškaraca periferna zona čini najveći dio obujma prostate, a prijelazna zona postaje dominantna starenjem što dovodi do benigne hiperplazije prostate (3).

Vezivno-mišićna stroma sudjeluje u kontroli mokrenja djelujući kao sfinkter uretre koji je pod utjecajem parasimpatikusa i u manjoj mjeri simpatikusa, te u otpuštanju kiselih prostatičnih izlučevina tijekom ejakulacije, kada je zaustavljen protok urina, što je pod kontrolom simpatikusa (2).

Glavna funkcija prostate je proizvodnja sjemene tekućine s udjelom od 30% ukupnog ejakulata, dok ostatak proizvode sjemeni mjehurići, testisi i bulbouretralne žlijezde. Muški spolni hormoni utječu na proizvodnju sjemene tekućine i rast prostate, a receptori na koje djeluju se nalaze u sekretornim, epitelnim stanicama i stromalnim stanicama. U sekretornim epitelnim stanicama, testosteron potiče stvaranje i izlučivanje prostatične tekućine (1).

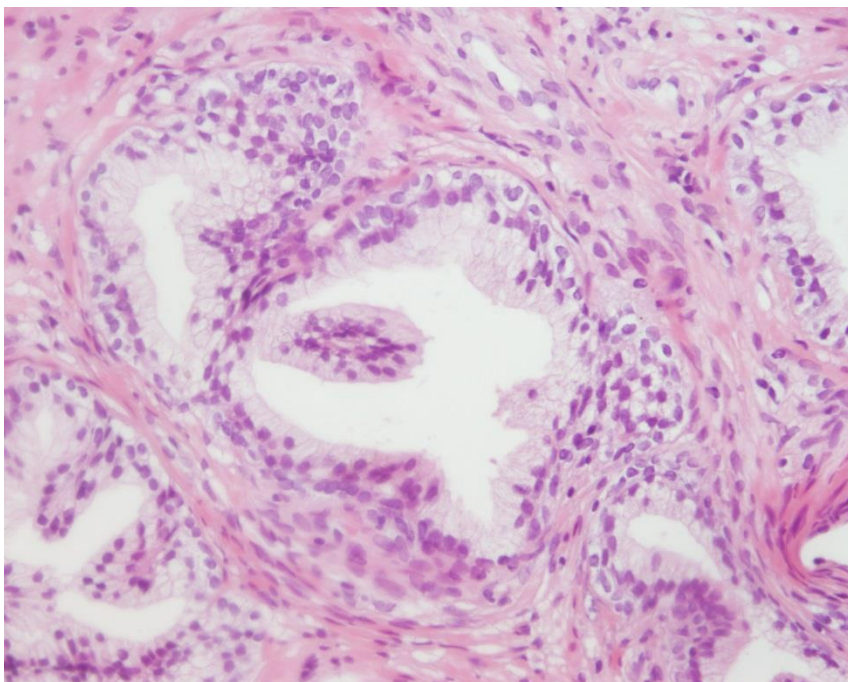
Najčešća oboljenja prostate predstavljaju javno zdravstveni problem, a uključuju benignu hiperplaziju prostate, acinarni karcinom prostate i prostatitis.

1.2.BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE

Benigna hiperplazija prostate je bolest koja se javlja kod muškaraca starije životne dobi, a buduće da svake godine raste prosječno trajanje života populacije, povećava se i broj bolesnika. U 80-im godinama prevalencija BHP iznosi 80%, stoga ona postaje veliki javnozdravstveni problem (4). U Republici Hrvatskoj 78,4% bolesnika je starije od 60 godina (5).

Muškarci koji su pretili ili imaju dijabetes imaju veći rizik za razvoj BHP-a.

Androgeni potiču povećanje broja stanica, a glavni androgen u prostati je dihidrotestosteron. Enzim 5 α – reduktaza konvertira testosteron u dihidrotestosteron. Dihidrotestosteron unutar prostate služi kao hormonalni posrednik za hiperplaziju; akumulacija se vjerojatno javlja djelomično zbog smanjenog katabolizma molekule i dijelom zbog pojačane intracelularne veze molekule. Proces ubrzava estrogen, koji pojačava razinu androgenskog receptora u žlijezdi; povećanje androgenog receptora omogućuje androgen-posredovani rast čak i usprkos smanjenoj proizvodnji androgena u starijoj životnoj dobi (6).



Slika 2. Benigna hiperplazija prostate, (HEX200)

Histološki je karakterizirana nereguliranim rastom žljezdanog epitela, glatkog mišićja i vezivnog tkiva prostate, a dijagnoza BHP se definira kad u biopsiji dominira slika proliferacije epitela u žlijezdama (slika 2). Klinički se manifestira simptomima donjeg mokraćnog sustava (LUTS), retencijom urina, infekcijama te ostalim simptomima. Simptomi donjeg mokraćnog sustava uključuju simptome mokrenja, simptome pohrane i postmikcijske simptome (5).

Tablica 1. Simptomi LUTS-a (5)

SIMPTOMI MOKRENJA	SIMPTOMI POHRANE	POSTMIKCIJSKI SIMPTOMI
slab mlaz mokraće	češće mokrenje	Osjećaj nepotpunog pražnjenja mokraćnog mjehura
isprekidan protok mokraće	nikturija	Nevoljno bježanje mokraće
naprezanje pri mokrenju	nevoljno bježanje mokraće	
odgođen početak mokrenja	iznenadna potreba za mokrenjem	
urinarna retencija	Otežano odgađanje mokrenja	

BHP se dijagnosticira na temelju detaljne i specifične urološke anamneze, rješavanjem upitnika za međunarodni sustav bodovanja simptoma prostate (IPSS – international prostate symptom score), kliničkog pregleda, laboratorijskih testova, mikciometrijom, pretragom postmikcijskog rezidualnog urina, urodinamskom pretragom, cistoskopijom i transrektalnim ultrazvukom.

IPSS se sastoji od 7 pitanja koja se odnose na simptome u posljednjih mjesec dana, a boduju se od 1 do 5. Ukupan zbroj bodova može biti 35 te se na temelju toga pacijenti rangiraju u bolesnike s niskim, srednjim i teškim simptomima.

Digitorektalnim pregledom (DRP) se utvrđuje veličina i konzistencija prostate, a kod BHP očekujemo tvrdo i elastično povećanje.

Od laboratorijskih nalaza značajno je mjerenje PSA (prostata-specifični antigen) u krvi. Ako je PSA >4 ng/ml ili digitorektalni pregled otkrije neku abnormalnost, indicira se transrektalna

biopsija, a poznato je da je PSA nespecifičan pa se treba odvagati potreba za daljnjom obradom.

Transrektalni ultrazvuk se radi kod bolesnika za procjenu veličine prostate zbog planiranja prostatektomije (7).

Liječenje uključuje konzervativni pristup, medikamentozni pristup i kirurški pristup. Pri blagim simptomima provodi se konzervativni pristup koji uključuje mijenjanje načina života u smislu ograničavanja unosa tekućine, mokrenja prije odlaska na spavanje da ne dođe do nokturije, provođenje vježbi za jačanje mišićnog dna zdjelice i drugo. Ukoliko konzervativne mjere nisu uspješne počinje se provoditi farmakoterapija (7).

Antagonisti alfaadrenergičkih receptora (doksazosin, tamsulosin) čine prvu liniju liječenja u muškaraca s LUTS-om. Oni smanjuju tonus glatke muskulature prostate, vrata mokraćnog mjehura i mokraćne cijevi gdje su najbrojniji alfa-1a-receptori. Tamsulosin je selektivni antagonist, a zbog brzog početka djelovanja koristi se za uporabu u bolesnika koji ne zahtijevaju dugotrajno liječenje ili imaju fluktuirajuće smetnje. Njegov učinak na smetnje mokrenja očituje se u smanjivanju tegoba unutar 24 - 48 sati, ali ne smanjuje volumen prostate (8).

Inhibitori 5 α -reduktaze (finasterid i dutasterid) propisuju se muškarcima s umjerenim i jakim LUTS-om i povećanom prostatom te onima s povišenim rizikom od progresije bolesti u cilju prevencije kirurškog zahvata prostate ili smanjivanja rizika od akutne urinarne retencije.

Glavni cilj u liječenju jest spriječiti stvaranje metabolički aktivnog oblika testosterona.

Antimuskarinski lijekovi (tolterodin i solifenacin) indicirani su za liječenje smetnji pohranjivanja urina u muškaraca s LUTS-om. Zbog visokog rizika od progresije BPH indicira se kombinirana terapija antagonistima alfaadrenergičkih receptora i inhibitorima 5 α -reduktaze (8).

Bolesnici sa umjerenim i teškim simptomima te oni koji odbijaju druge oblike liječenja najčešće se odlučuju za kirurško liječenje kod kojeg postoji nekoliko različitih pristupa.

Transuretralnom resekcijom prostate (TURP) operira se većina bolesnika sa BHP-om, a izvodi se tako da se instrumentom uvedenim kroz mokraćnu cijev ukloni se dio tkiva koji djeluje opstruktivno i tako smanji vanjska kompresija na mokraćnu cijev. Ostali kirurški pristupi uključuju TULIP kojim se laserom obavlja ablacija tkiva te transvezikalnu adenektomiju (8).

1.3. KARCINOM PROSTATE

Karcinom prostate najčešće je dijagnosticirani karcinom muške populacije u razvijenim zemljama, s incidencijom od 97 slučajeva na 100.000 muškaraca u zapadnoj Europi, a u Republici Hrvatskoj javlja se na drugom mjestu, nakon karcinoma pluća (9). Karcinom prostate najfrekventniji je kod pripadnika crne rase, a zatim kod pripadnika bijele i mongoloidne rase. Pozitivna obiteljska anamneza raka prostate povećava rizik oboljevanja muških članova obitelji za 2 do 3 puta. Mutirani geni kao što su HOX13B i BRCA2 imaju veću vjerojatnost razvoja agresivnijeg oblika bolesti. Velik broj zloćudnih tumora prostate se nalazi u perifernoj zoni prostate koja je dostupna DRP-u (3).

U ranim fazama najčešće ne pokazuje simptome, tek kad bolest uznapreduje stvaranjem metastaza u kostima i limfnim čvorovima javljaju se prvi simptomi. Širenjem stvara pritisak na mokraćnu cijev, te kao rezultat toga nastaje opstruktivni poremećaj mokrenja, a čak može doći do potpune blokade protoka mokraće. Ukoliko zloćudna novotvorina infiltrira u sjemene mjehuriće dolazi do nastanka hematospermije. Simptomi proširene bolesti uključuju umor, slabost, mršavljenje i bolove u kostima (10).

Kako je karcinom u lokaliziranom stadiju rijetko je povezan sa simptomima njegova se detekcija temelji na kombinaciji DRP-a i određivanja serumske koncentracije PSA, a potvrda se donosi TRUS-om (9). Kod DRP-a posebnu pozornost treba obratiti na otvrdnuća unutar prostate, proširenja kroz kapsulu kao i eventualnu zahvaćenost sjemenih mjehurića. PSA je serinska proteaza koja se sintetizira u duktusu i acinarnom epitelu prostate, a svojom

enzimatskom aktivnošću održava sjemenu tekućinu tekućom. PSA je za organ, a ne za rak prostate specifičan biljeg, što implicira da se povišene vrijednosti mogu naći kod osoba s benignom hiperplazijom prostate, prostatitisom, kod akutne retencije urina, ureteralne kateterizacije, kod manipulacija prostate kao što su biopsija ili transureteralna resekcija prostate (3). Uredna vrijednost PSA u krvi muškaraca je 0 – 4 ng/ml. Povišene vrijednosti PSA povećavaju mogućnost za rak prostate, s 8% kod PSA 1 ng/ml na 25% kod PSA 4 – 10 ng/ml. Omjer slobodnog i ukupnog PSA korisno je dijagnostičko sredstvo u nejasnim slučajevima čime se smanjuje broj nepotrebnih biopsija. Definitivna dijagnoza karcinoma prostate ovisi o patohistološkoj verifikaciji tumora u iglenoj biopsiji prostate, uzorcima TRUS-a ili prostatektomije, a inicijalno je indicirana kod povišenih vrijednosti PSA i suspektoga DRP-a. Biopsija prostate izvodi se standardizirano pod kontrolom transrektalnog ultrazvuka uz uzimanje 10 – 12 cilindričnih uzoraka (9). Preporuka je da se TRUS biopsija izvodi neovisno o vrijednosti PSA ukoliko se pregledom pipa suspekti čvor u prostati (3). Američkog Udruženje Urologa preporuča da se za liječenje pacijenata s karcinomom prostate treba uzeti u obzir očekivano trajanje života, zdravstveno stanje, Gleasonov zbroj i stupanj proširenosti bolesti.

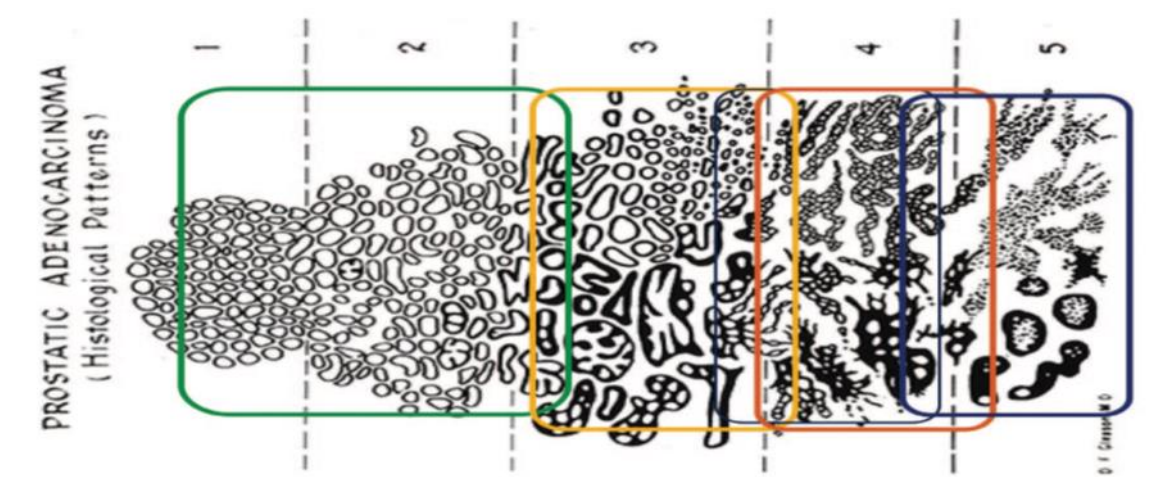
Gleasonov zbroj predstavlja stupanj diferencijacije raka prostate na temelju PHD analize. Važno je zbog klasifikacije tumora te zbog liječenja. Određuju se dva najzastupljenija stupnja diferenciranosti raka koji se opisuju brojevima u rasponu od 1 do 5, pri čemu 1 predstavlja dobro diferencirani, a 5 predstavlja slabo diferencirani karcinom. Gleasonov zbroj se dobiva zbrajanjem dvaju najzastupljenija stupnja (11). Gleasonov sustav neprestano se revidira, ali još uvijek pokazuje nedostatke koji imaju učinak na ishod bolesti. Modificirani Gleasonov sustav gradiranja donesen je uz opću suglasnost na ISUP-ovoj konferenciji (engl.

International Society of Urological Pathology) 2014. godine i prikazan je u tablici 2 (12).

Tablica 2. Modificirani Gleasonov sustav koji se u nalazu pridružuje tradicionalnom Gleasonovu zbroju (12)

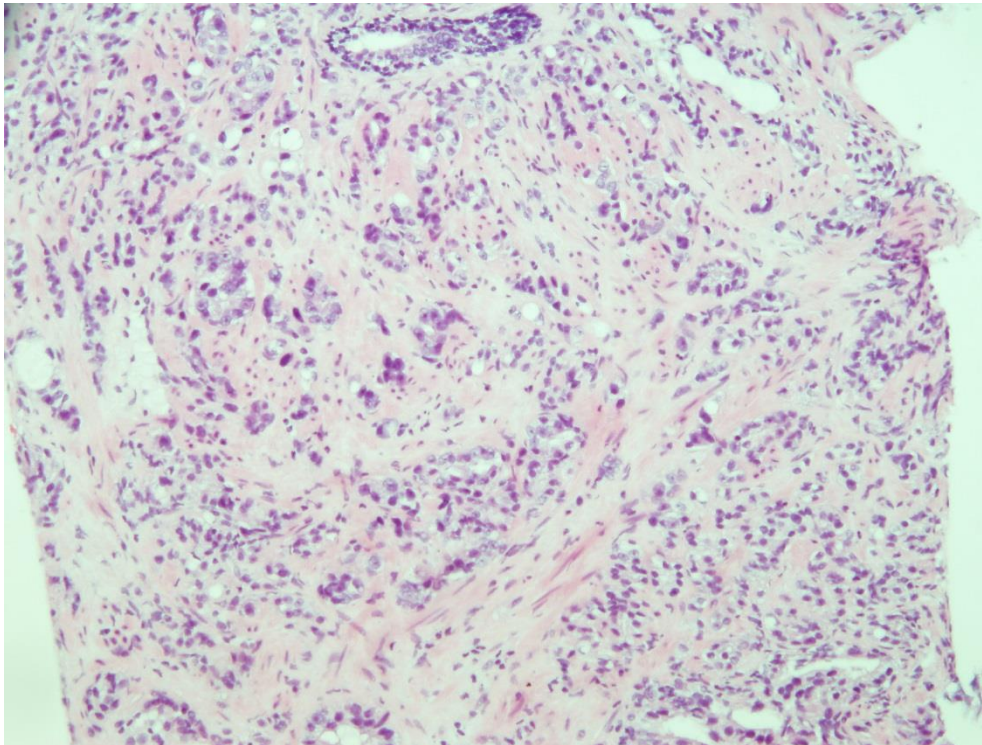
Tradicionalni Gleasonov zbroj	Gradusna skupina
6 (3+3)	1
7 (3+4)	2
7 (4+3)	3
8 (4+4); (3+5); (5+3)	4
9-10 (4+5); (5+4); (5+5)	5

Novi sustav gradiranja bazira se na 5 gradusnih skupina, a uveden je zbog toga što je jednostavniji za primjenu, bolje i sigurnije utječe na predviđanje ishoda bolesti i utječe na izbor adekvatnije terapije (12).



Slika 3. Gleasonov crtež prikazuje pet Gleasonovih stupnjeva diferenciranosti raka prostate.

Zaokružena područja otprilike pokrivaju gradusne skupine (12)



Slika 4. Karcinom prostate, Gleasonov zbroj (4+4), Gradusna skupina 4. (HEX100)

U slučaju lokaliziranog karcinoma prostate provodi se aktivni nadzor uključuje kontrolu PSA svaka 3 mjeseca, DRP svakih 6 mjeseci, ponovljenu biopsiju nakon 1. i 4. godine te praćenje simptoma. Radikalna prostatektomija kirurški je tretman karcinoma prostate koji uključuje odstranjenje prostate i sjemenih mjehurića s regionalnom zdjeličnom limfadenektomijom ili bez nje retropubičnim, perinealnim ili laparoskopskim pristupom. Preporučuje se u pacijenata niskog i srednjeg rizika s lokaliziranom bolesti (T1, T2), Gleasonovim zbrojem 6 – 7, PSA < 20 ng/ml i očekivanim životnim vijekom dužim od 10 godina. Radioterapija je prvi izbor u liječenju bolesnika s lokaliziranim karcinomom prostate kod kojih je operacijski rizik prevelik s obzirom na opće stanje ili komorbiditete te za one s očekivanim životnim vijekom kraćim od 10 godina (9).

Prva linija liječenja uznapredovalih karcinoma je hormonskom terapijom, primjenom LH-RH agonista (triptorelin, goserelin, leuprolid, buserelin) ili rjeđe LH-RH-antagonista (abareliks, degareliks, cetoreliks). Također se koriste i steroidni i nesteroidni antiandrogeni (9).

1.4. UPALA PROSTATE (PROSTATITIS)

Etiologija upale u prostati nije još uvijek razjašnjena. Mogući uzroci su: infekcije, fizičke traume, refluks urina, autoimuni procesi, dijetne navike, genetski faktori i starenje. Histološka upala također može biti rezultat preboljele infektivne upale bez prikladne simptomatologije.

98,1% bolesnika nakon TURP-a ima određen stupanj upalne infiltracije (13).

Pozitivna je korelacija između vrijednosti serumskog PSA i histološkog nalaza prostatitisa nakon TURP-a. Nakon stanične smrti dolazi kod abnormalne elevacije serumskog PSA kod prostatitisa, zbog izlaska PSA iz epitelnih stanica u cirkulaciju (14).

Smatra se da kronična upala prostate može inducirati karcinogenezu zbog defekta stanica i genoma, te da može stvoriti mikrookoliš bogat citokinima i faktorima rasta što dovodi do angiogeneze, replikacije stanica i reparacije tkiva (15).

Različiti biomarkeri istražuju se intenzivno zbog još uvijek nerazjašnjenih regulatornih mehanizama i signalnih puteva u stanici koji kontroliraju rast i diferencijaciju tumora. Uz aktualne markere koji mogu primijeniti u rutinskoj dijagnostici, istražuje se i angiogeneza.

1.5. ANGIOGENZA

Krvne žile mogu nastati na tri načina: vaskulogenezom, angiogenezom i ekspanzivnim rastom i remodeliranjem pre-egzistirajuće vaskularne mreže stvaranjem kolaterala (16).

Vaskulogeneza je nastanak krvnih žila iz endotelnih progenitorskih stanica koje dolaze iz mezoderma. Hemangioblast označava zajedničkog prekursora hematopoetskih i endotelnih stanica, a vaskulogeneza mezoderma splahnhične regije je intimno vezana za nastanak hematopoeze (17).

Za razliku od vaskulogeneze angiogeneza označava proces nastanka novih krvnih žila pupanjem iz postojeće krvožilne mreže kada se endotelne stanice generiraju iz endotela okolnih krvnih žila stvarajući izdanke, a kasnije se u procesu arteriogeneze ti izdanci stabiliziraju dijeljenjem i sazrijevanjem muralnih stanica (16). Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) može promovirati razvoj endotelne stanice iz prekursora (18).

Prva stepenica u rastu krvnih žila iz postojeće vaskularne mreže je degradacija subendotelne bazalne membrane i okolnog ECM. Proteinaze omogućuju proteolitičku razgradnju i mnoge od njih se nalaze u matriksu uključujući i plazminogen aktivator i njegov inhibitor, matriksne metaloproteinaze (MMP) te tkivno specifične inhibitore MMP, heparanaze, dymaze, tryptaze, katepsine i mnoge druge. Ekstracelularno, dobro koordinirana pericelularna proteolitička aktivnost metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora kontrolira dostupnost angiogenih faktora i citokina (19).

Vaskularni tuneli (engl. vascular guidance tunnels) predstavljaju otisak unutar kojeg se odvijaju stanična kretanja, formacija i remodeliranje vaskularnih cijevi, a nastaju degradacijom ECM od strane endotelnih stanica. Kasnije se u tunelima regrutiraju i proliferiraju periciti koji stupaju u interakciju s endotelnim stanicama (20).

Promjene u matriksu dovode do natezanja i stanjenja bazalne membrane na mjestima stvaranja novih kapilarnih korita, a promjene u citoskeletu endotelnih stanica kao reakcija na promijenjen status adhezijskih molekula u tom dijelu stijenke i okružja potiču stanični rast i motilitet. Osim ovakve pupajuće postoji i nastanak krvnih žila intususepcijom s nastankom vaskularnih kanala.(21, 22).

1.6. TUMORSKA ANGIOGENEZA

Angiogeneza je u tumoru ključna za rast, razvoj i metastaziranje tumora. Novostvorene krvne žile, opskrbljuju tumor kisikom i hranjivim tvarima te uklanjaju otpadne metabolite. Osim toga,

one čine izvor čimbenika rasta, citokina i hormona koje tumor koristi, imaju proteolitičku aktivnost koja potiče invazivni fenotip, izvor su cirkulirajućih endotelnih stanica koje se mogu ugraditi u nove krvne žile i omogućuju stanicama tumora metastaziranje (23).

Karcinom prostate je ovisan o sposobnosti formiranja novih krvnih žila, koje mu podupiru rast i omogućavaju invaziju u okolno tkivo i udaljene metastaze (24).

Tablica 3. Angiogeni faktori u karcinomu prostate (25)

Proangiogeni	Antiangiogeni
Matriks metaloproteinaze (MMP)	Tkivni inhibitor metaloproteinaza 1 (TIMP-1)
Vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF)	Interleukin 10 (IL-10)
Bazični faktor rasta fibroblasta 2 (bFGF-2)	Endostatin
Faktor rasta fibroblasta 4 (FGF-4)	Angiostatin
Transformirajući faktor rasta β 1 (TGF- β 1)	Prostata specifični antigen (PSA)
Interleukin 8 (IL-8)	Interferon (IFN)
Interleukin 6 (IL-6)	
Interleukin 1 β (IL-1 β)	
Ciklooksigenaza 2 (COX-2)	
Dušikov oksid (NO)	
Tumor nekroza faktor (TNF)	
Inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1)	

Osim čimbenika na angiogenezu, u prostati utječe i hipoksija (nastaje kad tumor preraste svoj krvožilni sustav) koja putem hipoksijom induciranog faktora I (engl. *hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1) inducira ekspresiju VEGF-a. Čini se da na ekspresiju VEGF-a u stanicama karcinoma

prostate i fibroblastima prostate utječu i androgeni. Dušikov oksid kojeg produciraju stanice tumora prostate, ali i normalne prostate također djeluje proangiogeni. PSA ovisno o serumskim razinama ima antiangiogenu aktivnost i inhibira odgovor endotelnih stanica i na VEGF i na bazični faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF). Ta antiangiogena aktivnost PSA možda može objasniti sporu progresiju nekih tumora prostate (25).

2. SVRHA RADA

Svrha ovog istraživanja je evaluirati korisnost broja krvnih žila kao dijagnostičkog parametra u ranoj detekciji karcinoma prostate. Specifični ciljevi su bili:

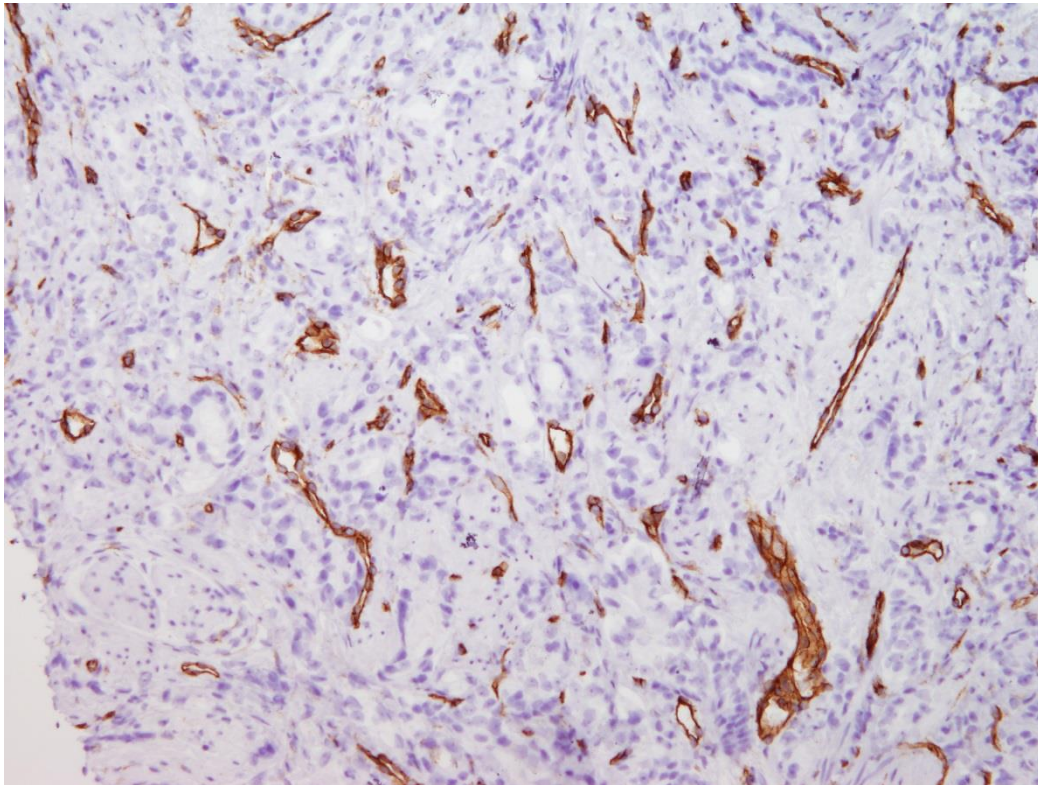
- 1.) imunohistokemijski odrediti broj krvnih žila u biopsijama prostate unutar skupina s nalazom nespecifičnih promjena, benigne prostatične hiperplazije i karcinoma
- 2.) usporediti broj krvnih žila u patohistološkim uzorcima između pojedinih dijagnoza
- 3.) usporediti PSA vrijednosti i broja krvnih žila između pojedinih skupina
- 4.) definirati prijelomne vrijednosti broja krvnih žila i PSA vrijednosti za dijagnozu karcinoma prostate
- 5.) Evaluirati korisnost ispitivanih dijagnostičkih parametara

3. MATERIJALI I POSTUPCI

Istraživanje je uključilo 69 patohistoloških uzoraka dobivenih transrektalno ultrazvučno vođenom biopsijom prostate. Patohistološke dijagnoze podijeljene su u tri skupine: nespecifične promjene, benigna hiperplazija prostate, te karcinom. Analizirani su parametri: dob bolesnika, preoperativne PSA vrijednosti, broj krvnih žila, a kod karcinoma još i Gleason zbroj i gradusna skupina.

Na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci patolog je standardnim histološkim metodama pregledao i postavio dijagnozu za svaki uzorak tkiva, a za uzorke karcinoma prostate odredio, Gleason zbroj i gradusnu skupinu. Za 60 odabranih uzoraka učinjeno je imunohistokemijsko bojenje za prikaz endotela krvnih žila. Imunohistokemijskom analizom, koristeći standardnu ABC tehniku na parafinskim rezovima, obojene su endotelne stanice pomoću CD31 antigena (DAKO, klon JC70A, Dakocytomation, Denmark). Broj krvnih žila određen je korištenjem svjetlosnog mikroskopa. Na srednjem povećanju (x200) su određena tri područja najvećeg broja krvnih žila u svakom preparatu koje smo nazvali «vruće točke» (engl. Hot spots). U svakom od tih područja na najvećem povećanju (x400) se određivao broj krvnih žila, a uzimalo se u obzir vidno područje s najvećim brojem krvnih žila. Pojedinačne endotelne stanice ili nakupine endotelnih stanica s jedva vidljivim lumenom ili bez lumena su smatrane pojedinačnim krvnim žilama i stoga uključene u analizu. Primjer analiziranog uzorka nalazi se na slici 5.

Za statističku obradu podataka korišten je softverski paket MedCalc Statistical Software version 14.8.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; 2014). Za statističku analizu podataka korištene su metode deskriptivne statistike te neparametrijski Mann-Whitney test, budući nije dokazana normalnost podataka. Korištene su i ROC analiza i metoda logističke regresije.



Slika 5. Karcinom prostate, gradusna skupina 4 . Imunohistokemijskim bojenjem koristeći CD31 antigen koji prepoznaje endotel obilježili smo krvne žile koje se na slici vide kao smeđe strukture (CD31X100)

4.REZULTATI

Istraživanje je uključilo 69 patohistoloških preparata od kojih je, 28 bilo nespecificiranih nalaza, 21 s dijagnozom BHP, a 20 preparata s dijagnozom karcinoma. Medijan dobi pacijenata je 67 sa rasponom od 53 do 80 godina. U Tablici 4. navedene su PSA vrijednosti po dijagnozama

Tablica 4. Razina PSA vrijednosti po dijagnozama

	N	Medijan	Minimum	Maksimum
BHP	21	4,38	0,50	30,00
nespecificirano	28	5,43	0,66	15,28
karcinom	20	9,44	2,79	150,00

Tablica 5. Korelacija PSA vrijednosti sa brojem krvnih žila

N	r	P	95% CI
58	-0,03	0,80	-0,29-0,23

Korelacija između PSA vrijednosti i broja krvnih žila nije se pokazala statistički značajnom što se prikazuje u Tablici 5. Ukoliko se pokaže značajnost broja krvnih žila kao prediktorom, to će nam govoriti o tome da ga ima smisla dodatno iskoristiti.

U tablicama od 5-8 prikazuje se broj krvnih žila prema dijagnozama.

Tablica 6. Usporedba broja krvnih žila kod pacijenta s BHP i drugim dijagnozama (upale i nespecificirani, karcinom)

	N	Medijan	Minimum	Maksimum
Druge dijagnoze	39	24.00	8.30	143.00
BHP	21	19.70	9.90	39.00

Nije nađena statistički značajna razlika u broju krvnih žila između skupina sa dijagnosticiranim BHP-om i skupini s drugim dijagnozama ($p=0,1702$).

Tablica 7. Usporedba broja krvnih žila kod pacijenata s nespecificiranim nalazima i drugim dijagnozama (BHP, karcinom)

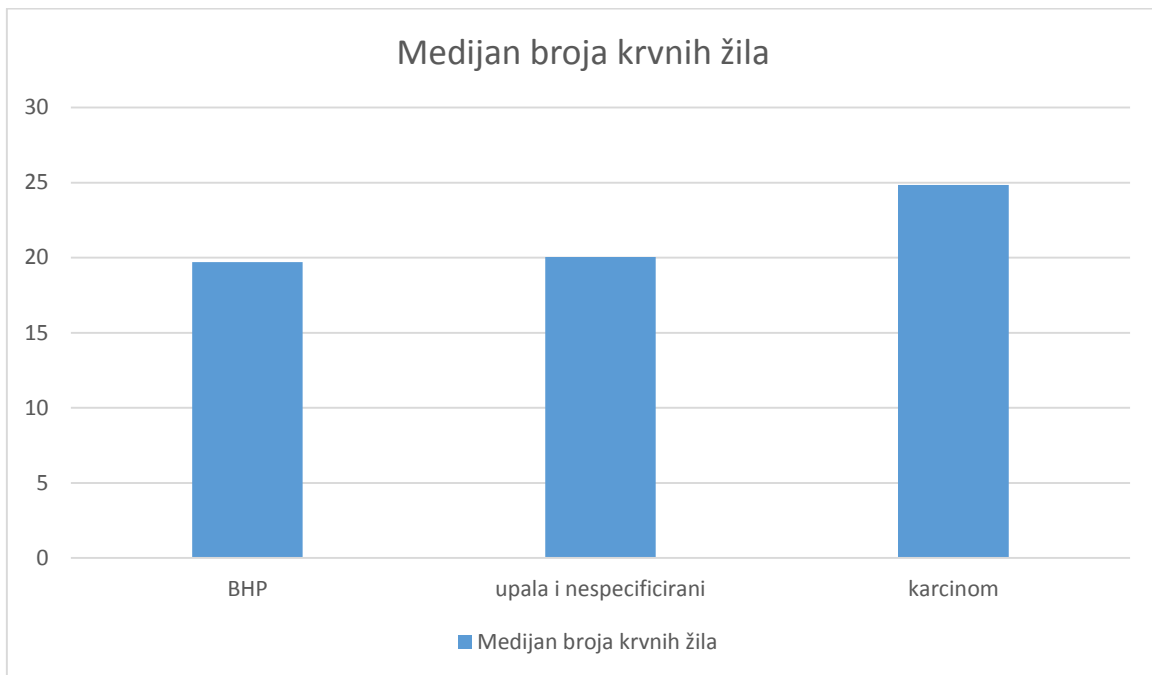
	N	Medijan	Minimum	Maksimum
Druge dijagnoze	32	23,20	9,90	41.30
Upala i nespec.	28	20,05	8,30	143.00

Nije nađena statistički značajna razlika u broju krvnih žila između skupina s nespecificiranim nalazima i drugim dijagnozama ($p=0,3066$).

Tablica 8. Usporedba broja krvnih žila kod pacijenata s dijagnozom karcinoma i drugim dijagnozama (upale i nespecificirani, BHP)

	N	Medijan	Minimum	Maksimum
Druge dijagnoze	40	20,55	8,30	143,00
Karcinom	20	24,85	14,30	41,30

Nije nađena statistički značajna razlika u broju krvnih žila između skupine s dijagnozom karcinoma i drugim dijagnozama ($p=0,1676$).



Slika 6. Prikaz broja krvnih žila između pacijenata s obzirom na dijagnozu

U Slici 6. prikazana je srednja vrijednost broja krvnih žila kod pacijenata s dijagnozom BHP, upalom i nespecificiranim nalazima te karcinomom

Uspoređujući pojedine grupe pokazalo se da nema statistički signifikantne razlike u broju krvnih žila između skupine pacijenata sa karcinomom i skupine s upalom i nespecificiranim dijagnozama ($p=0,1741$), kao ni između skupine s upalom i nespecificiranim dijagnozama i skupine s dijagnozom BHP-a ($p=0,7773$). Utvrđena je slabo signifikantna razlika u broju krvnih žila između skupine s BHP i skupine s karcinomom ($p=0,0977$).

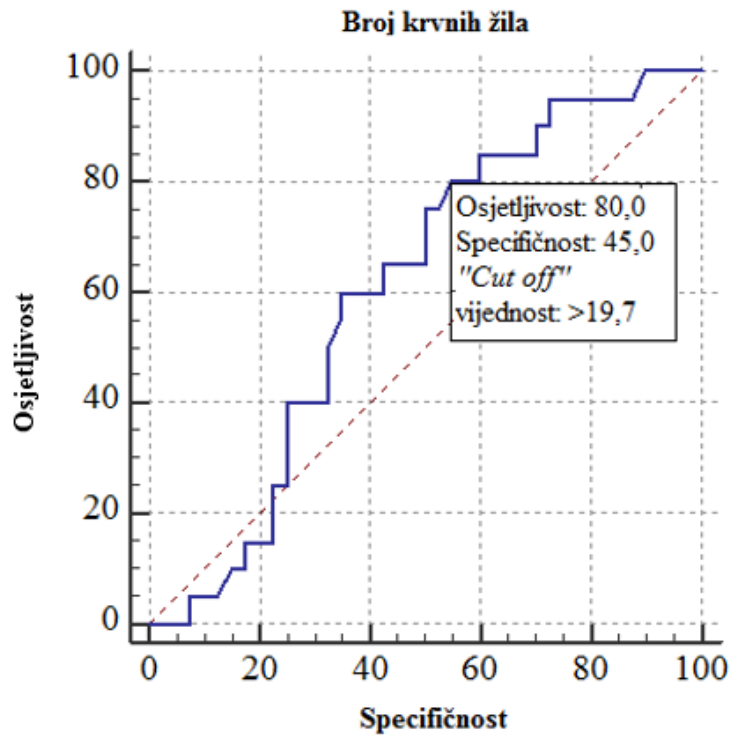
Tablica 9. Srednja vrijednost i raspon broja krvnih žila za pacijente s BHP i karcinomom

	N	Medijan	Minimum	Maksimum
BHP	21	19,70	9,90	39,00
Karcinom	20	24,85	14,30	41,30

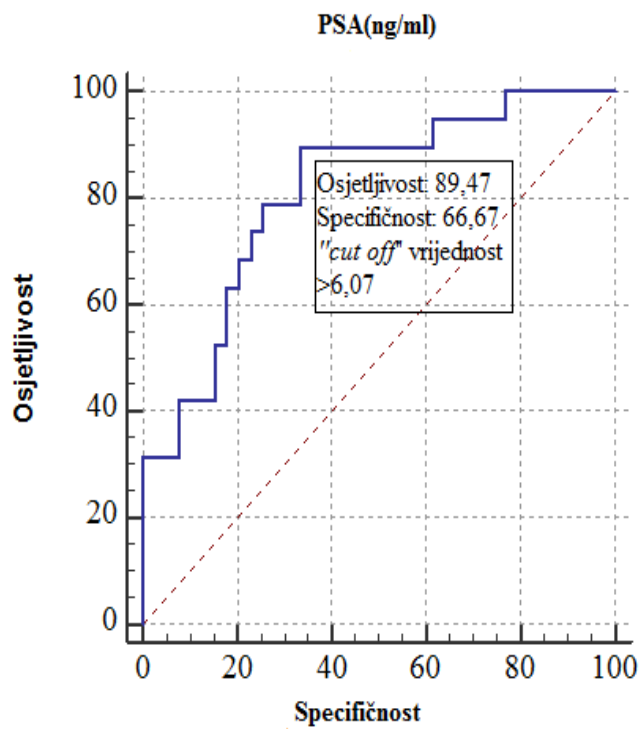
ROC analizom, temeljem Youdenovog indeksa (J) utvrđena je prijelomna, odnosno „cut-off“ vrijednost broja krvnih žila $>19,7$ kao optimalna vrijednost za dijagnozu karcinoma, pri čemu osjetljivost iznosi 80,00%, a specifičnost 45,00%. Pripadna ROC krivulja prikazana je na Slici 7.

Ovom ROC analizom također je, temeljem Youdenovog indeksa (J) utvrđena je prijelomna, odnosno „cut off“ vrijednost broja krvnih žila $\leq 20,1$ kao optimalna vrijednost za dijagnozu nespecificiranih nalaza pri čemu je optimalan odnos osjetljivosti i specifičnosti testa bio 53,57% za osjetljivost i 68,75% za specifičnost.

Ovom analizom, također temeljem Youdenovog indeksa utvrđena je prijelomna, odnosno „cut off“ vrijednost $>6,07$ za PSA kao optimalna vrijednost za dijagnozu karcinoma prostate s osjetljivošću od 89,47% i specifičnošću 66,67% (Slika 6). Pripadna ROC krivulja prikazana je na Slici 8.



Slika 7. ROC krivulja za broj krvnih žila kod dijagnoze karcinoma prostate



Slika 8. ROC krivulja za PSA vrijednost za dijagnozu karcinom prostate

S obzirom na definirane prijelomne vrijednosti za broj krvnih žila ($>19,7$) i PSA ($>6,07$) kod dijagnoze karcinoma prostate u dijagnostičkom modelu sa oba parametra dobivena je osjetljivost 70,00% te specifičnost 85,00%, a u dijagnostičkom modelu koji koristi bilo koji od ta dva parametra osjetljivost od 95,00%, ali specifičnost pada na 22,50%. Sistematičan prikaz usporedbe dijagnostičkih postupaka prikazan je u tablici 9.

Tablica 9. Usporedba dijagnostičkih modela kod pacijenata sa karcinomom prostate utvrđena ROC analizom

	PSA($\geq 6,07$)	Krvne žile ($>19,07$)	Oba parametra	Jedan parametar
Osjetljivost	89,47	80,00	70	85
Specifičnost	66,67	45,00	85	22,5

U danjem ispitivanju prognostičke vrijednosti pojedenih parametara provodi se univarijatna i multivarijatna logistička regresijska analiza.

Univarijatni model sa brojem krvnih žila kao prediktorom nije se pokazao statistički značajnim ($p=0,0769$).

Univarijatni model u kojem je prediktor karcinoma bio PSA vrijednost pokazao se statistički značajnim ($p=0,0009$), pri čemu se dobiva omjer šansi od 10,52 (95% interval povjerenja od 2,6245-42,1993) te je točno klasificirao 71,67% pacijenata. Detaljnijom analizom ovog modela dobiva se AUC vrijednost od 0,75, a modelom se uz prijelomnu vrijednost od $p=0,05$ korektno klasificira 71,67% pacijenata.

Tablica 10. Omjer šansi i interval pouzdanosti PSA i broja krvnih žila

Parametar	Omjer šansi	95% CI	P
PSA	12,60	2,94 – 54,03	0,0006
Broj krvnih žila	4,11	0,98 – 17,15	0,0526

Multivarijatan model koji uključuje oba parametara pokazao se statistički značajnim (0,0001). Rezultati ove analize prikazani su u Tablici 10. PSA se pokazuje kao značajan prediktor, dok je značajnost broja krvnih žila granična. Iako oba parametra nisu jasno signifikantni dobiva se vrlo visoka AUC vrijednost od 0,809, te se modelom uz prijelomnu vrijednost od $p=0,05$ korektno klasificira 80% pacijenata. Broj krvnih žila ne može se koristiti samostalno kao prediktor dijagnoze karcinoma međutim, zbog svoje relativno visoke specifičnosti, pokazuje se kao dobra nadopuna vrijednosti PSA pri čemu se broj korektno klasificiranih pacijenata povećava za 10%.

5. RASPRAVA

Podaci iz literature pokazuju da različiti faktori rasta i brojni angiogeni faktori mogu biti povezani sa agresivnim kliničkim tokom i lošom prognozom karcinoma prostate.

U rutinskoj kliničkoj dijagnostici malignih tumora prostate se koriste digitorektalni pregled (DRE), određivanje nivoa prostata specifičnog antigen seruma (PSA), transrektalni ultrazvuk (TRUS) i biopsija prostate. Definitivna dijagnoza se postavlja histopatološkim pregledom iglenih biopsija prostate, na osnovu kojih se određuju poznati prognostički parametri kao što su gradus tumora, prisustvo i /ili odsustvo perineuralne i invazije vaskularnih struktura. Stadij bolesti je među najvažnijim čimbenicima koji određuju prognozu i uvelike ovisi o angiogenezi (26).

Dijagnoza bazirana na PSA ne može sa sigurnošću predvidjeti koji pacijent će razviti klinički signifikantni zloćudni tumor, a koji BHP ili sporo rastući nesignifikantni karcinom. S druge strane, rijetko se javlja karcinom prostate koji odmah daje metastaze. Stoga je važno tražiti ključne pokazatelje čija vrijednost može ukazati na takav brzi razvoj maligne bolesti. Angiogeneza je primarni i osnovni uvjet za rast tumora i u našem istraživanju smo, koristeći broj krvnih žila kao kvantitativni marker, pokušali utvrditi da li ovaj proces možemo iskoristiti kao koristan u dijagnostičke svrhe. Međutim prema literaturi značaj angiogeneze u karcinomu prostate (PC) i dalje ostaje kontroverzno područje (27,28).

Iako trenutno nema biljega angiogenog djelovanja koji mogu pomoći dizajniranju specifičnih antiangiogenih strategija liječenja, razumno je pretpostaviti da će kvantifikacija različitih aspekata tumorskih krvnih žila dati barem naznaku angiogenog djelovanja u tumoru (29).

Različita istraživanja prikazuju doista različite rezultate. Tako na primjer Tretiakova i sur. nisu našli povećanu gustoću i broj krvnih žila u karcinomu prostate te zaključili da angiogeneza nije važan niti pouzdan biomarker za prognozu karcinoma prostate (30).

S druge strane van Niekerk i suradnici ustanovili su da normalno tkivo prostate pokazuje veliku heterogenost u odnosu na hiperplaziju i karcinom koji pokazuju povišene angiogene parametre uz smanjeni koeficijent varijabilnosti. Ni ovi autori kao ni naša studija nisu našli korelaciju između mikrovaskularnih i kliničko - patoloških parametara (31).

Vartanian i Weidner N. su kroz usporedbu broja krvnih žila u tumoru prostate i proliferacije tumorskih stanica zaključili da manjak korelacije proliferacije krvnih žila i proliferacije tumorskih stanica sugerira različite mehanizme regulacije proliferacije (32).

Steiner i suradnici su pokazali da nema značajne razlike za CD31 mRNA vrijednosti te CD 31 proteina na nivou imunohistokemije između normalnog prostatičnog tkiva i odgovarajućeg karcinoma implicirajući da tipično spororastući karcinom prostate ima nisku dinamiku angiogeneze kao i normalno tkivo (33).

Indijski autori su našli statistički značajniji veći broj krvnih žila u karcinomu u odnosu na BHP što mi nismo našli iako su i oni imali mali uzoraka tj. samo 50 uzoraka po dijagnozi. Kao ni naša studija nisu našli značajnu korelaciju s Gleason zbrojem, a povezanost s PSA je bila vrlo niske značajnosti. Kod karcinoma su međutim našli značajnu obrnuto proporcionalnu korelaciju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta i Gleason zbroja što sugerira prognostičku važnost ovog čimbenika rasta (27).

Matić i sur. su doveli u vezu kliničko patološke parametre i angiogenezu na malom broju uzoraka iglenih biopsija prostate koristeći srednju gustoću krvnih žila i zaključili da je gustoća značajno veća u karcinomu nego u BHP te da je u karcinomu povezana s Gleasonovim zbrojem

i PSA. U nastavku istraživanja bi možda mogli primijeniti tu metodu kvantificiranja angiogeneze (34).

U dostupnoj literaturi međutim, nismo našli statistički model primijenjen u ovoj studiji, koji ukazuje na važnost broja krvnih žila u sigurnijoj dijagnozi karcinoma ustanovljenoj na ultrazvučno vođenoj transrektalnoj iglenoj biopsiji prostate.

Pacijenti koji su inicijalno pozitivni na testu s visokom osjetljivošću, a niskom specifičnošću, trebali bi se još podvrgnuti testu sa niskom osjetljivošću, jer se na taj način veliki broj lažno pozitivnih rezultata može korektno klasificirati. Odnosno, ukoliko osoba ima povećanu PSA vrijednost, a uz to i povećan broj krvnih žila gotovo sigurno ima karcinom prostate.

6. ZAKLJUČAK

1. Uspoređujući skupine s dijagnozom BHP, nespecificiranim nalazima i karcinomom prostate s obzirom na broj krvnih žila kao dijagnostički parametar nije nađena statistički značajna razlika, jedino se između BHP i karcinoma može govoriti o statistički slabo signifikantnoj razlici.
2. Između PSA vrijednosti i broja krvnih žila nema korelacije, a krvne žile kao prediktor karcinoma prostate nisu statistički značajne..
3. Ukoliko pacijent ima povišenu PSA vrijednost i broj krvnih žila, može se reći da gotovo sigurno ima karcinom, jer se uporabom oba dijagnostička parametara veliki broj lažno pozitivnih nalaza može korektno klasificirati
4. PSA kao prediktor je statistički značajan i kao dijagnostički parametar točno klasificira 71,67% pacijenata sa karcinomom prostate, a model koji koristi PSA vrijednost i broj krvnih žila točno klasificira 80% pacijenata sa karcinomom prostate, što je povećanje za gotovo 10% točno klasificiranih nalaza.
5. Broj krvnih žila samostalno nije dobar prediktor dijagnoze karcinoma međutim zbog svoje relativno visoke specifičnosti pokazuje se kao dobra nadopuna vrijednosti PSA pri čemu se broj korektno klasificiranih pacijenata povećava za 10%.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja je procijeniti korisnost broja krvnih žila kao dijagnostičkog parametra u ranoj detekciji karcinoma prostate te usporediti broj krvnih žila u patohistološkim uzorcima između najčešćih oboljenja prostate.

Ovo retrospektivno istraživanje uključuje kliničke i patohistološke podatke i uzorke Klinike za urologiju i Zavoda za patologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Na iglenim biopsijama karcinoma prostate (n=20), benigne hiperplazije prostate (n=21) i prostatitisa i nespecificiranih nalaza (n=28) je, nakon rutinske obrade, primijenjena imunohistohemijska metoda sa CD31 protutjelima. Ispitanicima je promatrana i razina serumskog PSA.

Broj krvnih žila se računao brojanjem CD31 pozitivnih struktura u tri područja najvećeg broja krvnih žila u svakom preparatu koje smo nazvali «vruće točke». Za statističku obradu rezultata korišten je programski paket MedCalc Statistical Software version 14.8.1

Korelacija između PSA vrijednosti i broja krvnih žila nije se pokazala statistički značajnom.

Univarijatni model u kojem je prediktor karcinoma bio PSA vrijednost pokazao se statistički značajnim ($p=0,0009$), te je točno klasificirao 71, 67% pacijenata s karcinomom prostate.

Multivarijatni model koji uključuje broj krvnih žila i PSA vrijednost kao parametare pokazao se statistički značajnim ($0,0001$), te se tim modelom uz prijelomnu vrijednost od $p=0,05$ korektno klasificira 80% pacijenata s karcinomom prostate.

Broj krvnih žila, kao dijagnostički parametar, samostalno nije dobar prediktor dijagnoze karcinoma prostate, međutim zbog svoje relativno visoke specifičnosti pokazuje se kao dobra nadopuna vrijednosti PSA pri čemu se broj korektno klasificiranih pacijenata povećava za 10%.

Ključne riječi: angiogeneza, PSA vrijednost, iglena biopsija prostate, karcinom prostate, benigna hiperplazija prostate

8. SUMMARY

The aim of the study was to evaluate the usefulness of blood vessel count as a diagnostic parameter in early detection of prostate cancer and to compare the number of blood vessels in pathohistological samples among the most common prostate diseases.

This retrospective study included clinical and pathohistological data and samples from the Urology Clinic and the Department of Pathology in University hospital, Rijeka. Prostate cancer biopsies (n = 20), benign prostatic hyperplasia (n = 21) and prostatitis and nonspecific findings (n = 28) were treated immunohistochemically with CD31 antibodies. The subjects were also screened preoperative PSA values.

The number of blood vessels were determined by counting the CD31 positive structures in the three areas of the largest number of blood vessels in each sample, we called the "hot spots".

For the statistical processing of the results, the software package MedCalc Statistical Software version 14.8.1 was used

The correlation between PSA values and the number of blood vessels has not been statistically significant. The univariate model in which the predictor of cancer was PSA was statistically significant ($p = 0,0009$) and was accurately classified 71, 67% of patients with prostate cancer. A multivariate model that included the number of blood vessels and the PSA values showed statistical significance (0.0001), and that model within value of $p = 0.05$ correctly classifies 80% of patients with prostate cancer.

The number of blood vessels, as a diagnostic parameter, is not a good predictor of the diagnosis of prostate cancer, but due to its relatively high specificity, it represent a good complementary data to PSA value, whereby the number of correctly classified patients increases by 10%

Key words: angiogenesis, PSA value, prostate needle biopsy, prostate cancer, benign prostatic hyperplasia

9. LITERATURA

1. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Perez and Brady's principle and practice of radiation oncology. 5th ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008; stranice 1439-75.
2. Prostate gland: Anatomy, histology and function. Urology – textbook[Internet]: Stadtbergen; 2015 [citirano May 2015]. Dostupno na: <http://www.urology-textbook.com/prostate-anatomy.html>
3. De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. De Vita, Hellman and Rosenberg's Cancer: Principles and practice of oncology. 10th ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011; stranice 2163-72
4. Barry MJ, Fowler FJ, Jr., Bin L i sur. The natural history of patients with benign prostatic hyperplasia as diagnosed by North American urologists. J Urol 1997;157:10–4; discussion 4–5.
5. Kuliš T, Gašparić M, Prižmić M, Kovačić D, Kolumbić Lakoš A, Kaštelan Ž. Simptomi i kvaliteta života u bolesnika s BPH.
6. Wilson JD. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. Am J Med. 1980 May;68(5):745-56.
7. Parsons JK, Eifler JB, Han M. Handbook of urology 1st Ed. Wiley-Blackwell;2014.
8. Ivica Mokos. Benign Prostatic Hyperplasia and Lower Urinary Tract Symptoms
9. Ružić B., Knežević M. Karcinom prostate. Medicus 2015;25(1):45-50

10. Šitum M, Gotovac J, i sur. Urologija. 2. Izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 132-133.
11. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2013; stranice 180-86.
12. Đorđević G, Štifter S, Štemberger C. Pathohistological diagnosis of prostate cancer. *medicina fluminensis* 2017; 53(3):252-263
13. Schoenfield L, Jones JS, Zippe CD i sur. The incidence of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical glands suspicious for carcinoma on first-time saturation needle biopsy, and the subsequent risk of cancer. *BJU Int* 2007;99:770-4.
14. Hashui Y, Marutsuka K, Asada Y i sur. Relationship between serum prostate specific antigen and histological prostatitis in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 1994;25:91-9.
15. Cerutti PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 1991;3:1-7.
16. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of Internal Medicine* 2004; 255: 538-561
17. Eichmann A, Pardanaud L, Li Yuan, Delphine M. Vasculogenesis and the Search for the Haemangioblast. *Journal of Haematotherapy & Stem Cell Research*, 2002;11(2): 207-214
18. Yamashita J, Itoh H, Hirasima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as a vascular progenitors. *Nature* 2000; 408: 92-96

19. van Hinsberg V. W.M, Engelse M.A, Quax P.H.A. Pericellular Proteases in Angiogenesis and Vasculogenesis, *Arterioscler.Thromb. Vas. Biol.* 2006;26:716-728
- 20.Stratman A.N, Koh W, Davis M.J, Davis G E. Vascular guidance tunnels direct endothelial cell-pericyte interactions and basement membrane deposition. *The FASEB Journal*, 2008;22:746-12
- 21.Sund M, Xie L, Kalluri R. The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis.*APMIS.*2004;112:450-462
22. Djonov V, Baum O, Burri PH, Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis.*Cell Tissue Res* (2003);314:107-11
23. Harper J, Moses MA. Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications. *Exs.* 2006(96):223-68. Epub 2005/12/31.
24. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *The American journal of pathology.* 1995;147(1):9-19. Epub 1995/07/01.
25. Izawa JI, Dinney CP. The role of angiogenesis in prostate and other urologic cancers: a review. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne.* 2001;164(5):662-70. Epub 2001/03/22.
26. Miyata, Yasuyoshi, et al. Pathological significance and prognostic role of microvessel density, evaluated using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy. *The Prostate* 2015; (75): 84-9

27. Gautam KA, et al. Angiogenesis in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia assessed by VEGF and CD34 IHC : A comparative clinicopathological study AfrJUrol (2018) 2018. 01. 009
28. Russo, G., Mischi, M., Scheepens, W., De La Rosette, J. J., and Wijkstra, H. (2012). Angiogenesis in prostate cancer: onset, progression and imaging. BJU Int. 110, E794–E808.
29. Gianluigi Taverna Grizzi, Piergiuseppe Colombo and Pierpaolo Graziotti, Fabio: Is angiogenesis a hallmark of prostate cancer? Front. Oncol., 06 February 2013
30. Tretiakova, M., Antic, T., Binder, D., Kocherginsky, M., Liao, C., Taxy, J. B., et al. (2012). Microvessel density is not increased in prostate cancer: digital imaging of routine sections and tissue microarrays. Hum. Pathol. pii: S0046-8177(12)00228-6.
31. van Niekerk, C. G., Witjes, J. A., Barentsz, J. O., van der Laak, J. A., and Hulsbergen-van de Kaa, C. A. (2012). Microvascularity in transition zone prostate tumors resembles normal prostatic tissue. Prostate. doi: 10.1002/pros.22588.
32. Vartanian, R. K., and Weidner, N. (1995). Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. Lab. Invest. 73, 844–850.
33. Steiner, I., Jung, K., Miller, K., Stephan, C., and Erbersdobler, A. (2012). Expression of endothelial factors in prostate cancer: a possible role of caveolin-1 for tumour progression. Oncol. Rep. 27, 389–395.
34. Stevan Matić, Milena Rakočević Tomislav Jocić Nataša Mihailović Snežana Jančić Mikrovaskularna gustina u iglenim biopsijama prostate - prediktor prognoze? PONS Med Č 2017 / PONS Med J 2017;09-13

10. ŽIVOTOPIS

Massimo Bembić je rođen 7. rujna 1993. godine u Rijeci. Osnovnu je školu završio u Osnovnoj školi Ivo Lola Ribar Labin, a opću gimnaziju u SŠ Mate Blažina u Labinu. 2012. godine upisuje Medicinski fakultet u Rijeci te je tokom studija sudjelovao u programu ljetnih razmjena u sklopu IFMSA, u Tartuu u Estoniji na odjelu otorinolaringologije te u Moskvi u Rusiji na odjelu ginekologije i opstetricije. Autor je nekoliko stručnih radova te poster prezentacija uz niz aktivnih i pasivnih sudjelovanja na kongresima u Hrvatskoj i inozemstvu.