

Koštani morfogenetski proteini i njihovi receptori u patogenezi karcinoma prostate

Španjol, Josip

Doctoral thesis / Disertacija

2005

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:586206>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Josip Španjol

KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI I NJIHOVI
RECEPTORI U PATOGENEZI KARCINOMA PROSTATE

Doktorska disertacija

Rijeka, 2005.

PODACI O AUTORU I DOKTORSKOM RADU

1. AUTOR

IME I PREZIME	Josip Španjol
DATUM I MJESTO ROĐENJA	17. svibnja 1976., Rijeka
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA DODIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2000.
NAZIV FAKULTETA I GODINA ZAVRŠETKA POSLIJEDIPLOMSKOG STUDIJA	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2004.
SADAŠNJE ZAPOSLENJE, ADRESA	KBC Rijeka, Klinika za kirurgiju, Tome Strižića 3, 51000 Rijeka

2. DOKTORSKI RAD

NASLOV	Koštani morfogenetski proteini i njihovi receptori u patogenezi karcinoma prostate
USTANOVA NA KOJOJ JE PRIJAVLJEN I IZRADEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
BROJ STRANICA, SLIKA, GRAFIKONA, TABLICA I BIBLIOGRAFSKIH PODATAKA	Stranica 130, slika 27, tablica 6, bibliografskih podataka 66
ZNANSTVENO PODRUČJE, POLJE I GRANA	Znanstveno područje <i>biomedicina i zdravstvo</i> , znanstveno polje <i>kliničke medicinske znanosti</i> , znanstvena grana <i>urologija</i>
IME I PREZIME MENTORA	Prof.dr.sc. Dragica Bobinac, prof.dr.sc. Željko Fučkar
FAKULTET NA KOJEM JE OBRANJEN DOKTORSKI RAD	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

3. OCJENA I OBRANA

DATUM PRIJAVE TEME	12. studenog 2004.
DATUM PREDAJE RADA	10. svibnja 2005.
DATUM SJEDNICE FAKULTETSKOG VIJEĆA NA KOJOJ JE RAD PRIHVAĆEN	19. srpnja 2005.
POVJERENSTVO ZA OCJENU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Nives Jonjić, doc.dr.sc. Ivana Marić, prof.dr.sc. Petar Orlić
POVJERENSTVO ZA OBRANU DOKTORSKOG RADA	Prof.dr.sc. Nives Jonjić, doc.dr.sc. Ivana Marić, prof.dr.sc. Petar Orlić, prof.dr.sc. Dragica Bobinac, prof.dr.sc. Željko Fučkar
DATUM OBRANE	26. srpnja 2005.

Mentori disertacije: prof.dr.sc. Dragica Bobinac, dr.med. i prof.dr.sc. Željko Fučkar, dr.med.

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred

povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

Disertacija ima 130 listova.

UDK: 611-01:612.617.7:616-007.7(043)

PREDGOVOR

Ova doktorska disertacija izrađena je u sklopu projekta Ministarstva znanosti, tehnologije, školstva i športa Republike Hrvatske (broj projekta: 0062075). Ovom prilikom zahvalio bih se mentorima prof.dr.sc. Dragici Bobinac i prof.dr.sc. Željku Fučkaru za ustrajanu i bezgraničnu pomoć u izradi disertacije. Zahvalio bih se i gospođici Maji Pečar, VMS za pomoć u izradi shema i crteža te doc.dr.Ivani Marić i mr.sc. Gordani Đorđević na pomoći u obradi uzoraka.

SAŽETAK

CILJ disertacije je bilo proučavanje obrazaca ekspresije koštanih morfogenetskih proteina (BMP-2/4,-3,-5,-6,-7) i njihovih receptora (BMPR-IA,-IB,-II) u tkivima zdrave prostate, benigne hiperplazije prostate, karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama i u tkivu karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza, te samom tkivu koštanih metastaza karcinoma prostate.

MATERIJAL I METODE: Istraživali smo ukupno 95 uzoraka tkiva prostate podijeljenih u 4 grupe (normalna prostata, benigna prostatična hiperplazija, karcinom prostate bez dokazanih koštanih metastaza, karcinom prostate s dokazanim koštanim metastazama i koštane metastaze karcinoma prostate). Imunohistokemijski smo bilježili ekspresiju koštanih morfogenetskih proteina (BMP-2/4, -3, -5, -6, -7) i njihovih receptora (BMPR-IA, -IB i -II). Određivali smo udio pozitivnih stanica u svakom uzorku tkiva prostate i broj pozitivnih uzoraka po grupi. Pozitivnim uzorkom smatrao se onaj koji je imao $\geq 10\%$ imunohistokemijski pozitivnih stanica.

REZULTATI su pokazali kako je ekspresija BMP-7 najjača u koštanim metastazama karcinoma prostate (100% pozitivnih stanica) i u normalnoj prostati ($94,63 \pm 0,89\%$ pozitivnih stanica), a najslabija je ekspresija u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($22,55 \pm 32,38\%$ pozitivnih stanica). BMP-2/4 najjače je eksprimiran u normalnoj prostati ($87,77 \pm 11,42\%$ pozitivnih stanica). U koštanim metastazama te karcinomu prostate bez i s dokazanim koštanim metastazama BMP-2/4 eksprimiran je podjednako. BMP-3 jednako je slabo eksprimiran u svim grupama, osim u normalnoj prostati i koštanim metastazama koje ga ne eksprimiraju. BMPR-II najslabije je eksprimiran u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($5,59 \pm 17,46\%$ pozitivnih stanica) i u koštanim metastazama ($16,40 \pm 11,79\%$ pozitivnih stanica), dok je ekspresija u ostalim grupama podjednaka. U 100% uzoraka normalne prostate eksprimirani su svi koštani

morfofenetski proteini i receptori osim BMP-3 koji nije ekspimiran niti u jednom uzorku. Slična je ekspresija i u uzorcima koštanih metastaza karcinoma prostate, osim BMPR-II, koji je ekspimiran u 50% uzoraka. BMP-6 i -7 ekspimiraju najmanji broj uzoraka karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (45%).

ZAKLJUČCI: Važan trenutak u procesu koštanog metastaziranja karcinoma prostate predstavlja gubitak, tj. izrazito smanjenje ekspresije BMPR-II, te BMPR-IA, BMP-6 i -7. U stanicama koštanih metastaza karcinoma prostate izrazita je ekspresija osteoinduktivnih koštanih morfofenetskih proteina (BMP-2/4, -5, -6, -7), te je izrazito slaba ekspresija BMPR-II.

KLJUČNE RIJEČI: Imunolokalizacija; Adenom prostate, Karcinom prostate; Koštane metastaze, patogeneza; Koštani morfofenetski proteini, receptori.

SUMMARY

OBJECTIVES were to analyze the expression patterns of bone morphogenetic proteins (BMP-2/4,-3,-5,-6,-7) and their receptors (BMPR-IA,-IB,-II) in the tissue of normal prostate, benign prostatic hyperplasia, prostate cancer without proven bone metastases, prostate cancer with proven bone metastases, and in the tissue of prostate cancer bone metastases.

MATERIAL AND METHODS: We have investigated 95 samples divided in 4 groups (normal prostate, benign prostatic hyperplasia, prostate cancer without proven bone metastases, prostate cancer with proven bone metastases, and prostate cancer bone metastases). The expression of bone morphogenetic proteins (BMP-2/4,-3,-5,-6,-7) and their receptors (BMPR-IA,-IB,-II) in the tissue was determined by immunohistochemistry.

We have determined the percentage of positive cells in each tissue sample. Positive samples were those with $\geq 10\%$ positive cells.

RESULTS are showing that BMP-7 has the strongest expression in prostate carcinoma bone metastases (100% positive cells) and in normal prostate ($4,63 \pm 0,89\%$ positive cells). The weakest expression is in prostate cancer with proven bone metastases ($22,55 \pm 32,38\%$ positive cells). The strongest expression of BMP-2/4 is in normal prostate ($87,77 \pm 11,42\%$ positive cells). The expression of BMP-3 is equally low in all groups, except in normal prostate and bone metastases where it is not expressed at all. The lowest expression of BMPR-II is in prostate cancer with proven bone metastases ($5,59 \pm 17,46\%$ positive cells) and in bone metastases ($16,40 \pm 11,79\%$ positive cells). 100% of all samples express all tested BMPs and BMPRs, except BMP-3 which is not expressed. The smallest number of prostate cancer with proven bone metastases samples express BMP-6 and -7 (45%).

CONCLUSIONS: The important moment in development of prostate cancer bone metastases is the loss of expression of BMPR-II, -IA, BMP-6, and -7. The cells of prostate

cancer bone metastases are showing strong expression of osteoinductive bone morphogenetic proteins (BMP-2/4, -5, -6, -7). The expression of BMPR-II was extremely low.

KEY WORDS: Immunolocalisation; Benign prostatic hyperplasia, Prostatic adenocarcinoma
Bone metastases, Pathogenesis; Bone morphogenetic proteins, Receptors.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. ANATOMIJA, EMBRIOLOGIJA, HISTOLOGIJA I FIZIOLOGIJA PROSTATE.....	3
1.1.1. EPITELNE STANICE.....	7
1.1.2. STROMALNE STANICE I EKSTRACELULARNI MATRIKS.....	8
1.1.3. KONTROLA RASTA PROSTATE	8
1.1.3.1. ENDOKRINI ČIMBENICI.....	10
1.1.3.2. ČIMBENICI RASTA.....	11
1.1.3.3. STROMALNO-EPITELNE INTERAKCIJE.....	14
1.1.4. SEKRETORNI PROTEINI PROSTATE.....	18
1.2. BOLESTI PROSTATE.....	19
1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA TUMORSKIH BOLESTI PROSTATE.....	19
1.2.2. KLINIČKE SMJERNICE U DIJAGNOSTICI I LIJEČENJU TUMORSKIH BOLESTI PROSTATE.....	24
1.2.2.1. BENIGNA PROSTATIČNA HIPERPLAZIJA (ADENOM PROSTATE).....	24
1.2.2.2. KARCINOM PROSTATE.....	26
1.2.3. PATOGENEZA TUMORSKIH BOLESTI PROSTATE.....	36
1.3. ULOGA I MEHANIZAM DJELOVANJA KOŠTANIH MORFOGENETSKIH PROTEINA.....	41
1.4. KOŠTANO METASTAZIRANJE TUMORA.....	48
1.5. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI I KARCINOM PROSTATE.....	55
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	60
3. MATERIJAL I METODE.....	61
3.1. MATERIJAL.....	61
3.2. METODE.....	64
3.3. STATISTIČKA ANALIZA.....	66
4. REZULTATI.....	67

5. RASPRAVA.....	87
6. ZAKLJUČCI.....	106
7. LITERATURA.....	108

1. UVOD

Prostata je žlijezda koja spada u skupinu akcesornih spolnih organa muškarca. Akcesorne spolne organe osim prostate u muškarca čine i seminalne vezikule i bulbouretralne žlijezde^{1,2}. Postoji izuzetna raznolikost u evoluciji, funkciji, anatomiji i biologiji ovih organa među različitim vrstama. Prisutnost prostate zajednička je svim sisavcima, ali su razlike u funkciji, anatomiji i patologiji znatne, što se očituje, primjerice, u količini ejakulata; kod svinje (250ml), čovjeka (3ml) i kod ovna (1ml)². Akcesorni spolni organi u čovjeka produciraju brojne, važne biološke čimbenike: fruktozu, limunsku kiselinu, spermin, prostaglandine, proteine i enzime kao što su imunoglobulini, proteaze, esteraze i fosfataze². Proizvodi ovih organa imaju važnu ulogu u poboljšanju uvjeta oplodnje, puferirajući okružje, povećavajući pokretljivost i preživljenje spermija te olakšavajući transport kroz muške i ženske spolne kanale². Anatomski smještaj omogućuje im sprječavanje ulaska patogena, lučenjem moćnih biološki protektivnih tvari u mokraćnu cijev².

Abnormalni, tumorski rast prostate uočen je samo u psa i čovjeka. Također je nepoznato zašto je tumorskim rastom zahvaćena samo prostata u čovjeka, dok primjerice nikad nije zabilježen tumor bulbouretralnih žlijezda i seminalnih vezikula^{2,3}.

Karcinom prostate je vodeći javno-zdravstveni problem muške populacije u razvijenim zemljama. Rak prostate je drugi uzrok smrtnosti među svim smrtima uzrokovanih rakom^{3, 4, 5}. Karcinom prostate postao je najčešći karcinom među muškarcima u SAD-u nadmašujući karcinom bronha. Incidencija mu raste u sve mlađim dobnim skupinama. Unatoč naprijetku na području molekularne biologije patogeneza karcinoma prostate nije do danas razjašnjena^{3,4}. Biološko ponašanje karcinoma prostate nije predvidivo. Neki pacijenti vrlo brzo podliježu bolesti i od nje umiru, dok drugi unatoč tome što im je dijagnosticiran karcinom prostate umiru u podmakloj životnoj dobi od uzroka nevezanih za sam karcinom,

stoga je klinički praktički nemoguće predvidjeti tijek bolesti u svakog pacijenta ponaosob^{3,4}. Epidemiološki pokazatelji karcinoma prostate razlikuju se ovisno o rasi, zemljopisnoj lokaciji, ekonomskom statusu, zdravstvenoj zaštiti i informiranosti pučanstva^{3,4}.

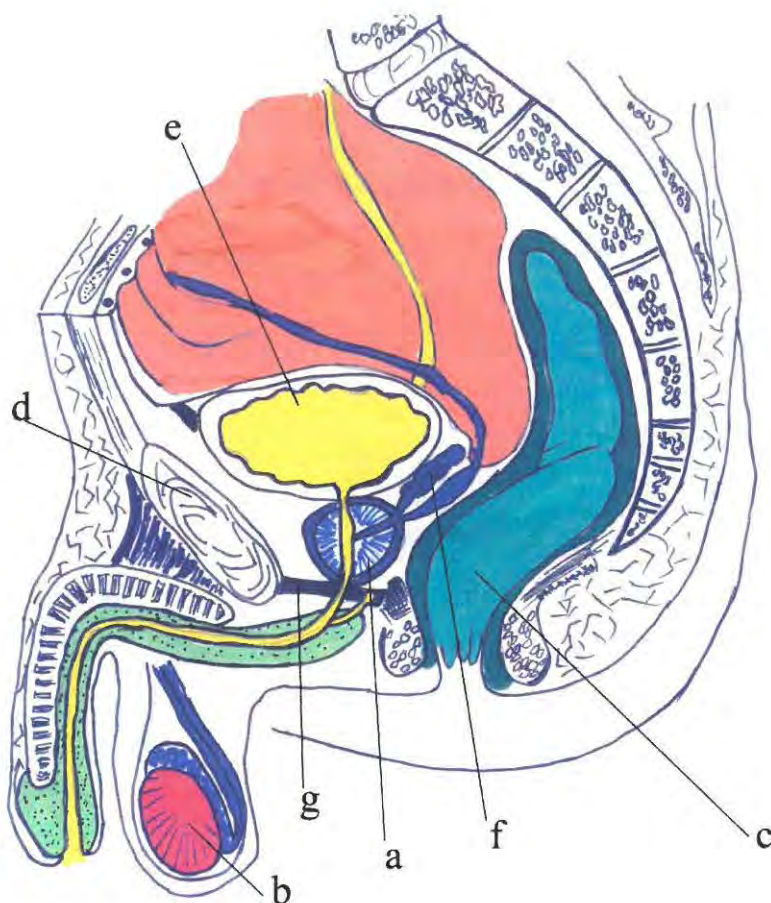
Najmanju incidenciju karcinoma prostate imaju zemlje Dalekog istoka, kao što su Indija, Japan i Kina, a najvišu zemlje Zapadne Europe, Australije i Sjeverne Amerike. Tako je u Kini incidencija 3/100000 muškaraca godišnje, u SAD-u 187/100000, a na Jamajci gdje prevladava crnačko stanovništvo 378/100000^{3,4}. Čimbenici rizika su nepoznati⁵.

Rast broja bolesnika s karcinomom prostate nastaje djelomično zbog rasta udjela starije populacije u zapadnim zemljama kao i dostupnosti boljih dijagnostičkih metoda (test za specifični antigen prostate - PSA i transrektalni ultrazvuk). Visoki stupanj smrtnosti u karcinomu prostate, pogotovo u mlađoj životnoj dobi, povezan je s agresivnošću tumora i nastankom koštanih metastaza^{3,4,5}. Metastaze karcinoma prostate češće su osteoplastične nego osteolitične^{3,4,5}. Mehanizam stvaranja nove kosti u osteoplastičnim lezijama karcinoma prostate je nepoznat, no povezuje se s mogućom produkcijom specifičnih čimbenika rasta koje stvaraju tumorske stanice prostate⁵. Do sada je nađeno kako stanice karcinoma prostate u čovjeka izlučuju različite regulirajuće čimbenike za rast koštanih stanica, kao što su fibroblastni čimbenici rasta i preobražavajući čimbenici rasta beta^{3,5}. Nadalje, stanice karcinoma prostate kao i tkivo normalne prostate eksprimiraju i neke koštane morfogenezne proteine (BMP), čija uloga u tkivu normalne prostate i tumora do sada nije razjašnjena⁶.

1.1. ANATOMIJA, EMBRIOLOGIJA, HISTOLOGIJA I FIZIOLOGIJA PROSTATE

Prostata je veličinom i oblikom slična pitomom kestenu. Smještena je kao žlijezda ispod mokraćnog mjehura, na kojeg je prislonjena bazom (*basis prostatate*), dok je vrh (*apex prostatae*) usmjeren prema dolje naslonjen na urogenitalnu dijafragmu. Prednja površina (*facies anterior*) gleda prema simfizi, dok je stražnja površina (*facies posterior*) od rektuma odijeljena sa frontalno postavljenim slojem vezivnog tkiva (*septum rectoprostaticum*). Parne površine (*facies inferolaterales*) odgovaraju *musculus levator ani*. Kroz prostatu vertikalno, bliže prednjoj površini, prolazi početni dio mokraćne cijevi (*pars prostatica urethrae*). Na stražnjoj strani baze u prostatu ulaze *ductus ejaculatorii* koji se otvaraju u mokraćnu cijev. Razlikujemo dva režnja prostate, *lobus dexter et sinister* koji su razgraničeni brazdom na stražnjoj površini (slika 1). Dio žlijezde između uretre i oba lobusa zovemo *isthmus prostatae* ili *lobus medius* ¹. Tkivo prostate možemo podijeliti na tri zone. Periferna zona čini 70% volumena prostate, centralna, smještena oko prostatične uretre 25%, a prijelazna, smještena između samo 5% (slika 2). Šezdeset do sedamdeset posto karcinoma prostate lokalizirano je u perifernoj zoni, 10-20% u prijelaznoj zoni, a svega 5-10% u centralnoj zoni. Benigna prostatična hiperplazija gotovo u svih bolesnika nastaje u prijelaznoj zoni ^{2, 3, 4, 5}. Također postoji i prednje fibromuskularno područje koje ne sadrži žljezdanih elemenata (slika 2a i b).

Akcesorne spolne žlijezde različite su s obzirom na embrionalno porijeklo i vrstu hormona koji stimulira njihov razvoj ².

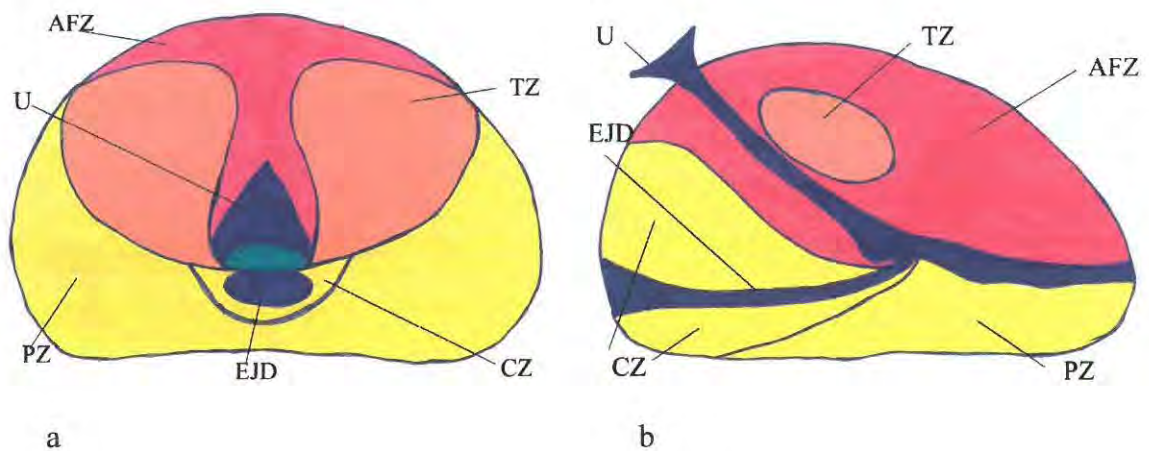


Slika 1. Presjek muške zdjelice u medijanoj ravnini. Prostata (a), testis (b), rectum (c), symphysis pubica (d), vesica urinaria (e), vesicula seminalis (f), diaphragma urogenitalis (g)

Seminalne vezikule, epididimis, *ductus deferens* i ejakulatorni kanali razvijaju se iz Wolffovih kanala. Njihov razvoj stimuliran je fetalnim testosteronom i završava oko trinaestog tjedna ².

Prostata se razvija iz urogenitalnog sinusa i to tako da pet epitelnih pupoljaka rastu straga s obje strane veromontanuma i urastaju u mezenhim. Gornji par pupoljaka koji tvore unutrašnju i prijelaznu zonu prostate je mezodermalnog porijekla, dok su pupoljci koji tvore vanjsku, perifernu zonu endodermalnog porijekla ². Važno je imati na umu kako benigna prostatična hiperplazija (BPH) nastaje rastom prijelazne tj. unutrašnje zone, a karcinom se uglavnom nalazi u perifernoj zoni ^{2, 3, 4}. Unutrašnja i periferna zona prostate smještene su koncentrično,

u krug oko prostatičnog dijela uretre. *Isthmus prostatae* građen je uglavnom od submukoznog i mukoznog tkiva te ejakulatornih kanala kao i ostataka Müllerovih kanala koji tvore *utricleus prostaticus*². Prostata je dobro diferencirana u četvrtom mjesecu fetalnog razvoja, a njezin je razvoj stimuliran dihidrotestosteronom (DHT).

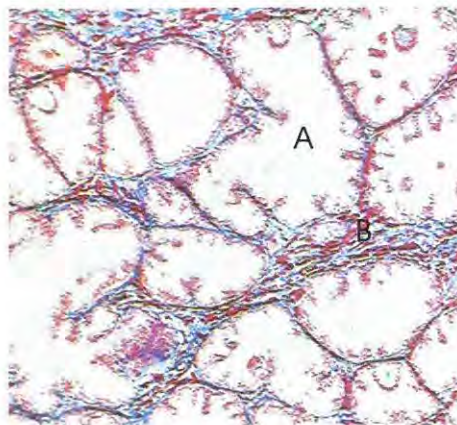


Slika 2. Sagitalni (a) i longitudinalni (b) presijek kroz prostatu. Tranzicionalna zona (TZ), periferna zona (PZ), centralna zona (CZ), anteriorna fibromuskularna zona (AFZ), uretra (U), ejakulatorni duktus (EJD)

Postnatalni razvoj prostate tijekom prvih pet mjeseci života pod snažnim je utjecajem majčinih steroida, prvenstveno estrogena te dolazi do blaže involucije^{2,3}. Kasniji je razvoj određen koncentracijom djetetovih steroida. Studije provedene na štakorima pokazale su kako neonatalna i prijepubertetska razina steroida igraju ključnu ulogu u dugoročnoj regulaciji rasta prostate koji je kasnije, nakon puberteta, pod utjecajem razine testosterona. Vjeruje se kako slična regulacija rasta prostate postoji i u ljudi^{2,3,4}.

Prostata je skup od 30 do 50 razgranatih tubuloalveolarnih žlijezda, kojima se odvodni kanali otvaraju u prostatični dio mokraćne cijevi. Prostata je okružena fibroelastičnom

čahurom bogatom glatkim mišićnim stanicama ¹. Od čahure polaze vezivno-tkivne pregrade. Žlijezde su okružene obilnom fibromuskularnom stromom. Dvije su jasno izražene skupine žlijezdi koje čine prostatu. Jedna je smještena više sprijeda i neposredno bočno od mokraćne cijevi, pod njenim epitelom (žlijezde mukoze), ostatak otpada na žlijezde submukoze i **glavne žlijezde** ^{1,2}. Glavne žlijezde izlučuju najveći dio volumena sekreta prostate. Prostata je histološki građena od epitelnih i stromalnih stanica (slika 3), te tkivnog matriksa -ekstracelularni matriks ².



Slika 3. Histološki prikaz građe prostate.

Žljezdani acinus (A), stroma (B)

1.1.1. EPITELNE STANICE

Cilindrične, sekretorne epitelne stanice luče prostatični sekret, ne dijele se, bogate su kiselim fosfatazom i prostata-specifičnim antigenom (PSA).

Prijelazne, proliferirajuće stanice se dijele i bogate su tiamidinom.

Bazalne, matične (stem cells) stanice manje su i ima ih do 10% u ukupnom broju epitelnih stanica. Bazalne stanice bogate su keratinom i gotovo nemaju drugih sekretornih produkata kao što je kiselina fosfataza. Njihova uloga za sada nije poznata, ali se smatra kako zbog građe stanične membrane sudjeluju u transportu tvari kroz bazalnu membranu žlijezda ^{2,3,4}.

Postoje tri tipa **neuroendokrinih stanica** u prostati. Najbrojniji tip luči serotonin i tiroid-stimulirajući hormon (TSH). Preostala dva tipa luče kalcitonin i somatostatin ².

1.1.2. STROMALNE STANICE I EKSTRACELULARNI MATRIKS

Stromalne stanice čine glatke mišićne stanice, fibroblasti i endotelne stanice. Glatke mišićne stanice grupirane su u skupinama (*cluster*) oko žljezdanih acinusa i u fibromuskularnoj kapsuli, a vjeruje se kako svojom kontrakcijom, pod kontrolom živčane stimulacije, dovode do izbacivanja prostatičnog sekreta ^{2,3}.

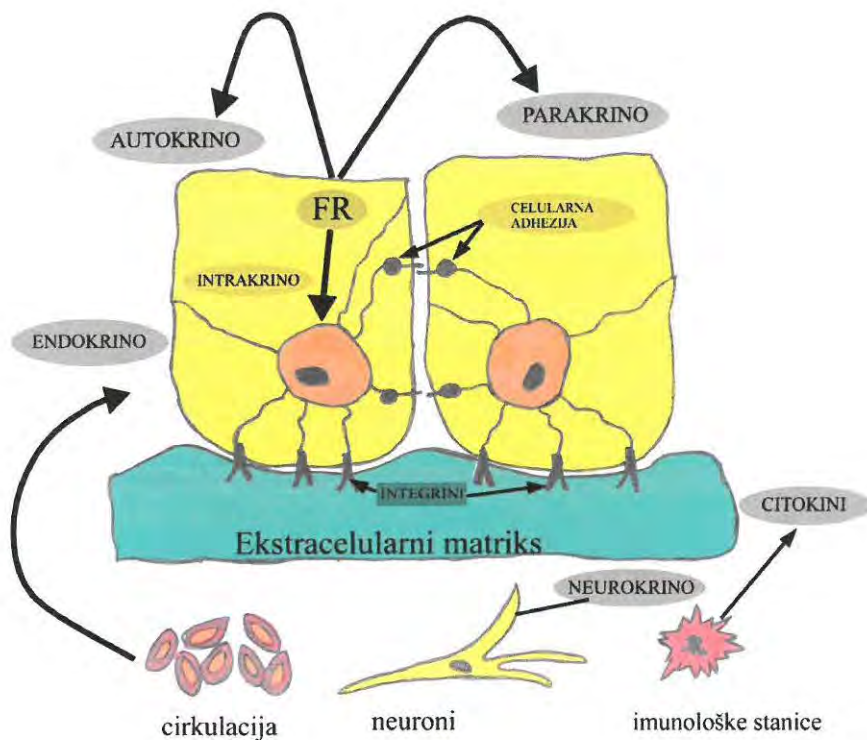
Ekstracelularni matriks čini bazalna membrana, bogata kolagenom tipa IV, lamininom i fibronektinom, zatim matriks bogat fibrilarnim kolagenom tipa I i III te elastinom, a nalazi se između glatkih mišićnih stanica te glikozaminoglikani kao što su hondroitin-, dermatan-, heparan-sulfat i hijaluronska kiselina ^{2,4}.

1.1.3. KONTROLA RASTA PROSTATE

Poznato je kako postoji više staničnih nivoa regulacije rasta i funkcije prostate, a koji uključuju: steroidne hormone, faktore rasta, neposrednu stanično-staničnu komunikaciju i interakciju s ekstracelularnim matriksom (slika 4). Stoga govorimo o :

- a) ENDOKRINIM ČIMBENICIMA: koji dolaze do prostate putem krvi, a nastaju u udaljenim endokrinim žlijezdama, a to su: testosteron tj. njegova aktivna forma dihidroksi-testosteron (DHT), estrogeni i serumski endokrini polipeptidni hormoni, kao što su prolaktin i gonadotropini,
- b) NEUROENDOKRINIM ČIMBENICIMA nastalim živčanom stimulacijom: serotonin, acetilkolin i noradrenalin,
- c) PARAKRINIM ČIMBENICIMA koji kao solubilne tkivne molekule inhibiraju ili potiču rast, a produciraju ih same žljezdane stanice prostate i okolnog stromalnog tkiva: fibroblastni čimbenik rasta beta (FGF- β) i epidermalni čimbenik rasta (EGF),
- d) AUTOKRINIM ČIMBENICIMA koje produciraju same stanice i koji preko svojih receptora ponovno djeluju na iste stanice koje su ih producirale,
- e) INTRAKRINI FAKTORI su čimbenici koji dijele strukturalne i regulatorne mehanizme s autokrinim čimbenicima, ali djeluju unutar stanice,
- f) ČIMBENICIMA EKSTRACELULARNOG MATRIKSA koji su nesolubilni sustavi molekula tkivnog matriksa, te koji kontaktom sa stanicama preko integrina i adhezivnih molekula bazalne membrane djeluju na organizaciju citoskeleta kao što su npr. glikozaminoglikani (heparan-sulfat),
- g) STANIČNO-STANIČNE INTERAKCIJAMA među epitelnim ili stromalnim stanicama, a ostvaruju se putem membranskih spojeva ili intramembranskih proteina kao što su stanične adhezijske molekule (E-cadherin)^{2,3,4,5}.

U nastavku ćemo nešto pobliže govoriti o utjecaju endokrinih čimbenika, steroida i raznih čimbenika rasta kao i o stromalno-epitelnoj interakciji posredovanoj adhezijskim molekulama.



Slika 4. Vrste signaliranja u kontroli rasta prostate. Čimbenici rasta (FR)

1.1.3.1. ENDOKRINI ČIMBENICI

Od endokrinih čimbenika svakako je najvažniji utjecaj testosterona tj. njegove aktivne forme dihidroksi-testosterona. Naime, neonatalna i prepubertetska razina steroida igraju ključnu ulogu u dugoročnoj regulaciji rasta prostate koji je nakon puberteta pod utjecajem razine testosterona ². Glavni izvor testosterona su testisi, a njegovo djelovanje na prostatu uključuje ulazak u ciljnu stanicu i pod djelovanjem 5 α -reduktaze preobražaj u DHT, koji kao aktivna forma potiče daljnje procese. U konačnici nastanak proteinskih produkata regulira promjene u citoskeletu, enzimatskoj aktivnosti, staničnoj diobi, produkciji sekreta i ejakulaciji ².

Estrogeni, pak, ne blokiraju androgenima inducirani rast prostatičnih stanica već suprotno, imaju sinergistički učinak. Mehanizam sinergizma androgena i estrogena na rast prostate do sada nije razjašnjen, ali se zna kako estrogeni povećavaju broj androgenih nuklearnih receptora što vjerojatno ima važnu ulogu ².

Na receptore slične steroidnim vežu se i vitamini A i D čime ostvaruju učinak na funkciju prostate. Već se duže vrijeme zna kako vitamin A ima nerazjašnjenu protektivnu ulogu u razvoju karcinoma prostate induciranog karcinogenima u životinjskih modela. Retinoidi se vežu na receptore čija aktivacija ima pleotrofni učinak; od proliferacije, diferencijacije, morfogeneze i programirane stanične smrti, ali isto tako ima utjecaja na interakciju s ekstracelularnim matriksom i imunološkim sustavom ^{2,3}.

Nedavno je otkriveno kako vitamin D, preko svojih receptora, ima važnu ulogu u diferencijaciji normalne prostate u štakora, on podiže sekrecijski kapacitet epitelnih stanica i inducira stromalnu atrofiju. U kastriranih životinja koje su dobivale vitamin D prostata je bila dvostruko veća nego u životinja koje nisu dobivale vitamin D ^{2,4}.

1.1.3.2. ČIMBENICI RASTA

S obzirom kako normalna prostata u odraslih ljudi ne raste brzo nije za očekivati obilje čimbenika rasta u samom tkivu prostate. U velikom broju slučajeva u normalnoj odrasloj prostati, ipak, je prisutna visoka razina čimbenika rasta. Pretpostavlja se kako mnogi od čimbenika rasta koji se nalaze u tkivu prostate zapravo nisu aktivni jer su sekvstrirani vezom za strukture ekstracelularnog matriksa, kao što je heparan, tj. heparan-sulfat. Stoga, učinak čimbenika rasta najvećim dijelom ovisi o mehanizmima vezanja i otpuštanja od komponenti ekstracelularnog matriksa ². Mjerenjem količine čimbenika rasta u prostati ne dobiva se njihova stvarna biološka aktivnost. U svim tipovima rasta pa tako i u rastu prostate, postoje elementi poticanja i usporavanja. Najvažniji supresorski element u prostati je upravo ekstracelularni matriks zbog svoje sposobnosti vezanja i inhibicije brojnih čimbenika rasta ^{2,3}.
⁴. Valja napomenuti kako stromalne i epitelne stanice prostate mogu sintetizirati i reagirati na brojne čimbenike rasta, a mnogi od njih su pod hormonalnom kontrolom, posebice androgena i estrogena. Androgeni i čimbenici rasta mogu stimulirati sintezu i degradaciju komponenti ekstracelularnog matriksa, mijenjajući na taj način stanični odgovor na stimulaciju steroidima i čimbenicima rasta. Stoga je interakcija između steroida, čimbenika rasta, ekstracelularnog matriksa i samih stanica dinamičan proces koji može imati pozitivne ili negativne učinke u regulaciji rasta prostate ^{2,3,4}.

Fibroblastni čimbenici rasta (FGF) potiču rast i diobu epitelih i stromalnih stanica. Do sada je u prostati identificiran FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-5 i FGF-7. Fibroblastni čimbenik rasta 1 ima jači učinak na rast stromalnih, a minimalni na rast epitelnih stanica prostate ^{2,3}. Jaki mitogen za stromalne stanice je FGF-2 kojeg one i produciraju, a na epitelne stanice gotovo i nema učinka. Fibroblastni čimbenik rasta 7, pak, produciraju stromalne stanice na koje on ima slabi mitogeni učinak, dok izrazito potiče umnažanje epitelnih stanica ³. Svi ovi čimbenici vezani su za komponente ekstracelularnog matriksa odakle se postupno oslobađaju

što je dijelom pod utjecajem androgena. Smatra se kako FGF-1 i FGF-7 igraju važnu ulogu u razvoju prostate, dok FGF-2 ima važnu ulogu u rastu prostate odraslih jedinki pod kontrolom androgena ⁴.

Epidermalni čimbenici rasta (EGF) imaju dominantnu ulogu u rastu kako normalne prostate odraslih tako i u nastanku i održavanju benigne prostatične hiperplazije (BPH). Ovi su čimbenici lokalizirani u epitelnim stanicama, a njihovo lučenje je potaknuto androgenima ^{2,7}. Pretpostavlja se kako receptor epidermalnog čimbenika rasta s c-erb-B2/neu onkoproteinom tvori aktivni receptorski kompleks koji ima važnu ulogu u progresiji karcinoma prostate ^{3,4,5}.

Transformirajući čimbenik rasta- α (TGF- α) je strukturalno sličan epidermalnom čimbeniku rasta te se smatra kako ima sličan učinak djelujući preko receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR). Također, ima važnu ulogu u androgen-neovisnom poticanju rasta stanica karcinoma prostate što je primijećeno u kulturi stanica ^{2,5}.

Transformirajući čimbenici rasta- β (TGF- β) članovi su TGF- β superfamilije i u prostati djeluju tri različita proteina: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Smatra se kako transformirajući čimbenici rasta- β djeluju inhibitory na rast epitelnih stanica normalne prostate potičući rast stromalnih stanica ². Ovakav obrazac djelovanja ne vrijedi za epitelne stanice u benignoj prostatičnoj hiperplaziji, niti u karcinomu prostate, jer je promijenjen stanični odgovor te sada dolazi do pojačanog rasta pod utjecajem TGF- β . Transformirajući čimbenik rasta- β 1 blokira rast i umnožavanje epitelnih stanica prostate zadržavajući ih u S fazi staničnog ciklusa ^{3,4}. U karcinomu prostate eksprimirani su TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 i mogu suprimirati imunološki sustav, poticati angiogenezu i stvaranje ekstracelularnog matriksa te povećati motilitet stanica. Na taj način pospješuju progresiju samog karcinoma ^{3,4,5}.

Koštani morfogenetski proteini (BMP) su kao članovi TGF- β superfamilije također važni u kontroli rasta prostate i u patogenezi tumorskih bolesti te ćemo o njima opširnije govoriti kasnije.

Čimbenici rasta slični inzulinu I i II (IGF, somatomedin) povišene su koncentracije u benignoj prostatičnoj hiperplaziji, IGF-I u epitelnim stanicama, a IGF-II u stromalnim stanicama².

Trombocitni čimbenik rasta (PDGF) pronađen je u modelima tumorskih bolesti prostate i staničnim kulturama, pretpostavlja se kako ima jaki mitogeni učinak na mezenhimalne i vezivno-tkivne stanice, također povećava osjetljivost stanica na druge čimbenike rasta^{2,3,4}.

Endotelini (ED-1,-2,-3) djeluju kao vazokonstriktori i imaju važnu ulogu u održavanju glatkog mišićnog tonusa prostate kao i u njezinom rastu. U sjemenoj tekućini koncentracija endotelina je oko 5 puta viša nego u krvnoj plazmi. Epitelne stanice prostate proizvode ED-1 čija je koncentracija značajno povišena u karcinomu prostate s koštanim metastazama, a djeluje kao mitogen na stanice karcinoma *in vitro*, i povećava aktivnost alkalne fosfataze u novostvorenoj kosti^{2,3,4,8}.

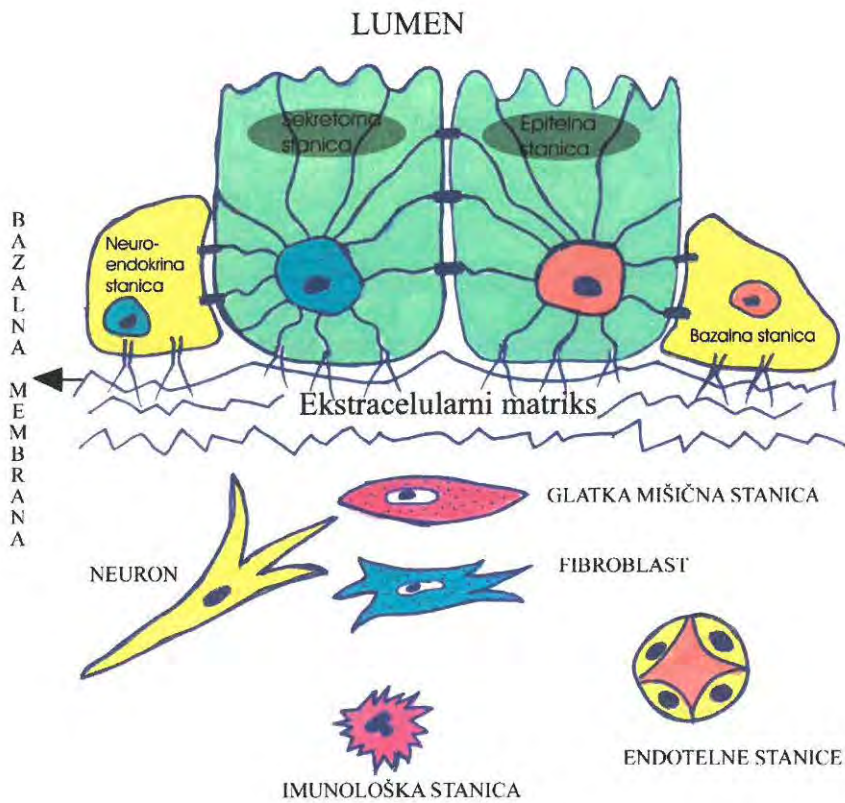
Postoje još brojni hipofizni, embrionalni i neuroendokrini čimbenici koji utječu na rast prostate, ali njihova uloga je još nedovoljno razjašnjena⁸.

1.1.3.3. STROMALNO-EPITELNE INTERAKCIJE

Postoji dinamičan i recipročni odnos funkcije stromalnih i epitelnih stanica. Međusobne interakcije najvećim dijelom ovise o prostornoj organizaciji elemenata ekstracelularnog matriksa koji tvore vezu s bazalnom membranom^{2, 8, 9}. Ta veza predstavlja filter i dvosmjerni parakrini komunikacijski put između dva stanična odjeljka. Hormoni, plinovi, čimbenici rasta i hranjive tvari dolaze do prostate putem krvi i prolaze najprije kroz stromu, tj. ekstracelularni matriks i bazalnu membranu kako bi došli do epitelnih stanica (slika 5). Rano tijekom razvoja funkcija epitelnih i stromalnih elemenata mijenja se ovisno o međusobnim interakcijama, stoga integrirana biologija ovih dvaju sustava kao i njihova dinamika tijekom starenja igraju ključnu ulogu u funkciji prostate kao žlijezde^{2, 3, 4, 8}. Upravo krah ovih tkivnih interakcija predstavlja početak abnormalnog rasta prostate, koji počinje već vrlo rano tijekom života, otprilike neposredno nakon vremena maksimalne virilizacije, tj. oko 25-te godine^{2, 3, 4, 5, 8, 9}. Prve se primjećuju promjene u svojstvima i organizaciji stromalno-epitelnih elemenata, a započinju kaskadom patoloških procesa koji se manifestiraju displazijom, atipijom, atrofijom i hiperplazijom kako epitelnih, tako i stromalnih komponenti^{2, 3, 4, 5, 8, 9}. Starenjem, te najranije promjene postupno prelaze u benignu prostatičnu hiperplaziju, zatim u intraepitelijalnu neoplaziju (PIN) i zaključno u različite tipove prostatičnog adenokarcinoma. Za sad još nije poznato koliko su tijesno povezane narečene patološke promjene^{2, 3, 4, 5, 8, 9}.

Za ljudsku i pseću prostatu karakteristično je vidjeti već u mlađih jedinki neki oblik histološke nestabilnosti, tj. promjene⁵. Patološke su promjene multifokalne i heterogene i često zahvaćaju ista područja žlijezde, tako da nije čudno naći, primjerice, benignu hiperplaziju uz područja atrofije⁵. Nepoznato je zašto se patološke promjene u rastu prostate javljaju isključivo u čovjeka i psa, dok su u stotine drugih vrsta gotovo nepoznate. Činjenica je kako karcinom zahvaća prilično često prostatične epitelne stanice, dok epitelne stanice sličnog

porijekla i DNA-strukture kao što su one bulbouretralnih žlijezdi gotovo nikad nisu zahvaćene karcinomom ^{2, 3, 4, 5, 8, 9}. Možda objašnjenje djelomično leži u stromalno-epitelnoj interakciji. Naime, poznato je kako ekstracelularni matriks ima važnu induktivnu ulogu tijekom razvoja i diferencijacije brojnih staničnih tipova, te u kontroli rada samih stanica ^{2, 3, 4, 5, 8, 9}.



Slika 5. Odnos epitela, ekstracelularnog matriksa i strome

Tako, primjerice, tijekom nastanka benigne prostatične hiperplazije dolazi do promjena u stromi i ekstracelularnom matriksu tako da on po svojoj funkciji i sastavu više slični onom u embrionalnoj fazi razvoja ⁷. Takvi zaključci potkrijepljeni su eksperimentom u kojem je transplantiran fetalni urogenitalni sinus u adultnu prostatu, a kao rezultat dobiven je hiperplastični rast prostatičnog tkiva ⁷.

U odvijanju stromalno-epitelnih interakcijskih procesa važnu ulogu imaju **stanične adhezijske molekule (CAM)**, koje se dijele na četiri osnovne grupe:

a) **integrini**- povezuju stanicu s bazalnom membranom i ekstracelularnim matriksom heterodimerskim interakcijama,

b) **kadherini**- povezuju stanice jednu s drugom homotipičnim polimerima,

c) **selektini**- povezuju stanice prvenstveno u vaskularnom sustavu te

d) **imunoglobulinska superfamilija** adhezijskih molekula ^{2,3,4,5,7,9}.

Do sada su u prostati najbolje proučeni E-kadherini koji povezuju prostatične epitelne stanice međusobno i CD-44 koji povezuje stanice s hijaluronskom kiselinom i intracelularnim adhezijskim molekulama (ICAM), te CD-71 koji se veže za transferin i druge integrinske molekule. Preko integrina ostvaruje se važna komunikacija između strome i epitelne, nuklearne DNA ^{2,3,4,5,7,9}.

Stanične adhezijske molekule imaju važnu ulogu u tumorskoj progresiji i metastaziranju. Laminin je jedan od važnih proteina ekstracelularnog matriksa koji mijenja svoju izoformu tijekom neoplastičnog procesa, što je posebno uočeno u staničnim linijama karcinoma prostate ^{2,3,4,5,7,9}. Neki integrini kao što je C-CAM djeluju kao tumor-supresori u karcinomu prostate. E-cadherin također djeluje kao inhibitor stanične invazije i metastaziranja u eksperimentalnim tumorskim modelima, te je njegova ekspresija izrazito reducirana ili odsutna u karcinomu prostate visokog gradusa ^{2,3,4,5,7,9}.

Eksperimenti s epitelnim stanicama pseće prostate pokazali su kako one rastu ubrzano u kulturi stanica, kada su izdvojene iz uobičajenog ekstracelularnog matriksa. Kad ih se izloži prostatičnom biomatriksu one reduciraju rast i zadržavaju sekretornu funkciju i morfologiju slično kao u *in vivo* uvjetima. Dakle, različite komponente strome i ekstracelularnog matriksa mogu imati inhibitornu ulogu rasta u normalnoj prostati, a mogu i poticati tumorski rast^{2,3,4,5,7,9}.

1.1.4. SEKRETORNI PROTEINI PROSTATE

Prosječni volumen ljudskog ejakulata iznosi oko 3 ml, a sastoji se od dvije osnovne komponente: **spermija i sjemene plazme**. Za najveći dio sastava sjemene plazme odgovorna je prostata svojom produkcijom. Osim proteina, sjemena plazma sadrži limunsku kiselinu, fruktozu, poliamine, fosforilkoline, prostaglandine, kolesterol, lipide i cinkove ione ².

Prostatični specifični antigen (PSA) je glikoprotein koji djeluje kao serinska proteaza i arginin-esteraza, a pronađen je u epitelnim stanicama prostate. Koncentracija PSA u seminalnoj plazmi kreće se od 0.5-5 mg/ml, dok se u krvnom serumu koncentracija normalno kreće od 1-4 ng/ml. U krvnoj plazmi postoje dvije forme PSA, a to su: **slobodni**, nevezani i **vezani** ². Slobodni PSA je prisutan u manjoj koncentraciji od vezanog te je enzimatski inaktivan i imunoreaktivan. Prostatični specifični antigen može biti vezan za α_1 -antikimotripsin (PSA-ACT) tada je enzimatski inaktivan i imunoreaktivan ili je vezan za α_2 -makroglobulin (PSA-A2M) koji nije imunoreaktivan. Slobodni i vezani (PSA-ACT) prostatični specifični antigen čine ukupni izmjereni PSA ^{2, 3, 4}. Slobodni se mjeri posebno, a njihov omjer ima važnu ulogu u dijagnostici i praćenju karcinoma prostate o čemu će biti govora kasnije.

U sjemennoj plazmi nalazimo još ljudski kalikrein-2, kalikrein-L1, prostatični specifični protein-94 (PSP-94), Zn₂-glikoproteine, prostatičnu kiselu fosfatazu, leucin-aminopeptidazu, laktat-dehidrogenazu, te razne imunoglobuline, C3 komponentu komplementa i transferin ².

1.2. BOLESTI PROSTATE

Sve bolesti prostate možemo podijeliti u dvije skupine. To su tumorske i netumorske bolesti^{5, 7, 10, 11}.

S obzirom da ćemo se detaljno pozabaviti patogeneзом karcinoma prostate o netumorskim bolestima nećemo govoriti.

U tumorske bolesti prostate spadaju: a) benigna prostatična hiperplazija (adenom prostate),

b) karcinom prostate i

c) ostale tumorske bolesti (vrlo rijetke npr. sarkomi).

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA TUMORSKIH BOLESTI PROSTATE

Karcinom prostate je vodeći javno-zdravstveni problem muške populacije u razvijenim zemljama. Rak prostate je drugi uzrok smrtnosti među svim smrtima uzrokovanih rakom. Karcinom prostate postao je najčešći karcinom među muškarcima u SAD-u nadmašujući karcinom bronha^{2, 3, 4, 5, 7, 10, 11}. Danas je karcinom prostate jedan od najvažnijih zdravstvenih problema muške populacije u Europi . Svake godine dijagnosticira se 2.6 milijuna novih bolesnika. Na karcinom prostate otpada oko 11% bolesnika od malignih bolesti u muškarca i 9% smrtnih ishoda. Postoje velike regionalne razlike. U Švedskoj na karcinom prostate otpada 31.5% svih malignih bolesti u muškarca. U trenutku postavljanja dijagnoze 55% tumora je klinički lokalizirano, mada su najnovije studije pokazale kako 30-45% pacijenata s klinički lokaliziranom bolešću imaju ekstrakapsularnu ekstenziju tumora. Incidencija mu raste u sve mlađim dobnim skupinama^{2, 3, 4, 5, 7, 10, 11}. Unatoč naprijetku na području molekularne biologije patogeneza karcinoma prostate ostaje do danas nerazjašnjena. Biološko ponašanje karcinoma prostate je nepredvidivo^{2, 3, 4}. Neki pacijenti vrlo brzo podliježu bolesti i od nje umiru, dok drugi unatoč tome što im je dijagnosticiran karcinom prostate umiru u poodmakloj životnoj dobi od uzroka nevezanih za sam karcinom. Klinički je,

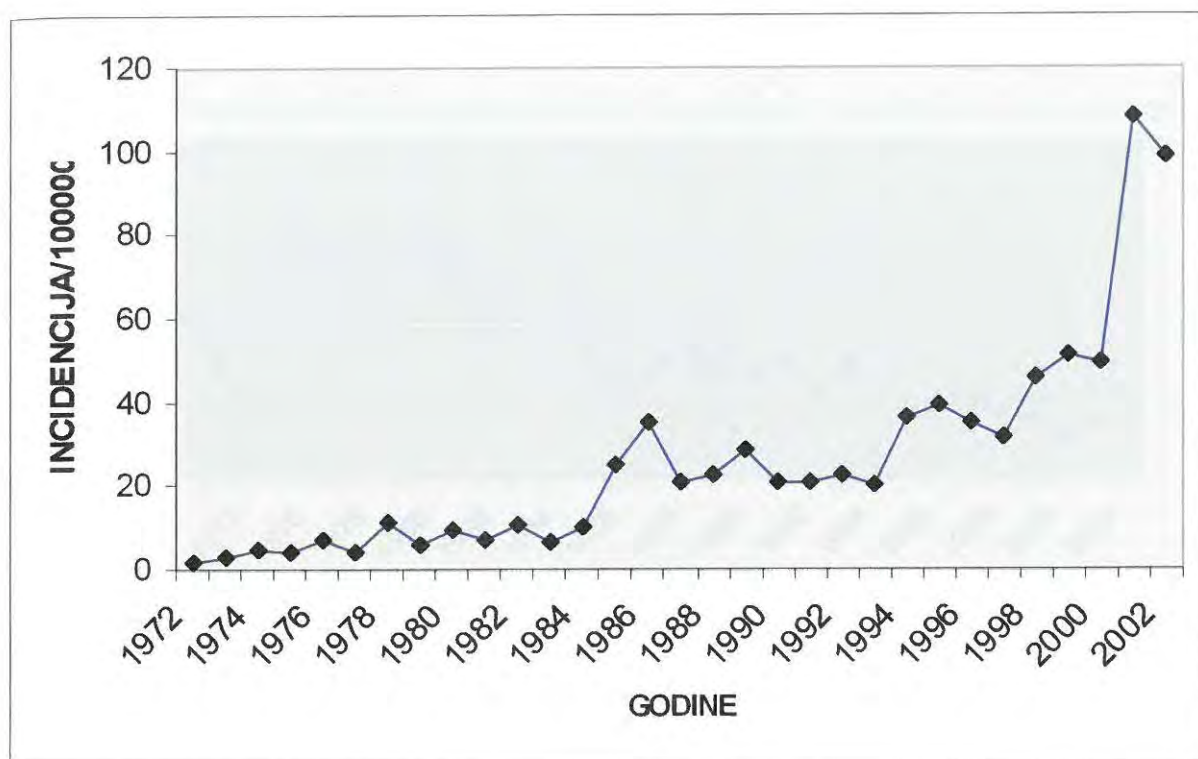
stoga, nemoguće predvidjeti tijek bolesti kod svakog pacijenta ponaosob ^{2, 3, 4, 5, 7, 10, 11}. Epidemiološki pokazatelji karcinoma prostate razlikuju se ovisno o rasi, zemljopisnoj lokaciji, ekonomskom statusu, zdravstvenoj zaštiti, i informiranosti pučanstva ^{3,4}.

Daleki istok (Indija, Japan i Kina) ima najmanju incidenciju karcinoma prostate, a najvišu imaju zemlje Zapadne Europe, Australije i Sjeverne Amerike. U Kini je incidencija 3/100000 muškaraca godišnje, u SAD-u 187/100000, a na Jamajci gdje prevladava crnačko stanovništvo 378/100000. Čimbenici rizika su nepoznati ^{3,4}.

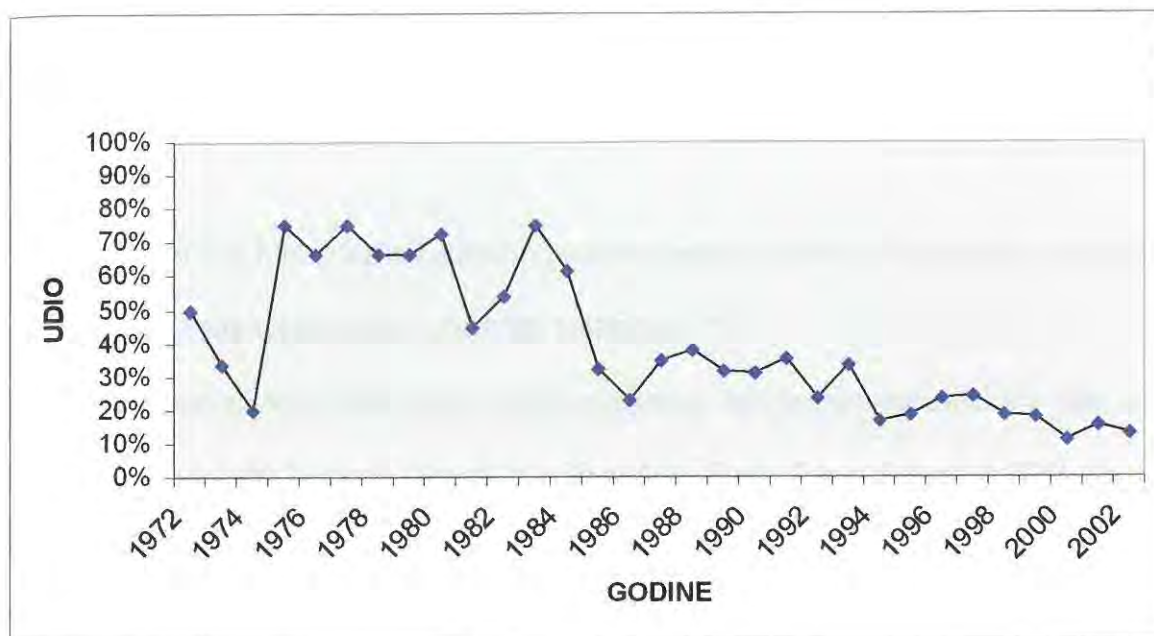
Rast udjela starije populacije u zapadnim zemljama kao i dostupnost boljih dijagnostičkih metoda (test za specifični prostatični antigen - PSA i transrektalni ultrazvuk) dovodi do porasta broja bolesnika s karcinomom prostate ^{2, 3, 4, 5, 7, 10, 11}. Visoki stupanj smrtnosti u karcinomu prostate, pogotovo u mlađoj životnoj dobi povezan je s agresivnošću tumora i nastankom koštanih metastaza ^{3,4}.

Kako smo mi uzorke sakupili od pacijenata iz Primorsko-goranske županije valja pobliže govoriti o epidemiologiji karcinoma prostate na ovom području. Podaci su dobiveni proučavanjem povijesti bolesti 1006 pacijenata u kojih je karcinom prostate dijagnosticiran između 1972. i 2002. godine te su obrađivani i liječeni u Kliničkom bolničkom centru u Rijeci. Incidencija je izračunata korištenjem podataka iz *Popisa stanovništva* provedenog 1981., 1991., i 2001. godine te je prilagođena europskoj standardnoj populaciji. Valja napomenutu kako je transrektalna sonografija (TRUS) kao dijagnostička metoda uvedena na ovom području 1985., a PSA 1994. godine ^{12, 13, 14, 15}. Razvidno je kako incidencija raste od 1.69 na 100000 muškaraca godišnje do 98.68. Uočljiv je značajan porast incidencije 1985., 1994. i 2001., što se može objasniti s boljim i ranijim otkrivanjem zahvaljujući novim dijagnostičkim metodama, ali i boljim zdravstvenim prosvjećivanjem (slika 6) ^{12, neobjavljeni}

podaci



Slika 6. Dobno standardizirana incidencija (europska standardna populacija) karcinoma prostate u razdoblju između 1972. i 2002. godine u Primorsko-goranskoj županiji



Slika 7. Udio (%) bolesnika s koštanim metastazama pri prvom pregledu, Primorsko-goranska županija 1972.-2002.

Možemo uočiti kako se vremenom smanjio udio pacijenata koji su kod postavljanja dijagnoze već imali diseminiranu bolest (slika 7). Vidljivo je iz prikupljenih podataka kako se vremenom bolest dijagnosticirala u sve mlađih muškaraca. Najmlađi pacijent u kojeg je dijagnosticiran karcinom prostate bio je 42 godine star, dok je najstariji imao 90 godina ¹².
neobjavljeni podaci

Čimbenici rizika karcinoma prostate nisu sa sigurnošću potvrđeni. Mogući povoljni i nepovoljni utjecaj imaju brojni čimbenici okoliša, nasljeđa, imunološkog sustava itd. ^{3, 4}. Viši muškarci imaju, tako, povišeni rizik od nastanka karcinoma prostate, što se objašnjava višim razinama testosterona u pubertetu i adolescenciji. Pretilost zbog povišene razine estrogena i snižene koncentracije testosterona nema učinka na pojavnost karcinoma prostate, dok fizička aktivnost ima minimalni protektivni učinak ^{3, 4}. Smatra se kako vazektomija, pušenje, unošenje zasićenih masti životinjskog porijekla i unošenje kalcija povećavaju rizik, a unošenje vitamina A i drugih antioksidansa ga snižuje ^{3, 4}. Iz incidencije karcinoma prostate

široj svijetu razvidno je kako crnci imaju veći rizik obolijevanja od bijelaca, a najniži imaju pripadnici žute rase. Rizik je povišen, ukoliko je u obitelji bilo oboljelih od karcinoma prostate^{3,4,5}.

Benigna prostatična hiperplazija (adenom prostate) puno je češća od karcinoma i predstavlja najčešću dobroćudnu neoplazmu u odraslih muškaraca^{7,10}.

Incidencija i prevalencija BPH rastu s dobi muškarca, dok je izuzetno rijetka u dobi do 40 godina, gotovo je 100 %-tna u dobi od oko 80 godina. Postavljanje dijagnoze BPH, naravno, ovisi o simptomatologiji koja bolesnika dovodi urologu^{7,10}.

1.2.2. KLINIČKE SMJERNICE U DIJAGNOSTICI I LIJEČENJU TUMORSKIH BOLESTI PROSTATE

1.2.2.1. BENIGNA PROSTATIČNA HIPERPLAZIJA (ADENOM PROSTATE)

Benigna prostatična hiperplazija je najčešća dobroćudna neoplazma u odraslih muškaraca, ne ugrožava život, ali izaziva skupinu simptoma donjeg urinarnog trakta. Incidencija se povećava s dobi, nepoznatih je čimbenika rizika, a ovisno o jačini izraženih simptoma zahtijeva odgovarajuće konzervativno (medikamentozno), ili kirurško liječenje (transuretralna elektroresekcija prostate - TUERP, *adenomectomy transvesicalis*),^{7, 10}.

U evaluaciji pacijenata s benignom hiperplazijom prostate osnovna metoda je digitorektalni pregled nadopunjen sa suprapubičnim ultrazvučnim pregledom prostate (po potrebi transrektalnom sonografijom) i određivanjem volumena. Orijentacijski se analizira vrijednost uree i kreatinina, PSA u serumu, sediment urina i urinokultura. Kompjuterizirana tomografija (CT) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR) se ne koriste u evaluaciji. U prijeoperacijskoj obradi potrebno je učiniti i urodinamsko ispitivanje (*uroflow*) s određivanjem rezidualnog urina, te uretrocistoskopiju^{7, 10}.

U liječenju BPH praćenje je indicirano u bolesnika s minimalnom simptomatologijom. Medikamentozno liječenje inhibitorima 5 α -reduktaze indicirano je u bolesnika s umjereno izraženim simptomima i prostatom volumena većom od 40 ml, također se mogu primjenjivati i α -blokatori kod pacijenata koji nemaju apsolutnu indikaciju za operaciju^{7, 10}.

Bolesnici s jako izraženim simptomima i prostatom volumena >60 ml liječe se transvezikalnom adenomektomijom, a oni s prostatom volumena <60 ml transuretralnom elektroresekcijom (TUERP)^{7, 10}.

Valja napomenuti kako postoji određeni postotak novootkrivenih karcinoma prostate u materijalu poslanom na patohistološku analizu nakon operacijskog liječenja BPH ^{7, 10}.

1.2.2.2.KARCINOM PROSTATE

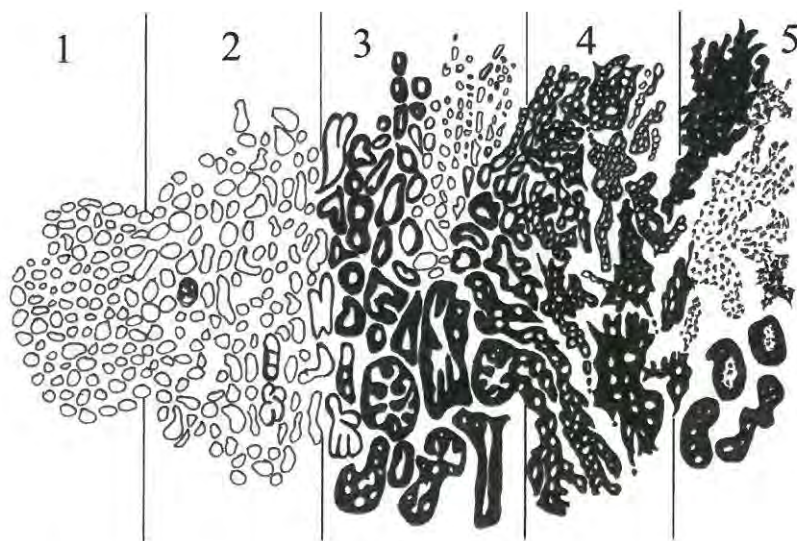
Jedan od najvažnijih zdravstvenih problema muške populacije u Europi i drugim razvijenim dijelovima svijeta je karcinom prostate. Svake godine dijagnosticira se 2.6 milijuna novooboljelih. Na karcinom prostate otpada oko 11% oboljelih od svih malignih bolesti u muškarca, a 9% umrlih ^{3, 4, 5, 11}. Postoje velike regionalne razlike. U trenutku postavljanja dijagnoze 55% tumora je klinički lokalizirano, mada su najnovije studije pokazale kako 30-45% pacijenata s klinički lokaliziranom bolešću imaju ekstrakapsularnu ekstenziju tumora ^{3, 4, 5, 11}.

Klasifikacija karcinoma prostate ima dva međusobno povezana aspekta:

- a) Patohistološki *grading* (*Gleason score*) je sustav bodovanja koji dodjeljuje bodove od 2-10, gdje je 2 najmanje agresivan (niski stupanj malignosti), a 10 najagresivniji (visoki stupanj malignosti). Rezultirajući *Gleason score* je suma dvaju najčešćih patohistoloških obrazaca u uzorku tkiva bodovanih od 1-5, a kako bi bio uključen u zbroj mora zauzimati najmanje 5% uzorka. Određivanje *Gleason score* moguće je iz uzoraka iglenih biopsija prostate, tkiva dobivenog radikalnom prostatektomijom, kao slučajni nalaz nakon transuretralne elektroresekcije prostate ili transvezikalne adenomektomije, dok se citološki preparati ne mogu koristiti za tu svrhu ^{11, 16}.
- b) TNM (tumor-čvor-metastaza) klasifikacija koja odgovara kliničkom *staging-u* karcinoma prostate (tablica 1), o čemu ćemo govoriti detaljnije kasnije ^{11, 16}.

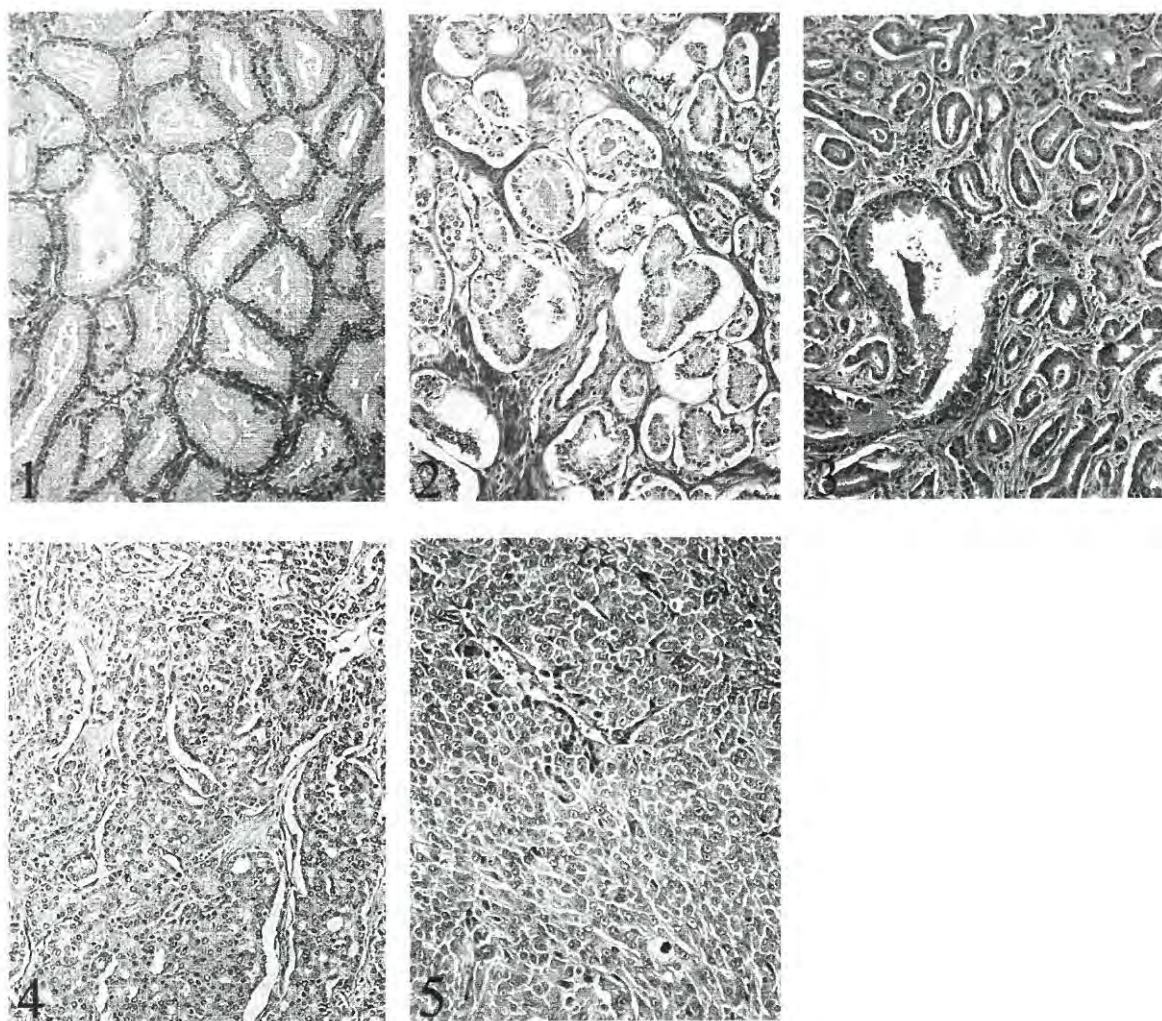
Postavljanje dijagnoze karcinoma prostate uključuje digitorektalni pregled (DRE), određivanje serumske koncentracije PSA, transrektalni ultrazvuk (TRUS) te patohistološku potvrdu bilo u operacijski dobivenim uzorcima tkiva, ili uzorcima dobivenim multiplom sistemskom biopsijom prostate pod kontrolom ultrazvuka, koja otkriva veći broj slučajeva karcinoma od biopsije pod kontrolom prsta ili ciljane biopsije ultrazvučno suspektnih promjena ^{3, 4, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 16}.

Patohistološki stupanj (*Gleason score*) zasniva se na morfološkom obrascu samih žljezdanih acinusa i to kod relativno malog povećanja, dok citološki parametri ne utječu na sam *score*. Boduje se od 2 do 10. Sastoji se od zbroja dviju vrijednosti, a izražava se $x+y$, gdje je x dominirajući *Gleason score* (od 1 do 5), a y drugi po redu najčešći bodovni obrazac (od 1 do 5). Dakle rezultirajući *Gleason score* je suma dviju najčešćih patohistoloških obrazaca u uzorku tkiva bodovanih od 1-5, a kako bi bio uključen u zbroj, obrazac mora zauzimati najmanje 5% uzorka (slika 8a i b)^{3, 4, 5, 11, 16}.



Slika 8a. Patohistološki gradusi adenokarcinoma prostate prema Gleasonu, shematski prikaz

U većini bolesnika karcinom prostate je lokaliziran u perifernoj zoni prostate te se može palpirati **digitorektalno** kod volumena od 0.2 ml na više. Suspektno je svako otvrdnuće ili čvorić ^{3, 4, 5, 11, 12}.



Slika 8b. Patohistološki gradusi adenokarcinoma prostate. Mikroskopski preparati

Određivanje **koncentracije PSA** omogućilo je rano otkrivanje karcinoma prostate. PSA, međutim, nije specifičan i povišen isključivo u karcinomu prostate, ali je organ specifičan te može biti povišen, primjerice, kod upalnih bolesti prostate, u benignoj prostatičnoj hiperplaziji (prostata velikog volumena), nakon digitorektalnog pregleda, postavljanja urinarnog katetera, cistoskopskih pregleda, spolnog odnosa itd.^{3, 4, 5, 11, 12}. Gornja granica serumske koncentracije PSA iznosi 4 ng/ml^{3, 4, 5, 11, 12}. Kod vrijednosti PSA između 4 i 10 ng/ml karcinom će biti otkriven u 25-35% bolesnika, a kod vrijednosti viših od 10 ng/ml u 50-80%. U novije vrijeme otkriveno je kako 13.2% bolesnika s karcinomom prostate ima PSA vrijednosti između 3 i 4 ng/ml^{3, 4, 5, 11}, stoga se osim određivanja koncentracije PSA nastoji odrediti i omjer između slobodnog i vezanog PSA (udio slobodnog PSA veći je u nekarcinomskih bolesti, dok je u karcinoma veći udio vezanog PSA), gustoća PSA, dobno ovisne referentne vrijednosti itd.^{3, 4, 5}.

Prikaz karcinoma prostate **transrektalnom sonografijom (TRUS)** je različit. Klasičan prikaz podrazumijeva hipoehogena nepravilna područja u perifernoj zoni prostate (slika 9), ali često su područja karcinoma izoehogena s okolnim tkivom (u 37.6% bolesnika), a rjeđe i hiperehogena^{3, 4, 5, 13, 14, 15}. U uznapredovalom karcinomu prostate koji probija kapsulu i infiltrira okolne strukture, ultrazvučno ćemo vidjeti narušavanje i brisanje kapsule te infiltraciju u seminalne vezikule^{3, 4, 5, 13, 14, 15}.



Slika 9. Sagitalni prikaz prostate (TRUS). Fokalna hipoehogena lezija periferne zone desnog lobusa (strelica)

Dvije su evidentne uloge TRUS-a u dijagnostici karcinoma prostate:

- 1) pronalaženje suspektnih malignih lezija,
- 2) poboljšanje preciznosti biopsije prostate ^{3, 4, 5, 13, 14, 15}.

Naime, TRUS-om se otkriva oko 50% bolesnika s karcinomom prostate koji imaju uredan digitorektalni nalaz. Ultrazvučni prikaz karcinoma prostate je vrlo varijabilan tako da samo mali broj bolesnika ima uredan PSA i nalaz digitorektalnog pregleda, a suspektan ili evidentan nalaz TRUS-a ^{3, 4, 5, 11, 13, 14, 15}.

Ultrazvučno vođena **multipla sistemska biopsija** prostate s iglom od 18G postala je dijagnostički standard u dobivanju uzorka tkiva prostate za patohistološku analizu (slika 10)

^{3, 4, 5, 13, 14, 15}.



a



b

Slika 10. Pribor za ultrazvučno vođenu biopsiju prostate (a). Transrektalna ultrazvučna sonda (1), vodilica (2), lateks zaštita za sondu (3), gel (4), biopsijska igla - true cut 18G (5), pištolj za biopsiju (6). Ultrazvučni aparat

(b)

Ovakav pristup omogućuje uzimanje 6 i više uzoraka tkiva bez anestezije uz odgovarajuću antibiotsku zaštitu. Pojedinačne biopsije lezija pod kontrolom prsta mogu se koristiti samo kada postoji palpabilni čvorić, a PSA je veći od 10 ng/ml. Prema prihvaćenim smjernicama radi se sekstant biopsija periferne zone prostate u različitim nivoima i to 3 uzorka iz lijevog i 3 iz desnog lobusa^{3, 4, 5, 11}. Novije studije su pokazale kako biopsije s 13 ili 18 uzoraka (odnosi se prvenstveno na prostate volumena većeg od 40 ml) otkrivaju dodatnih 35% bolesnika koji ostaju nedetektirani kod klasične sekstant biopsije, no u najvećem broju slučajeva razlika nije klinički značajna^{3, 4, 5, 11}.

Ako je prva biopsija negativna indicirane su rebiopsije u određenim vremenskim intervalima^{3, 4, 5, 11}. Kod druge biopsije u 10-35% bolesnika otkrijemo karcinom unatoč tome što je prva biopsija bila negativna. U pacijenata gdje patohistološka analiza uzoraka prostate dobivenih biopsijom govori u prilog prostatičnoj intraepitelnoj neoplaziji visokog stupnja (HGPIN) u 50-100% nalazi se i neotkriveni karcinom^{3, 4, 5, 11}. U takvih bolesnika indicirana je odmah rebiopsija^{3, 4, 5, 11}.

Kako bismo odredili **klinički stadij** (tablica 1) maligne bolesti prostate (*staging*), o čemu ovisi daljnje liječenje, moramo provesti dodatne dijagnostičke postupke kao što su: kompjuterizirana tomografija zdjelice (CT), ili nuklearnu magnetsku rezonancu (NMR), scintigrafiju kostiju s izotopom tehnecija Th⁹⁹ te određivanje koncentracije serumske koštane alkalne fosfataze uz rutinsku abdominalnu pansonografiju i preglednu snimku grudnih organa^{3, 4, 5, 11}.

T-staging je prvi nivo u procjeni lokalnog tumorskog stadija, a odlučujuće za daljnje liječenje je razlikovanje između lokaliziranog-intrakapsularnog (T1-T2) i ekstrakapsularnog (T3-T4) tumora. Serumska koncentracija PSA je viša u uznapredovalim stadijima bolesti, a u kombinaciji s patohistološkim gradusom i kliničkim stadijem ima značajan prognostički upliv. TRUS nije uvijek dovoljan za procjenu ekstrakapsularne ekstenzije bolesti, naime, 60%

pT3 tumora se ne otkriva TRUS-om prijeoperacijski. Razlikovanje između T2 i T3 stadija ne smije se temeljiti isključivo na TRUS-u ¹¹.

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma prostate

STADIJ		
T	Tx T0	primarni tumor se ne može utvrditi nema dokaza o postojanju primarnog tumora
T1	T1a T1b T1c	klinički nemanifestan tumor, nepalpabilan i koji se ne prikazuje TRUS-om slučajni patohistološki nalaz u manje od 5% pregledanog tkiva slučajni patohistološki nalaz u više od 5% pregledanog tkiva tumor detektiran sistemskom biopsijom prostate (povišeni PSA)
T2	T2a T2b T2c	tumor ograničen na prostatu ¹ tumor zahvaća pola ili manje jednog lobusa prostate tumor zahvaća pola ili više samo jednog lobusa prostate tumor zahvaća oba lobusa prostate
T3	T3a T3b	tumor probija kapsulu prostate ² unilateralna ili bilateralna ekstrakapsularna ekstenzija tumora tumor infiltrira seminalne vezikule
T4		tumor je fiksiran i infiltrira i druge priležeće anatomske strukture: vrat mokraćnog mjehura, vanjski analni sfinkter, musculus levator ani i/ili zdjeljni zid
N	Nx N0 N1	regionalni limfni čvorovi ³ zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova se ne može procijeniti bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima metastaze u regionalnim limfnim čvorovima
M	Mx M0 M1 M1a M1b M1c	udaljene metastaze ⁴ postojanje udaljenih metastaza se ne može procijeniti bez udaljenih metastaza postoje udaljene metastaze neregionalni limfni čvorovi koštane metastaze udaljene metastaze u drugim organima

¹ Nepalpabilan, nevidljiv (TRUS, CT, MR) tumor pronađen u oba lobusa sistemskom biopsijom prostate klasificira se kao T1c,

² Invazija apeksa prostate, ali bez ekstrakapsularnog prodora klasificira se kao T2, a ne T3,

³ Regionalni limfni čvorovi su čvorovi zdjelice u užem smislu i obično su lokalizirani ispod bifurkacije zajedničkih ilijačnih arterija. Lateralniji limfni čvorovi ne utječu na TNM klasifikaciju,

⁴ Kada je prisutan više od jednog lokusa metastaze, tumor se klasificira kao M1c

Biopsija seminalnih vezikula pridonosi preciznosti određivanja stadija bolesti i indicirana je kod T2a stadija i PSA većeg od 10 ng/ml. Valja napomenuti kako 70% pacijenata s lokalizirnim-intrakapsularnim tumorom ima *Gleason score* manji od 6^{3,4,5,11}.

Dinamična, kontrastna, endorektalna magnetska rezonanca prostate puno je osjetljivija od TRUS-a za detekciju peripostatične invazije, mada ni CT, a niti NMR nisu 100% pouzdani^{3,4,5,11}.

N-staging treba provesti samo kada nalaz neposredno utječe na odluku o daljnjem liječenju.

Visoke vrijednosti PSA, T2b-T3 stadiji, slaba diferencijacija tumora (visoki *Gleason score*) i perineuralna invazija povezani su s visokom učestalošću metastaza u limfne čvorove^{3,4,5,11}.

Pacijenti s PSA koncentracijom manjom od 20 ng/ml, stadijem T2a ili nižim, i patohistološkim gradusom 6 ili manjim imaju manje od 10% vjerojatnosti za postojanje metastaza u limfnim čvorovima i ne trebaju biti izloženi postupcima za utvrđivanje N-stadija^{3,4,5,11}. Udio *Gleason 4* patohistološkog obrasca u uzorcima biopsije prostate, značajan je u procjeni zahvaćenosti limfnih čvorova malignom bolesti prostate. Ako u jednom od uzoraka dominira *Gleason 4*, ili je on prisutan kao nedominantan u više od 3 uzorka biopsije prostate rizik zahvaćenosti limfnih čvorova je između 20-45%^{3,4,5,11}. Zlatni standard za *N-staging* je operacijska limfadenektomija regionalnih limfnih čvorova bilo otvorenom ili laparoskopskom metodom^{3,4,5,11}.

M-staging obuhvaća procjenu postojanja udaljenih metastaza karcinoma prostate. Aksijalni skelet zahvaćen je u oko 85% pacijenata koji umiru od karcinoma prostate^{3,4,5,11}. Povišenu razinu koštane alkalne fosfataze nalazimo u 70% pacijenata s koštanim metastazama, ali scintigrafija kosti s tehnejem jest najosjetljivija pretraga u otkrivanju koštanih metastaza^{3,4,5,11}. Osim u kosti karcinom prostate može metastazirati u bilo koji organ, najčešće u udaljene limfne čvorove, pluća, jetru, mozak i kožu^{3,4,5,11}. Poznato je kako u vrlo rijetkim slučajevima bolesnici u kojih je PSA viši od 100 ng/ml, nemaju udaljenih metastaza^{3,4,5,11}.

Smatra se kako nema potrebe dijagnostički tražiti udaljene metastaze kad je PSA manji od 20 ng/ml u asimptomatskih pacijenata s dobro ili umjereno diferenciranim karcinomom prostate^{3, 4, 5, 11}.

Liječenje karcinoma prostate ovisno o TNM stadiju, koncentraciji PSA te patohistološkom gradusu obuhvaća nekoliko modaliteta, od hormonalne terapije, radioterapije do radikalnog kirurškog liječenja^{3, 4, 5, 11}. Poblize ćemo govoriti o indikacijama i radikalnoj prostatektomiji kao načinu liječenja jer smo dio uzoraka dobili na taj način.

Radikalna prostatektomija podrazumijeva potpuno odstranjenje prostate između uretre i mjehura uz vađenje seminalnih vezikula bilo retropubičnim, transperinealnim ili laparoskopskim pristupom, s ili bez regionalne limfadenektomije^{3, 4, 5, 11}.

Za ovu operaciju indicirani su potencijalno izlječivi bolesnici s karcinomom prostate i očekivanim preživljavanjem dužim od 10 godina^{3, 4, 5, 11}. Na ovaj način mogu biti liječeni pacijenti T1a,b i c, T2, te T3 stadija kada je ekstrakapsularna ekstenzija unilateralna, PSA manji od 20 ng/ml, a *Gleason score* manji od 8^{3, 4, 5, 11}. Trenutno je radikalna prostatektomija jedini način liječenja lokaliziranog karcinoma prostate koji ima najbolje preživljenje u usporedbi s ostalima^{3, 4, 5, 11}. Većina urologa se slaže kako ne bi trebalo pristupiti radikalnoj prostatektomiji ukoliko postoji patohistološki dokaz zahvaćenosti limfnih čvorova malignom bolešću. Rezultati radikalne prostatektomije u većini studija su podjednaki. Petogodišnje razdoblje bez porasta PSA ima 70-84% pacijenata, a desetogodišnje 52-74% pacijenata^{3, 4, 5, 11}.

Terapijski modaliteti u liječenju karcinoma prostate uz indikacije pregledno su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz načina liječenja karcinoma prostate

STADIJ	LIJEČENJE	INDIKACIJE
T1a	<p>praćenje</p> <p>radikalna prostatektomija radioterapija</p> <p>hormonalno liječenje kombinacija</p>	<p>u bolesnika s očekivanim preživljenjem <10 god., a kod onih s >10god. indiciran je <i>restaging</i> koji uključuje TRUS i biopsiju.</p> <p>mladi bolesnici, loše diferenciran tumor</p> <p>mladi bolesnici, loše diferenciran tumor</p> <p>rizik komplikacija veći nakon TUERP-a</p> <p>ne</p> <p>ne</p>
T1b-T2b	<p>praćenje</p> <p>radikalna prostatektomija</p> <p>radioterapija</p> <p>hormonalno</p> <p>kombinacija</p>	<p>asimptomatski pacijenti čije je preživljenje <10 god i pacijenti koji odbijaju liječenje standardni vid liječenja u pacijenata s očekivanim preživljenjem >10 god., a koji prihvaćaju liječenje</p> <p>pacijenti čije je očekivano preživljenje >10god. i prihvaćaju liječenje, pacijenti kod kojih je kontraindicirana operacija,</p> <p>pacijenti sa slabo diferenciranim karcinomom čije je očekivano preživljenje između 5 i 10god.</p> <p>simptomatski pacijenti nepodogodni za operaciju ili zračenje</p> <p>neoadjuvantna+radikalna prostatektomija: ne</p> <p>neoadjuvantna+zračenje:bolja lokalna kontrola bolesti bez upliva na preživljenje</p> <p>hormonalna (3god.)+zračenje bolji učinak kod slabo diferenciranih karcinoma</p>
T3-T4	<p>praćenje</p> <p>radikalna prostatektomija</p> <p>radioterapija</p> <p>hormonalno liječenje</p> <p>kombinacija</p>	<p>kao opcija u asimptomatskih bolesnika u T3 stadiju s dobro ili umjereno diferenciranim karcinomom, a čije je očekivano preživljenje <10god.</p> <p>kao opcija u pacijenata niskog T3 stadija s PSA<20 ng/ml, Gleason score <8 i očekivanim preživljenjem >10god.</p> <p>T3 (N0) stadij s očekivanim preživljenjem većim od 5-10god.</p> <p>doza veća od 70Gy, a u slučaju da se ne može primijeniti potrebna je kombinacija s hormonalnim liječenjem.</p> <p>simptomatski pacijenti s proširenom bolesti T3-T4 stadija s PSA >25ng/ml</p> <p>neoadjuvantna+radikalna prostatektomija:ne</p> <p>radioterapija+hormonalno: bolji rezultati nego samo radioterapija</p>
N+, M0	<p>praćenje</p> <p>radikalna prostatektomija</p> <p>radioterapija</p> <p>hormonalno</p> <p>kombinacija</p>	<p>asimptomatski pacijenti-koji odbijaju drugo liječenje</p> <p>ne</p> <p>ne</p> <p>standardno liječenje</p> <p>ne</p>
M+	hormonalno	standardna terapija

1.2.3. PATOGENEZA TUMORSKIH BOLESTI PROSTATE

Proučavanja stanične kinetike pokazala su kako proliferacijski potencijal, u hiperplaziji i u normalnom tkivu prostate, zadržavaju bazalne stanice^{3, 4}. Sedamdeset posto proliferirajućih stanica u prostati ekspresira citokeratine specifične za bazalne stanice, dok preostalih 30% pripada sekretornim staničnim tipovima^{3, 4}. Kromogranin A pozitivne neuroendokrine stanice ne pokazuju proliferacijsku sposobnost i predstavljaju populaciju stanica u završnom diferencijacijskom stupnju, stoga je malo vjerojatno kako su te stanice prekursori tumorskog rasta^{3, 4}. Apoptoza, kao programirana stanična smrt zahvaća uglavnom sekretorne stanice, dok bazalne ekspresiraju apoptoza-suprimirajući Bcl-2-onkogen^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Stanična raznolikost i rast žljezdanog epitela rezultat su međudjelovanja hormona, čimbenika rasta i adhezivnih interakcija epitelnih stanica sa stanicama i ekstracelularnim matriksom strome^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Sekretorne epitelne stanice su androgen ovisne u svome rastu i funkciji, a također su visoke razine androgenih receptora uočene i u nekih bazalnih stanica kao i nazočnost izoenzima 2 5 α -reduktaze^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Smatra se kako upravo ta populacija bazalnih stanica kreće u diferencijaciju ka sekretornim. Taj proces djelomično je pod kontrolom estrogena^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. U normalnom i hiperplastičnom tkivu prostate estrogenski receptor (E α) je prisutan u bazalnim i stromalnim stanicama³. Estrogen dovodi do atrofije sekretornih stanica i hiperplazije bazalnih stanica tako što sprječava transformaciju bazalnih u sekretorne stanice³. Prije smo spomenuli, kako su u kontrolu rasta epitelnih stanica uključeni brojni čimbenici rasta: TGF- β i α , EGF, FGF, IGF, BMP itd.^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Za pravilnu funkciju i diferencijaciju bazalnih stanica važan je i normalan odnos sa stromalnim stanicama i ekstracelularnim matriksom, koji se prvenstveno ostvaruje preko bazalne membrane i brojnih adhezijskih molekula i receptora o kojima je također bilo riječi^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Postoje različite pretpostavke o tome kako dolazi do gubitka normalnog obrasca ponašanja

prostatičnih stanica i razvoja benigne hiperplazije, ali isto tako i maligne transformacije epitela. Naime, očito je kako starenjem promjene zahvaćaju prostatično tkivo na više nivoa. Dolazi do bržeg propadanja sekretornih stanica, a bazalne stanice su spriječene u diferencijaciji prema sekretornim stanicama zadržavajući proliferacijsku sposobnost, zašto je djelomično odgovoran relativni porast estrogena u starijoj životnoj dobi, ali i promjene koje zahvaćaju stromalno-epitelne interakcije (promjene u sastavu ekstracelularnog matriksa, bazalne membrane te ekspresiji receptora za adhezijske molekule)^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Dokaz kako dolazi do smanjenja broja sekretornih stanica je i smanjena prostatična sekrecija u starijoj životnoj dobi. Za rast i bujanje stromalnih i bazalnih stanica nužna je prisutnost androgena, ali i drugih čimbenika rasta čija uloga nije do kraja razjašnjena^{3, 4, 5, 7, 8, 9}.

Prostatična intraepitelijalna neoplazija visokog stupnja (HGPIN) najvjerojatniji je prekusor karcinoma prostate^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Prema autopsijskim studijama prostatična intraepitelijalna neoplazija javlja se i do 10 godina prije samog karcinoma, a često perzistira i usporedno s njim^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Smatra se kako PIN niskog stupnja nema maligni potencijal i ne bi ga trebalo spominjati u patohistološkoj evaluaciji uzoraka prostate, dok o atipičnoj hiperplaziji (ASAP, AAH) nema dovoljno podataka^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. U prostatičnoj intraepitelijalnoj neoplaziji visokog stupnja bazalne stanice gube, a sekretorne, sada displastične stanice, dobivaju proliferacijsku sposobnost^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Ovakav proliferacijski poremećaj udružen je s ekspresijom erbB-2, 3, c-met onkogeno i nm23-H1 tumorsupresorskog gena, koje sada nalazimo kod displastičnih sekretornih stanica, a u normalnom tkivu su prisutni isključivo u bazalnim stanicama^{3, 4}. Dvadeset posto prostatičnih intraepitelijalnih neoplazija visokog stupnja eksprimira apoptozu suprimirajući Bcl-2 onkogen. Rezultat ovih promjena je duži životni vijek promijenjenih epitelnih stanica što u kombinaciji s njihovom proliferacijom predstavlja pogodan splet koji doprinosi gomilanju genetskih nestabilnosti i mutacija^{3, 4, 5}.

Kliničke studije su pokazale kako HGPIN postupno nestaje nakon deplecije androgena, a perzistiraju samo rijetki androgen neovisni slučajevi^{3, 4, 5, 7, 8, 9}.

Stromalno-epitelne interakcije HGPIN-a se ne razlikuju bitno od onih u normalnom tkivu prostate. Dramatične promjene se događaju kada počinje stromalna invazija maligno promijenjenih stanica koje su izgubile diferencijacijska obilježja bazalnih stanica^{3, 4, 5, 8, 9}. Ovaj proces je udružen s gubitkom hemidezmosomskih proteina i adhezijskih molekula kao što su kolagen tipa VII, laminin 5 i $\alpha 6\beta 4$ -integrina^{3, 4, 5, 8, 9}. Drugi ključni proces u tumorskoj invaziji je sinteza tumor-asocirane bazalne membrane (BM). Invazivne stanice karcinoma prostate produciraju komponente slične onima bazalne membrane i eksprimiraju odgovarajuće integrine ($\alpha 6\beta 1, \alpha 2\beta 1$), koji se odmah hvataju za takav novostvoreni matriks^{3, 4, 5, 8, 9}. Ovako sintetizirana neoplastična bazalna membrana razlikuje se od normalne po nedostatku hemidezmosom-vezajućeg laminina 5, kolagena tipa VII i IV i ključna je za prodor u ekstracelularni matriks tijekom stromalne invazije, a ima i važnu ulogu kod metastaziranja^{3, 4, 5, 8, 9}.

Karcinom prostate uglavnom je sastavljen od egzokrinih tumorskih stanica, koje eksprimiraju PSA, citokeratin 8, 18 i fenotipski su slične sekretornim stanicama normalnih prostatičnih žlijezda^{3, 4, 5, 8, 9}. Takve stanice obično eksprimiraju nuklearni androgeni receptor (nAR) te izoenzim 1 i 2 5α -reduktaze, kako u primarnom tako i metastaskom tumoru^{3, 4, 5, 8, 9}. Tumorske egzokrine stanice su u većini slučajeva ovisne o androgenima, međutim ekspresija nAR prisutna je u visokom stupnju i u androgen-neovisnih karcinoma što je posljedica sinteze mutiranih androgenih receptora^{3, 4, 5, 8, 9}. Pokazalo se kako takvi receptori u odsutnosti androgena vežu estrogene i druge steroidne molekule^{3, 4, 5}. Međutim, takve mutacije nisu uočene u svim slučajevima androgen-rezistentnih karcinoma što upućuje i na postojanje drugih mehanizama, kao što je preuzimanje neuroendokrinih obilježja i korištenje estrogena za vlastiti rast^{3, 4, 5}.

Oko 10% karcinoma prostate pokazuje neuroendokrini fenotip uz ekspresiju kromogranina A (ChrA). Takvi tumori su visokog gradusa, agresivniji i rezistentni na hormonalnu terapiju^{3,4,5}. Karcinomske stanice s neuroendokrinim obilježjima ne pokazuju ekspresiju androgenih receptora u svim stadijima bolesti, također produciraju veliki broj neuroendokrinih tvari kao što su: bombezin, kalcitonin, peptid sličan paratireoidnom hormonu itd., a oni uz brojne druge čimbenike parakrinim mehanizmima podržavaju rast tumorskih stanica^{3,4,5}.

U kasnijim fazama razvoja stanice karcinoma mogu ekspimirati i estrogenski (Er α) i progesteronski receptor (PR), koristeći estrogen za vlastiti rast, što objašnjava refrakternost uznapredovalog karcinoma i samih metastaza na antiandrogenu terapiju^{3,4,5,8,9}.

U patogenezi karcinoma prostate zabilježene su brojne promjene u strukturi i građi kromosoma. U oko 86% bolesnika s karcinomom prostate zabilježen je gubitak 8p₂₁₋₂₂ lokusa. U 40% slučajeva uznapredovalog karcinoma prostate primjećen je gubitak 10q₂₄₋₂₅ lokusa. Slični gubici uočeni su i na 6q, 13q i 18q krakovima kromosoma, a posebice na 16q kraku kod metastazirajućeg karcinoma^{3,4,5}.

Primijećen je i višak genetskog materijala posebice na 7q, 8q i Xq kraku kromosoma. Posebice je značajna DNA amplifikacija na lokusima Xq_{11.2-12} koja je odgovorna za hiperekspresiju androgenih receptora^{3,4,5}.

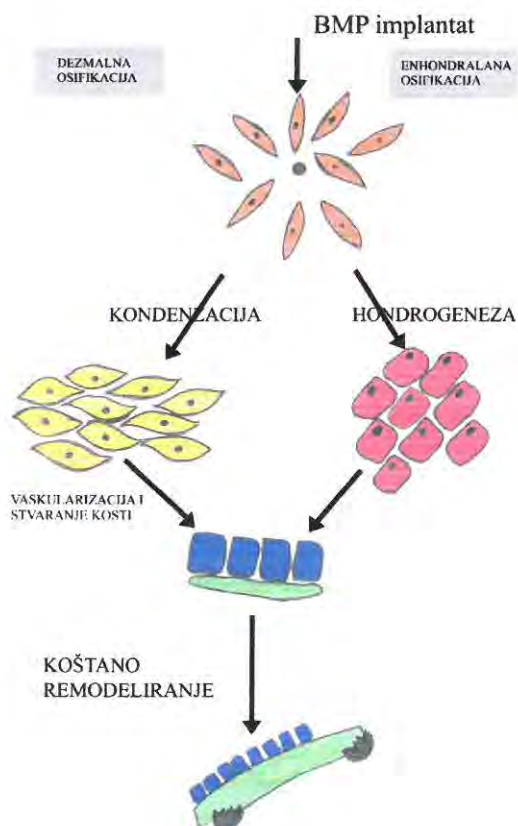
U stanicama karcinoma prostate, posebice u uznapredovalom stadiju, u višeg *Gleason score* uočena je pojačana ekspresija c-erb-2 protoonkogena, odgovornog za hiperekspresiju receptora sličnog onom za EGF^{3,4,5}. Ekspresija c-myc protoonkogena također je pojačana u karcinomu prostate, ali je niska u benignoj hiperplaziji i normalnom tkivu prostate. Inhibitor apoptoze bcl-2, također je pojačano ekspimiran, posebice u hormon-refraktornim slučajevima karcinoma prostate^{3,4,5}. Tumorski supresorski geni su također promijenjene ekspresije u karcinomu prostate^{3,4,5}. Gen RB tako zbog mutacije proizvodi nefunkcionalan protein. Inaktivacijom gena p53 i p16 dolazi do pojačane genetske nestabilnosti češćih mutacija i

nekontrolirane proliferacije tumorskih stanica karcinoma prostate, a udruženi su s bržom tumorskom progresijom^{3,4,5}. Često se u tumorskom rastu i progresiji događaju mutacije koje imaju za posljedicu pojačanu ekspresiju raznih receptora, posebice za hormone i čimbenike rasta^{3,4,5}. Uočena je tako pojačana aktivacija i ekspresija androgenih receptora u hormon neovisnih slučajeva karcinoma prostate, dok je hiperekspresija AR rijetka pojava u početnim stadijima bolesti i lokaliziranim tumorima^{3,4,5}. U karcinomu prostate eksprimirani su TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, kao i njihovi receptori i mogu suprimirati imunološki sustav, poticati angiogenezu i stvaranje ekstracelularnog matriksa te povećati motilitet stanica^{3,4,5}. Na taj način pospješuju progresiju samog karcinoma. Povišena je i produkcija ED-1 posebice u karcinoma prostate s koštanim metastazama, a djeluje kao mitogen na stanice karcinoma *in vitro* i povećava aktivnost alkalne fosfataze u novostvorenoj kosti^{3,4,5}. Uočena je hiperekspresija TGF- α , fibroblastnih čimbenika rasta te koštanih morfogenetskih proteina, o čemu ćemo detaljnije govoriti kasnije^{3,4,5}.

1.3. ULOGA I MEHANIZAM DJELOVANJA KOŠTANIH MORFOGENETSKIH PROTEINA

Koštani morfogenetski proteini članovi su nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF- β), osim koštanog morfogenetskog proteina 1, koji je krivo imenovana proteinaza prokolagena tipa 1. Do danas ih je poznato ukupno 15¹⁷.

Sposobnost implantiranog, devitaliziranog koštanog tkiva u indukciji *de novo* stvaranja kosti poznata je još od eksperimenta dr. Urista sredinom prošlog stoljeća. On je pokazao kako takvu sposobnost ima organska komponenta koštanog matriksa¹⁸. Takav preparat nazvao je «koštani morfogenetski protein». Implantacija proteinske komponente koštanog matriksa u živi organizam rezultira složenim nizom staničnih događanja (slika 11).

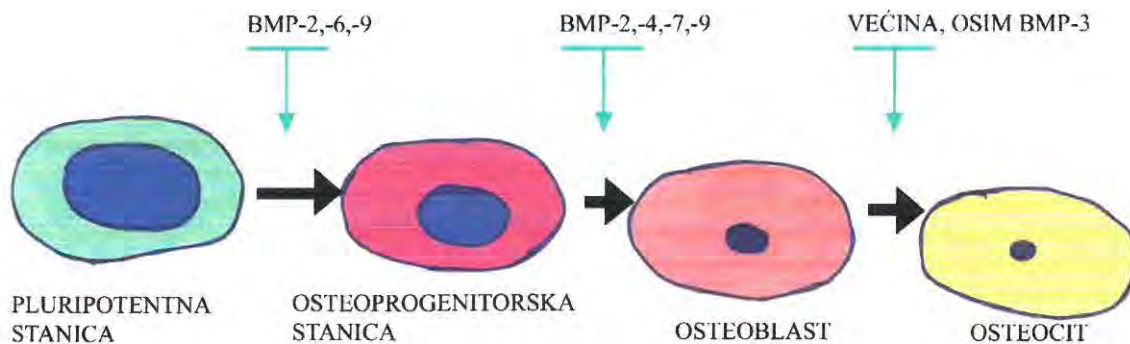


Slika 11. Prikaz staničnih događanja pri implantaciji koštanog morfogenetskog proteina (BMP)

Mjesto implantacije infiltriraju mezenhimalne stanice, dolazi do stvaranja hrskavice, vaskularizacije, stvaranja kosti i konačno remodeliranja novonastalog koštanog tkiva, zajedno s hematopoetskim elementima koštane srži ¹⁷.

Eksperimentiranje s ovakvim pripravkom bilo je teško. Za dobivanje 1mg osteoinduktivnog materijala bilo je potrebno oko 1kg kosti. Unatoč kemijskom pročišćavanju pripravka, on se i dalje sastojao od više različitih proteina. Razvojem rekombinantne DNA tehnologije postupno su izolirani pojedinačni proteini te je testirano njihovo djelovanje *in vivo* i *in vitro* ¹⁷.

Koštani morfogenetski proteini (BMP) igraju ključnu ulogu u razvoju skeleta i stvaranju kosti, ali prema zadnjim istraživanjima oni su ubikvitarni i imaju važnu ulogu u embrionalnom razvoju brojnih organskih sustava ^{17, 19, 20, 21, 22}. Najveću osteogenu aktivnost na osteoblastičnim progenitorskim staničnim linijama imaju BMP-2, -6, i -9, dok BMP-3 nema osteogenu aktivnost već antagonizira djelovanje BMP-2, -4, -6, -7 i -9 (slika 12) ^{23, 24, 25}.



Slika 12. Mjesta djelovanja pojedinih koštanih morfogenetskih proteina (BMP) u osteogenezi

Koštani morfogogenetski protein -9 je slabo poznat član BMP obitelji, koji je izoliran iz fetalne mišje jetre¹⁷. Izrazito je eksprimiran tijekom razvoja mišje jetre, a pokazalo se kako rekombinantni ljudski BMP-9 stimulira proliferaciju hepatocita¹⁷. Važan je sinergistički faktor u stvaranju hematopoetske progenitorske stanične loze¹⁷. BMP-2 i -9 pokazali su se kao promotori hrskavične diferencijacije ljudskih pluripotentnih mezenhimalnih stanica¹⁷. Implantiran *in vivo* BMP-9 pokazuje nešto slabiji osteoinduktivni efekt od BMP-7 (OP-1)¹⁷. BMP-6 je jedan od važnijih osteogenih proteina^{17, 23}. Njegova ekspresija tijekom embrionalnog razvoja u bliskoj je vezi s ekspresijom BMP-2^{17,20}. Pokazalo se kako potiče intramembranoznu i enhondralnu osifikaciju. BMP-2 ima snažnu osteogenu aktivnost potičući osteoblastične progenitorske stanice, dok je BMP-7 pokazao jači utjecaj na zrele osteoblaste^{17, 23}. Možemo pretpostaviti kako najjači i najpotpuniji osteoinduktivni učinak koštani morfogogenetski proteini ostvaruju sinergističkim djelovanjem^{17,22,23}.

Postoje sličnosti u strukturi pojedinih koštanih morfogogenetskih proteina. Jednu grupu čine BMP-2 i -4 koji se međusobno razlikuju samo po N-terminalnom kraju^{17,23}. U drugu skupinu spadaju BMP-5, -6, -7 i -8, dok se od svih značajno razlikuje BMP-3 (osteogenin)^{17, 23}. Nove studije proučavale su brojne učinke koštanih morfogogenetskih proteina u morfogenezi, epitelno-mezenhimalnoj interakciji, te tijekom razvoja tkiva i organa^{17,20,21}.

Otkriveno je kako su glavna mjesta sinteze BMP-7 i -3 bubrezi i pluća, što upućuje na mogućnost endokrinog načina regulacije osteogeneze posredovane koštanim morfogogenetskim proteinima^{17,26,27,28}.

Deplecija BMP-7 tijekom embrionalnog razvoja uzrokuje teška oštećenja bubrega, oka te defekte rebara, lubanje i ekstremiteta^{17, 26, 27, 28}. BMP-4 sudjeluje u morfogenezi plućnog epitela, a poremećaj u njegovoj ekspresiji dovodi do razvoja malih pluća s nedostatnom funkcijom pri porodu^{17, 20}. Njegova deplecija u ranoj embrionalnoj fazi je letalna zbog

defekata u razvoju mezoderma. BMP-4 ima ključnu ulogu u fiziološkom stvaranju kosti i cijeljenju prijeloma ^{17, 19, 21, 22, 23}.

BMP-2, -4 i -7 sudjeluju u razvoju zubiju, a bitni su i u razvoju kože ^{17, 20}.

Pojačana ekspresija BMP-6 tijekom razvoja epidermisa dovodi do nastanka lezija sličnih psorijazi ¹⁷. Otkriveno je kako koštani morfogogenetski proteini sudjeluju u razvoju središnjeg živčanog sustava, a *in vitro* induciraju neuronalnu diferencijaciju ^{17, 20}. Nedostatak BMP-8 dovodi do defekta u građi placente i spermatogenezi ¹⁷.

Nedavno je dokazano kako je nastanak interdigitalnih prostora kontroliran koštanim morfogogenetskim proteinima putem apoptoze mezenhimalnih stanica ¹⁷. Koštani morfogogenetski proteini mogu mijenjati fenotip nekih stanica (mišićne i masne) u osteoblastične ^{17, 19, 22, 29, 30}.

Mehanizam djelovanja ovih proteina je složen ³¹. Radi se o dimernim proteinskim molekulama koje često tvore heteromere ^{31, 32}. Primjerice, dimer se može sastojati od jedne podjedinice BMP-2 i druge od BMP-7. Djelovanje ostvaruju putem receptora ^{31, 32}. Transdukcija signala identična je onoj TGF- β signaliranju. Naime, oni ostvaruju svoj učinak u interakciji s heteromernim kompleksom membranskih receptora tipa I i II. Vežanjem liganda (BMP) aktivira se receptor tipa I i to ukriženom fosforilacijom putem receptora tipa II ^{31, 32}. Receptor tipa I je odgovoran za daljnje prenošenje signala ^{31, 32}.

Postoje tri vrste receptora tipa I: Act-RI, BMPR-IA i BMPR-IB; također i tri vrste tipa II: Act-RII, Act-RIIB i BMPR-II ^{31, 32}.

In vitro eksperimenti pokazali su kako se svi koštani morfogogenetski proteini članovi TGF- β nadobitelji vežu na receptor tipa II u kombinaciji bilo s tipom IA ili IB. Act-RII, RIIB i Act-RI uglavnom ne vežu koštane morfogogenetske proteine, već aktivine ^{31, 32}. Signal se dalje prenosi intracelularno putem skupine proteina koje zovemo SMAD. Oni aktiviraju specifične gene ^{31, 32}. Receptori za koštane morfogogenetske proteine su strukturalno gledano serin-treonin kinaze ^{31, 32}. I tip I i tip II mogu vezati ligande samostalno, ali je vezanje značajno olakšano

kada su istovremeno prisutni u kombinaciji ^{31, 32}. Aktivacijom receptora tipa I dolazi do fosforilacije proteina SMAD -1, -5 i -8 te njihovog vezanja sa «zajedničkim partnerom» SMAD-4. Na taj način stvara se kompleks SMAD proteina koji se nakuplja u jezgri gdje regulira transkripcijski proces ciljanih gena ^{31, 32}. SMAD -1 i -2 na sličan način prenose signal TGF- β i aktivina. SMAD -6 i -7 ometaju BMP signaliranje vezivanjem za BMPR-IB receptor i onemogućuju fosforilaciju SMAD -1 proteina ^{31, 32}. Postoje i drugi signalni putevi koštanih morfogogenetskih proteina osim onog posredovanog SMAD proteinima. Koštani morfogogenetski proteini mogu aktivirati različite kinaze: MAPK, ERK i p38 ^{31, 32}.

Aktivacija p38 putem BMP receptora zahtijeva prisutnost TAK1, XIAP i TAB1 molekula ³². Postoji međudjelovanje između SMAD i p38 aktivacijskog puta, što je potvrđeno činjenicom kako SMAD -6 inhibira SMAD -1, ali i p38 aktivaciju vežući se za TAK1 molekulu ³².

Najnovija istraživanja pokazuju kako vezivanjem koštanih morfogogenetskih proteina za preformirani receptorski kompleks koji se sastoji od receptora tipa I i II, dolazi do SMAD aktivacije ³². Međutim, vezivanjem za monomerni receptor tipa I visokog afiniteta, dolazi do homodimerizacije receptora, a nakon toga do stvaranja kompleksa s receptorom tipa II ³².

Ovaj kompleks (BISC-BMP inducirani signalni kompleks) rezultira SMAD neovisnom aktivacijom p38 signalnog puta (slika 13).

Smatra se kako ekspresija receptora tipa II utječe na strukturu i organizaciju receptora tipa I povećavajući njihov afinitet za stvaranje *cluster*-a i preformiranih receptorskih kompleksa i to upravo na o nim dijelovima stanične membrane gdje je SMAD signaliranje najefikasnije ³².

Ranije smo naveli kako SMAD -6 i -7 mogu inhibirati signalni put koštanih morfogogenetskih proteina posredovan SMAD -1, -5 i -8 proteinima ³². Postoje i drugi proteini koji vezivanjem za koštane morfogogenetske proteine reguliraju njihovu funkciju ^{31, 32}. Inhibicija BMP signaliranja zbiva se na više razina, višestrukim mehanizmima: intracelularno (pomoću

inhibitornih SMAD, SMURF i SANE proteina), na samoj membrani (inhibicija pseudoreceptorom BAMBI/nma) i ekstracelularno (antagonisti i inhibitori koštanih morfogogenetskih proteina)^{31,33}.

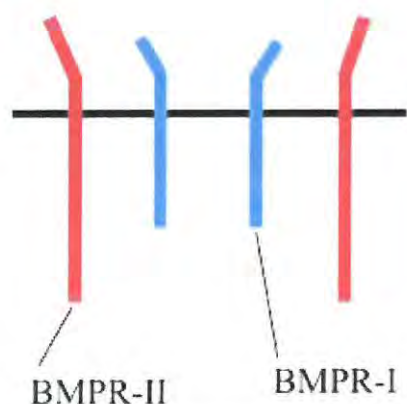
NOGGIN se veže za molekule BMP -2 i -4 visokim afinitetom i sprječava njihovo vezanje za receptore³³. Chordin djeluje na sličan način. Oba inhibiraju i druge članove BMP obitelji, ali nešto slabijim afinitetom. Fallistatin se veže i inhibira BMP -4 i -7. Noviji inhibitori su Cerebrens i Gremlin³³.

Poznato je kako i pojedine molekule BMP-a mogu inhibirati djelovanje drugih. Najzastupljeniji BMP u koštanom matriksu je BMP -3. On inducira osteogenu diferencijaciju, ali ujedno i inhibira djelovanje osteoinduktivnih BMP -2, -4, -6 i -7³¹.

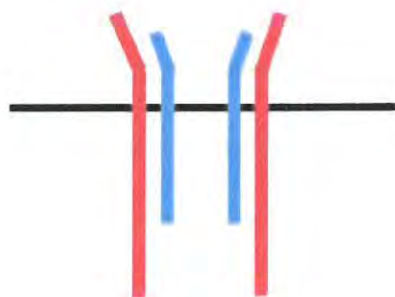
Ekperimentalni miševi koji ne ekspimiraju BMP-3 imaju dvostruko više trabekularne kosti od divljih tipova³¹.

BMP receptori prije vezivanja liganda

HOMOMERNI RECEPTORI
TIP I i II

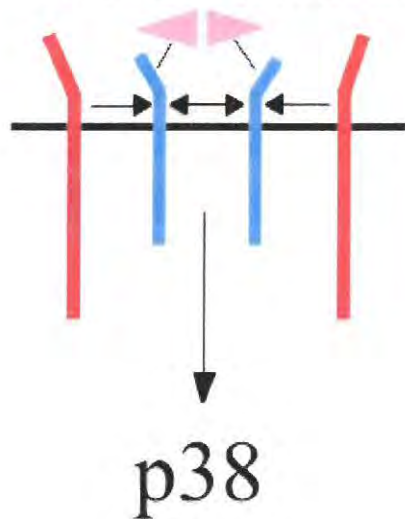


PREFORMIRANI
RECEPTORSKI KOMPLEKS

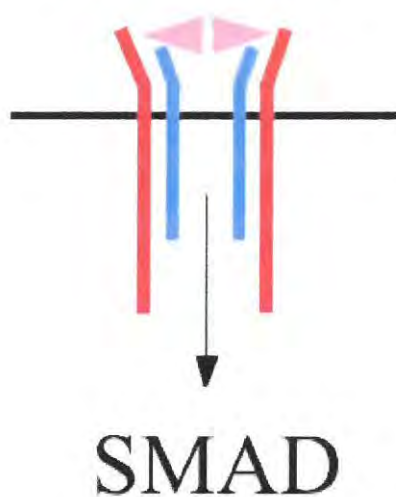


BMP receptori nakon vezivanja liganda

BMP INDUCIRANI
SIGNALNI KOMPLEKS



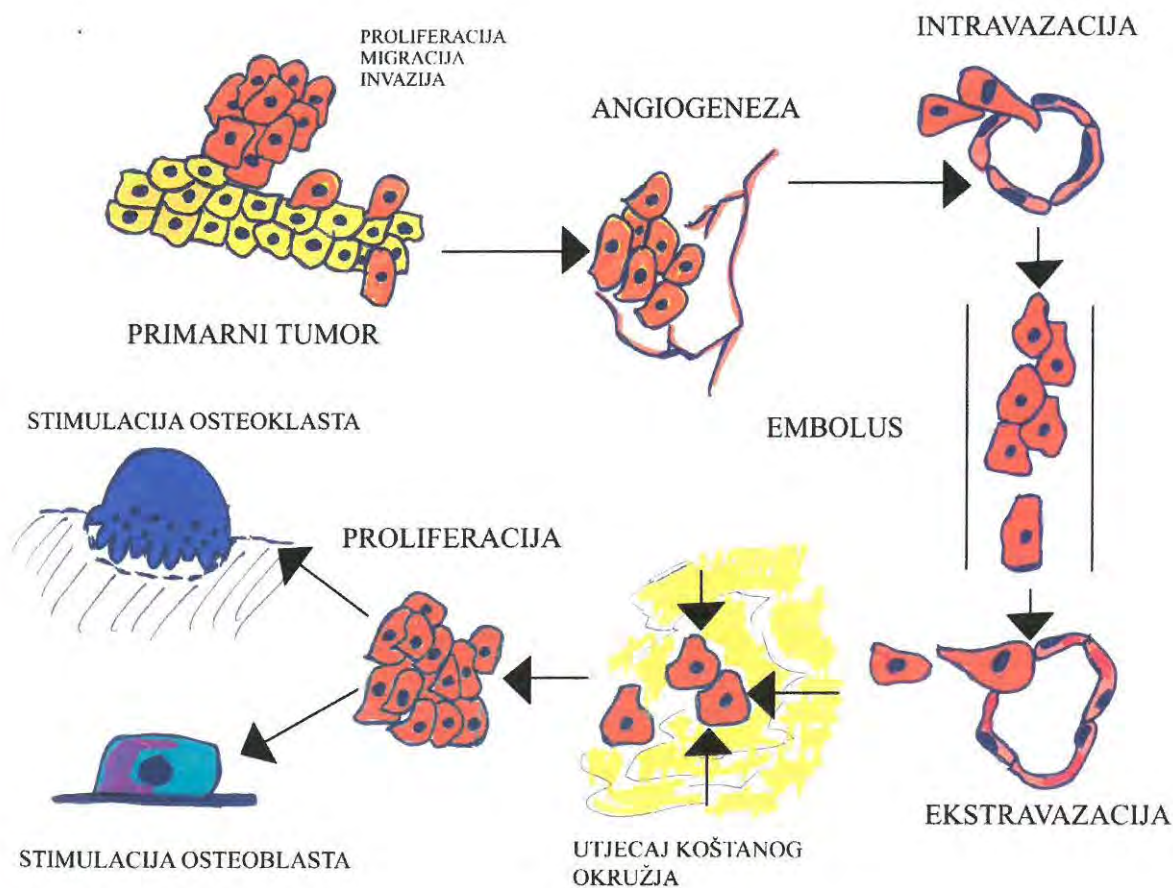
PREFORMIRANI
RECEPTORSKI KOMPLEKS



Slika 13. Načini prenošenja signala putem receptora za koštane morfogenetske proteine (BMP). Receptor za koštani morfogenetski protein tip I (BMPR-I) i II (BMPR-II)

1.4. KOŠTANO METASTAZIRANJE TUMORA

Dosadašnje spoznaje pokazuju koliko je biologija tumorskog nastanka i napredovanja složena, a veliki je broj interakcija na molekularnoj razini koji olakšavaju diseminaciju primarnog tumora^{34, 35}. U koštano metastaziranju ključni su procesi koji omogućuju prodor tumorskih stanica kroz ekstracelularni matriks, potom ulazak u sistemska cirkulaciju te procesi koji omogućuju implantaciju uz destrukciju ili stvaranje nove kosti (slika 14)^{34, 35}.



Slika 14. Shematski prikaz procesa uključenih u koštano metastaziranje

Pojava koštanih metastaza ne može se objasniti isključivo anatomskim odnosima³⁴. Primjerice, smatra se kako je jedan od razloga zašto su metastaze karcinoma prostate lokalizirane najčešće u kostima zdjelice i kralješcima, postojanje obilnog Batson-ovog venskog pleksusa koji okružuje taj dio skeleta³⁴. S druge strane postoje dobro vaskularizirani organi kao što su mišići i bubrezi, a rijetko su sijelo metastaza³⁴. Prema Paget-ovoj teoriji «sjemena i tla» kompleksnost brojnih interakcija između tumorskih stanica i njihove okoline razlog je zašto neki tumori metastaziraju u kosti^{34, 35, 36, 37, 38, 39}. U osnovi tumorski, pa i metastatski rast, posljedica je sposobnosti tumorskih stanica da u interakcijama sa stanicama koje ih okružuju koriste čimbenike iz okoline za poticanje vlastitog rasta i umnožavanja^{34, 35, 36, 37, 38, 39}. Priroda koštanih metastaza se razlikuje ovisno o tome koja je vrsta koštanih stanica stimulirana: osteoblasti ili osteoklasti. Primjerice, koštane metastaze karcinoma bubrega ili dojke ekspanzivne su i osteolitičke, dok su metastaze karcinoma prostate najčešće osteoblastične^{34, 35, 36, 37, 38, 39}.

U patogenezi koštanog metastaziranja važnu ulogu igraju stanične adhezijske molekule.

Ključni događaj na samom početku metastatskog procesa jest gubitak staničnih kohezijskih osobina, odvajanje od ekstracelularnog matriksa, invazija i migracija malignih stanica^{34, 35, 36, 37, 38, 39}. Smanjena ekspresija adhezijskih molekula E-kadherina ima važnu ulogu u tom procesu, udružena je s većom invazivnošću tumora, dok pojačana ekspresija smanjuje invaziju *in vitro*, te reducira nastanak metastaza u životinjskim modelima^{34, 35, 36, 37, 38, 39}. Nadalje, gubitak ekspresije E-kadherina kod ljudskih malignih tumora udružen je sa smanjenim preživljavanjem i lošijom prognozom³⁴.

Prodiranje tumorskih stanica u ekstracelularni matriks, te ulazak i izlazak iz vaskularnih struktura zahtijeva adheziju, tj. vezivanje sa specifičnim glikoproteinima matriksa. Takvo vezivanje omogućeno je serijom integrinskih receptora na površini tumorskih stanica^{34, 35, 36, 37, 38, 39}. Postoji više od 20 subtipova integrina. Radi se o $\alpha\beta$ heterodimernim receptorima.

Brojni autori su izvjestili kako pojačana ekspresija integrina povećava metastatski potencijal tumora^{34, 35, 36, 37, 38, 39}.

Koštani ekstracelularni matriks bogat je lamininom, kolagenom tipa I, osteopontinom i fibronektinom, a upravo $\beta 1$ podjedinica integrina specifično veže narečene molekule koštanog matriksa i eksprimirana je često u tumorima koji daju koštane metastaze³⁴.

Receptor za kolagen eksprimiran je u brojnim tumorima, što djelomično objašnjava činjenicu kako je kost često ciljno tkivo brojnih metastaza^{34, 35, 36, 37, 38, 39}.

Kolorektalni karcinom rijetko metastazira u kost, ali i rijetko eksprimira receptor za kolagen³⁴. Ekstracelularni koštani matriks sadrži i brojne molekule koje potiču ekspresiju kolagenog receptora^{34, 35, 36, 37, 38, 39}.

TGF- β poznat je kao poticatelj ekspresije integrinskih receptora u brojnim tumorima uključujući i karcinom prostate, melanom te osteosarkom. Ekspresiju integrina potiču i IL-1, FGF- α i - β ^{34, 35, 36, 37, 38, 39}.

Članovi imunoglobulinske nadobitelji i selektinske obitelji uključeni su u stanično-stanične heterofilne interakcije, koje uključuju adheziju tumorskih stanica za endotel, malignu transformaciju i metastaziranje^{34, 36, 37, 38, 39}.

Vaskularna stanična adhezijska molekula-1 (VCAM-1) eksprimirana je na stromalnim stanicama koštane srži, a uočena je adhezija tumorskih stanica za tu molekulu putem $\alpha 4\beta 1$ -integrinskog receptora^{34, 35, 36, 37, 38, 39}.

Selektini su transmembranski glikoproteini koji posreduju u adhezijskim interakcijama tijekom upale i omogućuju leukocitnu infiltraciju upaljenog područja^{34, 36, 37, 38, 39, 40}. Osim na leukocitima pronađeni su i na endotelnim stanicama i trombocitima. Selektini su sposobni vezati ugljikohidratne ligande^{34, 40}. Upalni procesi imaju važnu ulogu u tumorogenezi, a lecitini i ugljikohidrati imaju ulogu u metastaziranju^{34, 40}. E-selektin omogućuje vezanje stanica karcinoma kolona za endotelne stanice *in vitro*. P-selektin eksprimiran je na stanicama

karcinoma pluća, dojke i kolona. L-selektin je povezan s hematogenom diseminacijom limfoma. U limfogenom metastaziranju važnu ulogu ima CD44 molekula, posebice u karcinomu dojke i kolona ^{34, 40}.

Interakcija tumorskih s endotelnim stanicama i vaskularnim elementima važna je u procesu metastaziranja. Trombocitno-fibrinski ugrušci dovode, tako, do zaustavljanja tumorskih stanica. Kemotaksijski čimbenici koje otpuštaju endotelne stanice pojačavaju motilitet tumorskih stanica ^{34, 40, 41}. Upalni citokini reguliraju adhezijske sposobnosti istih, a adhezijske molekule se koriste za ekstravazaciju tumorskih stanica ^{34, 40, 41}.

Stanice karcinoma prostate pokazuju visoki adhezijski afinitet prema endotelnim stanicama u koštanoj srži ^{34, 40, 41}.

Tumorske stanice sposobne su lučiti i potaknuti lučenje proteolitičkih enzima s ciljem razgradnje ekstracelularnog matriksa, olakšavajući invaziju ^{34, 36, 37, 38, 39}. Poznata je uloga u metastaziranju serinskih proteaza: urokinaze, aktivatora plazminogena, elastaze, plazmina, katepsina G, cisteinskih proteaza, aspartat proteaza i matriks metaloproteinaza (MMP). Ove posljednje posebno su važne u razgradnji kolagena, a njihova produkcija regulirana je čimbenicima rasta, hormonima, upalnim citokinima i onkoproteinima ³⁴. Kolagen tipa IV razgrađuju MMP-9 i -12, a stanice karcinoma prostate izlučuju MMP-1, koja razgrađuje kolagen tipa I ³⁴.

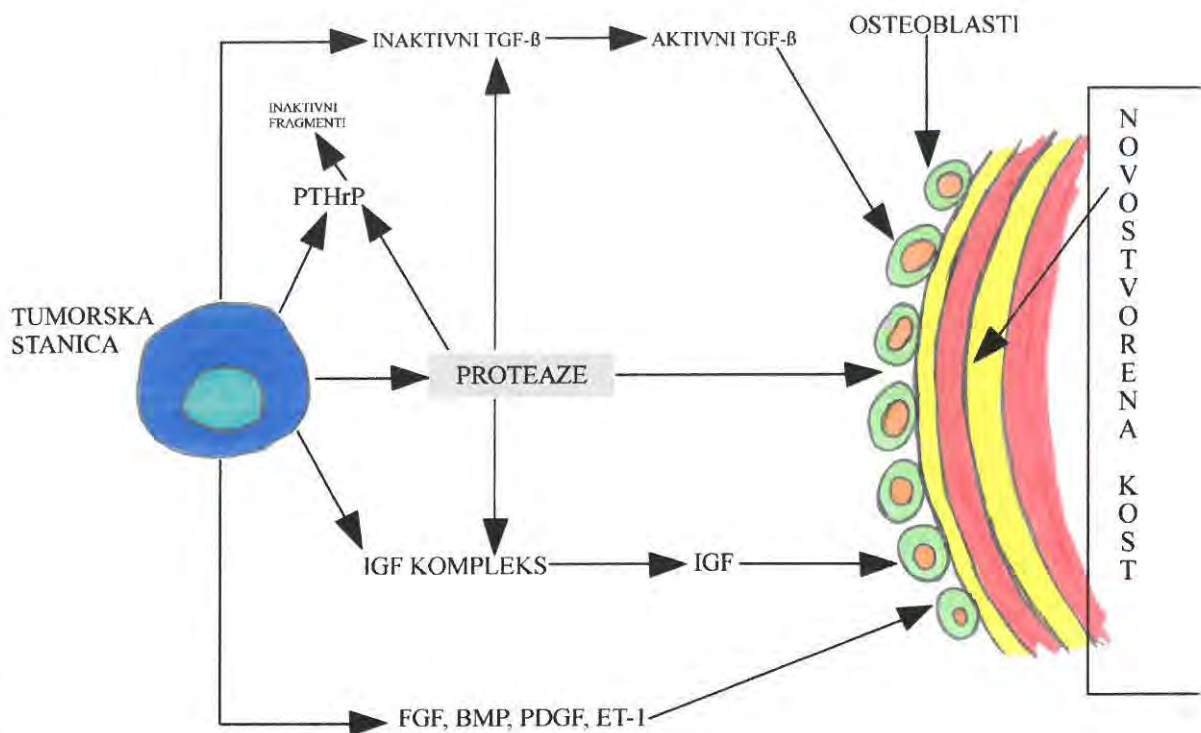
Razgradnjom ekstracelularnog matriksa oslobađaju se brojni čimbenici rasta (TGF- β , PDGF, IGF-1, -2, FGF i koštani morfogogenetski proteini) koji mogu pospješiti proces metastaziranja ^{34, 36, 37, 38, 39}.

Stanice karcinoma prostate produciraju TGF- β koji je snažan osteoinduktivni čimbenik *in vivo*. Proizvode i FGF, koji se pokazao kao stimulator osteoblastne proliferacije. Intenzivna je i proizvodnja endotelina-1 i koštanih morfogogenetskih proteina o čijoj ćemo ulozi u patogenezi karcinoma prostate govoriti kasnije ⁴².

Endotelin-1 snažan je mitogen za stanice karcinoma prostate, a njegova aktivnost je posredovana pojačanom produkcijom IGF-1, -2, PDGF i epidermalnim čimbenikom rasta ⁴¹.

Endotelin-1 snažan je vazokonstriktor i djeluje preko ET_A i ET_B receptora. Detektiran je u osteocitima, osteoblastima, osteoklastima i vaskularnim endotelnim stanicama ⁴¹. On stimulira mitozu osteoblasta i pojačava učinak drugih osteoinduktivnih čimbenika (slika 15), kao što je BMP-7 ⁴¹. Stimulira transport fosfata i produkciju osteopontina, osteokalcina i matriks metaloproteinaza ⁴¹.

Karcinom prostate najčešće metastazira u kosti i u 90% slučajeva daje osteoblastične metastaze, međutim u malom broju slučajeva te su metastaze osteolitične, a češće su miješanog litičko-blastičnog tipa ⁴². Do danas nije sa sigurnošću utvrđeno jesu li u početku sve koštane metastaze litičkog tipa, radi stvaranja prostora za tumorski rast, što je zabilježeno u nekim studijama, ili se pak u osteoblastičnim metastazama stvaranje nove kosti odvija od samog početka ⁴².



Slika 15. Prikaz čimbenika koji sudjeluju u stvaranju osteoblastične metastaze. Transformirajući čimbenik rasta β (TGF- β), protein sličan paratireoidnom hormonu (PTHrP), inzulinu slični čimbenici rasta (IGF), koštani morfogenetski proteini (BMP), fibroblastni čimbenik rasta (FGF), čimbenik rasta porijeklom iz trombocita (PDGF) i endotelin-1 (ET-1)

Utvrđeno je kako stanice karcinoma prostate mogu tijekom implantacije u kost lučiti i protein sličan paratireoidnom hormonu (PTHrP), koji je inače hiperekspimiran u osteolitičnim metastazama. PTHrP stimulira proliferaciju i diferencijaciju osteoklastnih prekursora kao i RANKL protein te osteoprotegerin ^{42, 43}. Stanice karcinoma prostate luče i interleukin-6 i -8. Interleukin-6 potiče formiranje osteoklasta te ima važnu ulogu zajedno s PTHrP u početnim fazama rasta koštane metastaze. Interleukin-8 potiče angiogenezu i produkciju MMP-2 ^{42, 43}.

Valja napomenuti kako osim karcinoma prostate osteoblastične metastaze mogu dati i mijelom, karcinom kolona, astroцитom, multiformni glioblastom, timom, karcinoid, nazofaringealni karcinom, cervikalni karcinom i neki drugi rijedi tumori ³⁴.

1.5. KOŠTANI MORFOGENETSKI PROTEINI I KARCINOM PROSTATE

Ranije smo napomenuli kako je smrtnost u bolesnika s karcinomom prostate, pogotovo u mlađoj životnoj dobi, povezana s agresivnošću tumora i pojavom koštanih metastaza ³⁸. Metastaze karcinoma prostate češće su osteoplastične nego osteolitične, mada prema novim istraživanjima osteoliza ima važnu ulogu u početku nastanka metastaza ^{34, 42}. Mehanizam stvaranja nove kosti u metastatskim lezijama nije u potpunosti poznat. Povezuje se s produkcijom brojnih čimbenika koje luče tumorske stanice prostate, pa tako i s koštanim morfogogenetskim proteinima ^{34, 42}.

Prvi radovi o ekspresiji koštanih morfogogenetskih proteina u karcinomu prostate pokazali su ekspresiju BMP-1, -2, -3, -4, -5 i -6 ⁴⁴. U benignoj prostatičnoj hiperplaziji nije bilo ekspresije BMP-6, dok je njegova ekspresija zabilježena u oko 55% bolesnika s karcinomom prostate s dokazanim koštanim metastazama ^{44, 45, 46, 47}.

Stanice normalne prostate produciraju BMP -2, -4 i -6 ^{44, 45, 46, 47}. PC-3 stanična linija karcinomskih stanica prostate ima količinski sličnu produkciju spomenutih koštanih morfogogenetskih proteina, dok je LNCaP stanična linija producirala značajno manje količine. PC-3 linija producirala je i veće količine BMP-3, dok su stanice normalne prostate i LNCaP linije producirale minimalne količine tog proteina ⁴⁶.

Studija koja je proučavala ekspresiju BMP-6 u stanicama normalne prostate i karcinoma, pokazala je kako se pojačava njegova ekspresija kod višeg tumorskog gradusa (*Gleason score*) ⁴⁵.

U usporedbi s normalnim tkivom prostate ekspresija BMP-6 je nešto viša u karcinomu i androgen je neovisna ^{45, 48}. Pretpostavlja se kako BMP-6 sudjeluje u autokrinom i parakrinom signaliranju u odsutnosti androgena ^{49, 50}.

BMP-6 eksprimiran je u oko 85% slučajeva koštanih metastaza karcinoma prostate, dok je samo 29% koštanih metastaza drugih tumora pokazalo njegovu ekspresiju⁵¹. Uočeno je kako pojačana ekspresija koštanog sijaloproteina, BMP-6 i timidin fosforilaze u primarnom karcinomu prostate dovodi do veće učestalosti koštanog metastaziranja⁵².

Istraživana je i regulacija rasta stanica karcinoma prostate putem BMP-2, koji u odsutnosti androgena stimulira, a u prisutnosti androgena inhibira proliferaciju LNCaP stanične linije⁵³. Ova pojava povezuje se s androgen-ovisnom ekspresijom receptora za koštane morfogenetske proteine⁵³.

Obrazac djelovanja BMP-2 i -6 može djelomično objasniti zašto u nekim slučajevima bolesnika s karcinomom prostate, unatoč androgenoj depleciji bolest napreduje^{51, 52, 53, 54}.

Ekspresija BMP-4 neovisna je o androgenima, dok njihova deplecija dovodi do značajnog smanjenja ekspresije BMP-7^{55, 56}.

U nedostatku androgena smanjena je ekspresija BMP-IB receptora, a on je ujedno i najekspimiraniji receptor za koštane morfogenetske proteine u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama. Poseban afinitet vezivanja za ovaj receptor pokazuju BMP-2, -4 i -7⁵⁷.

Ekspresija receptora za koštane morfogenetske proteine u stanicama karcinoma prostate korelira s patohistološkim gradusom (*Gleason score*). Naime, viši gradusi imaju slabiju do u cijelosti odsutnu ekspresiju receptora^{58, 59}.

Neki koštani morfogenetski proteini mogu, u određenim uvjetima, inhibirati proliferaciju stanica karcinoma prostate, a gubitak ekspresije njihovih receptora može predstavljati način na koji stanice karcinoma prostate postaju rezistentne na inhibitorno djelovanje BMP-a^{54, 57, 58, 59}.

Novija istraživanja pokazala su pojačanu ekspresiju BMP-7 u koštanim metastazama karcinoma prostate⁶⁰. Međutim, nije zabilježena ekspresija BMP-7 u koštanim metastazama

karcinoma bubrega, mokraćnog mjehura i kože. Nije uočena razlika u jačini ekspresije između metastaza i primarnog sjajela karcinoma prostate⁶⁰.

Najnovija istraživanja pokazala su kako je ekspresija BMP-7 ovisna o androgenu i opada s deplecijom muških spolnih hormona, a viša je u tkivu koštanih metastaza nego u normalnom koštanom tkivu^{56, 60}. Ekspresija BMP-7 detektirana je u 91% uzoraka normalne prostate, u 64% *de novo* dijagnosticiranih slučajeva karcinoma prostate i u oko 30% lokalnih recidiva karcinoma^{56, 60}.

S razvojem i progresijom maligne bolesti ekspresija BMP-7 imala je tendenciju opadanja^{56, 60}. Drugo je istraživanje pokazalo inhibitorni učinak BMP-7 na androgen neovisne PC-3 i DU-145 stanične linije karcinoma prostate⁵⁷. Naše najnovije istraživanje pokazalo je kako karcinom prostate s dokazanim koštanim metastazama eksprimira BMP-2/4, -3, -5, -6 i -7, dok karcinom dojke s dokazanim koštanim metastazama eksprimira samo BMP-7⁶¹.

Gubitak ekspresije receptora za koštane morfogenetske proteine u karcinomu prostate udružen je s visokim patohistološkim gradusom, povećanom incidencijom recidiva i smanjenim preživljenjem^{58, 59, 62}.

LNCaP, DU-145, PC3 i PC3M stanične linije karcinoma prostate inhibirane su na dozno ovisan način koštanim morfogenetskim proteinom -6^{57, 59}. Ove četiri stanične linije ekspimiraju BMPR-IA, -IB i BMPR-II. Kada se u stanice linije PC3M ubaci gen za sintezu inaktivnog BMPR-II receptora (BMPR-IIDN), BMP-6 više nije sposoban inhibirati njihovu proliferaciju, a tumorogenost samih stanica se povećala^{57, 59}. Možemo zaključiti kako bi gubitak ekspresije BMPR-II receptora mogao poslužiti kao prognostički čimbenik u pacijenata s karcinomom prostate^{57, 59}.

Gubitak BMP signalizacije u stanicama karcinoma prostate može biti uzrokom tumorske progresije. Koštani morfogenetski proteini mogu inhibirati proliferaciju i inducirati apoptozu stanica želučanog, bubrežnog i plućnog karcinoma, té mijeloma^{59, 63, 64}.

U karcinomu prostate uočene su i višestruke mutacije gena za BMPR-II receptor, a alterirano BMP signaliranje može omogućiti preživljenje i proliferaciju stanica karcinoma prostate u kosti^{59, 65}.

Iz dosad rečenog možemo vidjeti kako postoje, donekle, dva oprečna razmišljanja o ulozi koštanih morfogenetskih proteina. Naime, veliki broj dosadašnjih studija pokazao je postojanje ekspresije različitih koštanih morfogenetskih proteina u tkivu normalne prostate, u adenomu te karcinomu, i u samim koštanim metastazama karcinoma prostate. Time su pokušali objasniti zašto karcinom prostate metastazira uglavnom u kost i zašto daje osteoblastični tip koštanih metastaza^{44, 45, 46, 47, 48, 52, 53, 54, 57, 60}. Najnovija istraživanja pokazala su gubitak ekspresije receptora za koštane morfogenetske proteine s porastom patohistološkog gradusa karcinoma prostate, a što može upućivati na inhibitornu ulogu samih koštanih morfogenetskih proteina u tumorskom bujanju^{58, 59}. No, do sad ne postoji studija koja bi proučila obrazac ekspresije receptora koštanih morfogenetskih proteina u samom tkivu metastaze karcinoma prostate. Također, moramo naglasiti kako većina dosadašnjih spoznaja o djelovanju koštanih morfogenetskih proteina proizilazi iz proučavanja staničnih linija, koje su u velikoj mjeri izgubile osobine izvornog karcinoma.

Širenje tumora u koštane strukture i otkrivanje ekspresije nekih koštanih morfogenetskih proteina u zdravom tkivu prostate kao i u tkivu karcinoma, navelo je istraživače na hipotezu kako je to širenje kao i procesi stvaranja koštanog tkiva uvjetovano upravo tim faktorima rasta koji su inače poznati kao osteoinduktivni. Postoji određen broj radova na tu temu koji stalno podržavaju navedenu hipotezu ali to ničim nisu potvrdili^{44, 45, 46, 47, 48, 52, 53, 54, 57, 60}. Rezultate je teško sumirati jer nisu rađeni na istim uzorcima. Mi podržavamo tu hipotezu i vjerujemo kako koštani morfogenetski proteini prisutni u tkivu prostate imaju utjecaja na patogenezu tumora i njegov način širenja. Ono što svakako nedostaje u dosadašnjim istraživanjima je detaljnija analiza ekspresije receptora za koštane

morfogenetske proteine i eventualne promjene s obzirom na razvojni stadij tumora i koštanih metastaza. Ovako sistematična analiza pojavnosti ovih faktora rasta i njihovih receptora preko kojih djeluju mogla bi pomoći u tumačenju patogeneze, kako primarnog karcinoma, tako i koštanih metastaza. Nadamo se, kako bi mogla dati barem element važan za procjenu razvojnog stadija tumora i prognoze bolesti. Ovom ćemo studijom provesti detaljniju analizu ekspresije koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u patogenezi karcinoma prostate i u njegovim koštanim metastazama. Po prvi put analizirat ćemo obrasce ekspresije receptora i samih koštanih morfogenetskih proteina u tkivu normalne prostate, benigne hiperplazije, karcinoma prostate s obzirom na stadij diferencijacije tumora, te u tkivu pripadajućih koštanih metastaza. Pokušat ćemo pronaći odgovarajuće obrasce, tj. pravilnosti u ekspresiji koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora. Time ćemo pripomoći razumijevanju patogeneze nastanka koštanih metastaza karcinoma prostate s čime se otvara put, možebitnoj, kliničkoj primjeni obrazaca ekspresije koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma prostate kao prognostičkih čimbenika u prognozi same bolesti.

Nadamo se kako će naše istraživanje, čiji prikaz slijedi, barem donekle pomoći u rasvjetljavanju možebitne uloge koštanih morfogenetskih proteina u patogenezi karcinoma prostate.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Proučiti obrasce ekspresije koštanih morfogenetskih proteina (BMP-2/4,-3,-5,-6,-7) i njihovih receptora (BMPR-IA,-IB,-II) u tkivu zdrave prostate, benigne hiperplazije prostate, karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama i karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza, te tkivu koštanih metastaza karcinoma prostate.

2. Pokazati postoji li povezanost između ekspresije pojedinih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma prostate i učestalosti pojave koštanih metastaza.

3. Pokazati postoji li povezanost između ekspresije pojedinih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u tkivu karcinoma prostate i stupnja diferencijacije (*Gleason score*).

4. Pokazati postoji li povezanost, tj. razlika u ekspresiji pojedinih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u samom tkivu koštanih metastaza karcinoma prostate.

3. MATERIJAL I METODE

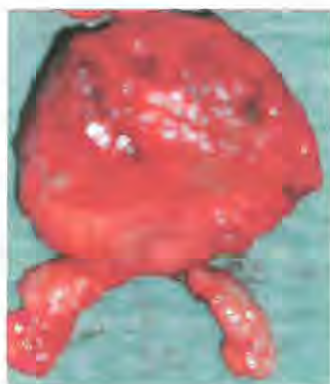
3.1. MATERIJAL

Istraživat ćemo ukupno 105 uzoraka tkiva podijeljenih u 5 grupa.

Prvu grupu čini 20 uzoraka tkiva prostate muškaraca mlade životne dobi (20-30 godina) koji nisu imali nikakvih znakova niti anamnestičkih podataka o bolestima urogenitalnog sustava tijekom života. Uzorke tkiva prostate uzete tijekom obdukcije dobili smo iz arhive Zavoda za patologiju i Zavoda za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Drugu grupu čini 20 uzoraka tkiva prostate muškaraca životne dobi od 50-70 godina u kojih nakon obrade prema kliničkim urološkim smjernicama nije dokazan karcinom prostate, već je dijagnosticirana benigna hiperplazija prostate, pa je učinjena transuretralna resekcija prostate ili transvezikalna adenomektomija na Urološkom odjelu Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci. Uzorke tkiva prostate dobili smo sa Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Treću grupu čini 35 uzoraka tkiva prostate muškaraca životne dobi od 50-70 godina u kojih je nakon obrade prema kliničkim urološkim smjernicama dokazan karcinom prostate te je učinjena radikalna prostatektomija na Urološkom odjelu Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci (slika 16).



*Slika 16. Prostata i sjemeni mjehurići
odstranjeni radikalnom prostatektomijom*

Uzorci tkiva karcinoma prostate dobiveni su sa Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U sklopu kliničke obrade analizom koncentracije alkalne fosfataze u krvnom serumu i scintigrafijom skeleta tehnecijem (Th^{99}) isključeno je postojanje koštanih metastaza, a patohistološkom analizom regionalnih limfnih čvorova dobivenih tijekom operacije isključene su i metastaze u regionalne limfne čvorove. Iz krvnog seruma bolesnika prije operacije određena je i koncentracija prostatičnog specifičnog antigena (PSA). Analiza krvnog seruma učinjena je u središnjem laboratoriju, a scintigrafija skeleta na Zavodu za nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra u Rijeci.

Četvrtu grupu čini 20 uzoraka tkiva prostate muškaraca životne dobi od 50-90 godina u kojih je nakon obrade na Urološkom odjelu Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci, prema kliničkim urološkim smjernicama dokazan karcinom prostate. Uzorke tkiva karcinoma prostate dobili smo sa Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. U sklopu kliničke obrade analizom koncentracije alkalne fosfataze u krvnom serumu i scintigrafijom skeleta tehnecijem (Th^{99}) potvrđeno je postojanje koštanih metastaza. Totalna aktivnost alkalne fosfataze u serumu određena je kinetičkim kolor-testom na *Olympus* analizatoru (Olympus, Tokyo, Japan), uporabom p-nitofenilfosfatnog pufera pri pH 10.4 (normalni raspon vrijednosti za odrasle od 30-120 U/L)⁶⁶.

Koštane metastaze pokazale su se na scintigrafiji skeleta kao «vruće točke», te su prikazane i uobičajenim radiografskim snimkama zdjelice i lumbalne kralježnice, kao osteoblastične.

Iz krvnog seruma bolesnika određena je i koncentracija prostatičnog specifičnog antigena (PSA). Analiza krvnog seruma učinjena je u središnjem laboratoriju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci, a scintigrafija skeleta na Zavodu za nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra u Rijeci. Serumske vrijednosti PSA mjerene su uporabom *IMx* testa (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Normalni raspon vrijednosti PSA za ovaj test iznosi od 0 – 4 ng/ml.

Petu grupu čini deset uzoraka tkiva koštanih metastaza dobivenih od muškaraca iz prethodne skupine, koji su operirani na Odjelu za neurokirurgiju Klinike za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci zbog patoloških fraktura lumbalnih kralježaka. Uzorke tkiva koštanih metastaza karcinoma prostate dobili smo sa Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

3.2. METODE

Na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta patološki je standardnim histološkim metodama pregledao i postavio dijagnozu za svaki uzorak tkiva, a za uzorke karcinoma prostate odredio je i *Gleason score* prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Uzorci su, potom, na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta u Rijeci izrezani serijskim rezovima debljine 3-4 μm na *Leica RM550* rotirajućem mikrotomu. Longitudinalni rezovi postavljeni su na stakalca obložena 3-aminopropiltri-etoksi silanom (APES, *Sigma*, St. Luis, MO, USA), osušeni na zraku i pohranjeni na +4°C do imunohistokemijske analize. Primarna antitijela kupljena su od *Santa Cruz Biotechnology* (Santa Cruz, USA).

Anti-BMP-2/4 je kozje poliklonalno IgG antitijelo čiji je epitop blizu karboksi-kraja humanog BMP-4 i BMP-2 i koji ne reagira križno s ostalim BMP-ovima. Anti-BMP-3,-5,-6,-7 te anti-BMP-1A, -1B i -1C su, također, kozja poliklonalna IgG antitijela čiji se epitopi nalaze na molekulama odgovarajućih humanih koštanih morfogeneznih proteina.

Imunohistokemijska analiza provedena je korištenjem indirektnog imunoperoksidaza sustava.

Tkivni uzorci su deparafinizirani u ksilenu i rehidrirani u etanolu. Endogena peroksidaza i nespecifična mjesta vezanja antitijela blokirana su inkubacijom u 0.3% vodikovom peroksidu u metanolu i 5% neimunom serumu.

Nakon 60 minutne inkubacije na sobnoj temperaturi s primarnim antitijelom uzorci su isprani u PBS-u i inkubirani sa sekundarnim biotiniziranim antitijelom prema protokolu proizvođača (DAKO, LSAB[®]+ Kit Peroxidase). Uzorci su potom izloženi djelovanju streptavidin vezane peroksidaze uz dodatak 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorida (DAB) kao kromogena. Rezultirajuća pozitivna reakcija je crvene boje. Uzorci su potom obojani hematoksilinom. U kontrolnoj reakciji umjesto primarnog antitijela korišten je normalni serum ili su uzorci inkubirani samo sa sekundarnim antitijelom.

Uzorci su potom analizirani uz pomoć *Olympus BX 50* optičkog mikroskopa (*Olympus, Japan*), te je za svaki uzorak učinjeno 15 mikrofotografija različitih vidnih polja koristeći *Olympus OM-4 Ti* digitalnu kameru (*Olympus, Tokyo, Japan*).

Sve uzorke podijelili smo na pozitivne i negativne, ovisno o imunohistokemijskoj reakciji. Pozitivnim uzorkom smatrali smo samo one kod kojih je broj pozitivno obojanih žljezdanih stanica prostate tj. tumora ukupno bio veći od 10%, uspoređujući pritom intenzitet bojenja s negativnom kontrolom.

Potom smo samo kod pozitivnih uzoraka određivali i udio, tj. postotak pozitivnih stanica.

Kako bi analiza broja pozitivnih stanica bila pouzdana, brojenje stanica su obavile tri osobe. Brojene su stanice u 15 vidnih polja (povećanje 400x) svakog uzorka za svako antitijelo. Iz njihovih rezultata izračunata je srednja vrijednost i to je predstavljalo broj pozitivnih stanica za određeni ispitivani BMP ili određeni receptor. Brojeno je ukupno oko 1000 stanica po uzorku i to za svaki BMP tj. BMPR. Za brojanje stanica koristio se sustav za analizu slike - *image analyzer system* (slika 17) s odgovarajućom softverskom podrškom (Issa, VAMS, Zagreb, Hrvatska). Rezultati su prikazani kao postotak pozitivnih stanica. Između osoba koje su izvršile brojanje postoji značajna podudarnost (*Pearson's r = 0.683, P<0.05*).



Slika 17. Sustav za analizu slike (*image analyzer system*)

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza podataka učinjena je korištenjem *Statistica 6.1* kompjuterskog programa (StatSoft.Inc., Tulsa, OK, USA). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ili s rasponom od 10-te do 90-te percentile.

Razliku između pojedinih grupa testirali smo neparametrijskim testovima: *Kruskal-Wallis ANOVA* testom za usporedbu više grupa i *Mann-Whitney U* testom za usporedbu dviju grupa.

U većini slučajeva distribucija rezultata nije bila normalna, ali je imala slične obrasce. Provjera distribucije učinjena je *Shapiro-Wilks*-ovim testom. Statistički značajnom smatrala se vrijednost $P < 0.05$.

4. REZULTATI

Ekspresija koštanih morfogenetskih proteina (BMP) i njihovih receptora (BMPR) u žljezdanim stanicama uzoraka tkiva normalne prostate, benigne prostatične hiperplazije, karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza, karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama i uzorcima tkiva koštanih metastaza karcinoma prostate utvrđena je imunohistokemijom.

Promatrali smo ekspresiju BMP-2/4, -5, -6, -7, te receptora tipa BMPR-IA, -IB i -II.

Ekspresija različitih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora između istovrsnih uzoraka uglavnom se statistički značajno razlikuje ($p < 0.05$).

BMP-2/4 najjače je eksprimiran u žljezdanim stanicama normalne prostate ($87,77 \pm 11,42\%$ pozitivnih stanica). U uzorcima koštanih metastaza te karcinomu prostate bez i s dokazanim koštanim metastazama uočili smo ekspresiju BMP-2/4 u velikom postotku stanica (slika 18, 26 i tablica 3). Najmanji udio žljezdanih stanica koje eksprimiraju BMP-2/4 uočili smo u uzorcima benigne prostatične hiperplazije ($44,55 \pm 38,48\%$ pozitivnih stanica).

Ekspresija BMP-3 potpuno je negativna ($0,00 \pm 0,00\%$ pozitivnih stanica) u uzorcima normalne prostate i koštanih metastaza karcinoma prostate, dok je slaba u benignoj prostatičnoj hiperplaziji i tkivu karcinoma prostate (slika 19, 26 i tablica 3).

BMP-5 eksprimiran je približno isto u uzorcima normalne prostate, benigno i maligno promijenjenoj prostati, te u uzorcima koštanih metastaza karcinoma prostate. (slika 20, 26 i tablica 3).

BMP-6 najslabije je eksprimiran u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($20,08 \pm 28,07\%$ pozitivnih stanica) i u normalnoj prostati ($34,51 \pm 12,95\%$ pozitivnih stanica), dok je nešto jače izražen u uzorcima tkiva koštanih metastaza, benigne

prostatične hiperplazije i karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (slika 21, 26 i tablica 3).

Ekspresija BMP-7 (slika 22, 27 i tablica 3) izrazito je jaka i prisutna u svim stanicama koštanih metastaza karcinoma prostate ($100,00 \pm 0,00\%$ pozitivnih stanica). Jaku ekspresiju nalazimo i u tkivu normalne prostate ($94,63 \pm 0,89\%$ pozitivnih stanica). Usporedbom ekspresije BMP-7 u uzorcima tkiva karcinoma prostate s i bez dokazanih koštanih metastaza, uočili smo značajno manju ekspresiju u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($22,55 \pm 32,38\%$ pozitivnih stanica).

BMPIA najjače je eksprimiran (slika 23, 27 i tablica 3) u uzorcima normalne prostate ($70,52 \pm 18,25\%$ pozitivnih stanica), a najslabije u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($20,48 \pm 31,18\%$ pozitivnih stanica).

Ekspresija receptora tipa BMP-IB najizrazitija je u koštanim metastazama ($95,24 \pm 9,51\%$ pozitivnih stanica), a najslabija u benignoj prostatičnoj hiperplaziji ($36,10 \pm 39,93\%$ pozitivnih stanica), dok ekspresija u uzorcima normalne prostate i karcinoma prostate nije statistički značajno različita (slika 24, 27 i tablica 3).

Receptor tipa BMP-II najslabije je eksprimiran u uzorcima tkiva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama ($5,59 \pm 17,46\%$ pozitivnih stanica) i u samim koštanim metastazama ($16,40 \pm 11,79\%$ pozitivnih stanica), dok je ekspresija u normalnoj prostati, benignoj prostatičnoj hiperplaziji i karcinomu prostate bez dokazanih koštanih metastaza približno ista (slika 25, 27 i tablica 3).

U tkivu normalne prostate eksprimirani su svi koštani morfogenetski proteini i njihovi receptori osim BMP-3.

U normalnoj prostati (tablica 3) najjaču ekspresiju pokazuju BMP-7 ($94,63 \pm 0,89\%$ pozitivnih stanica) i BMP-2/4 ($87,77 \pm 11,42\%$ pozitivnih stanica), a od receptora BMP-IA ($70,50 \pm 18,25\%$ pozitivnih stanica), dok su ostali receptori nešto slabije eksprimirani:

- BMPR-IB (52,23±12,36% pozitivnih stanica) i
- BMPR-II (41,80±11,32% pozitivnih stanica).

U uzorcima tkiva benigne prostatične hiperplazije prisutna je ekspresija svih koštanih morfogenetskih proteina.

Benigna prostatična hiperplazija pokazuje najizrazitiju ekspresiju BMP-7 (57,36±37,36% pozitivnih stanica). Receptori za koštane morfogenetske proteine ekspimirani su podjednako, ali značajno slabije nego u normalnoj prostati.

Karcinom prostate bez dokazanih koštanih metastaza najjače ekspimirira BMP-2/4 i -7, što smo uočili i u uzorcima tkiva koštanih metastaza. U tkivu karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama najjača je ekspresija BMP-2/4, dok je izraženost ostalih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora slabija (tablica 3).

Stanice koštanih metastaza karcinoma prostate (slika 26, 27 i tablica 3) najjače ekspimiraju BMP-7 (100% pozitivnih stanica) i BMP-2/4 (76,76±8,47% pozitivnih stanica).

U žljezdanim stanicama normalne prostate izražena su sva tri tipa receptora, specifičnih za djelovanje ispitivanih koštanih morfogenetskih proteina. U benignoj prostatičnoj hiperplaziji ekspresija receptora za koštane morfogenetske proteine značajno se smanjuje u odnosu na normalnu prostatu. Izrazitije smanjenje ekspresije receptora uočili smo u uzorcima tkiva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama. Posebice se smanjuje ekspresija receptora tipa BMPR-IA (20,48±31,18% pozitivnih stanica) i BMPR-II (5,59±17,46% pozitivnih stanica). U tkivu karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza smanjuje se ekspresija BMPR-IA, dok je ekspresija ostalih tipova receptora ista kao u normalnoj prostati. U tkivu koštanih metastaza karcinoma prostate pronašli smo ekspresiju sva tri tipa receptora. Uspoređujući uzorke koštanih metastaza karcinoma prostate i normalne prostate uočili smo, kako se značajno povećao udio stanica koje ekspimiraju

receptor tipa BMPR-IB, dok se značajno smanjila ekspresija receptora tipa BMPR-II (tablica 3).

BMP-7 pokazao je u žljezdanim stanicama uz citoplazmatsku i jaku nuklearnu ekspresiju (slika 22 i 27), dok su ostali koštani morfogenetski proteini i receptori pokazali citoplazmatsku ekspresiju (slika 18-26).

U benignoj prostatičnoj hiperplaziji BMP-7, te receptori tipa BMPR-IA i IB izrazitije su eksprimirani u bazalnim stanicama, dok je u ostalim uzorcima ekspresija prisutna u sekretornim stanicama (slika 22, 23 i 24).

Valja napomenuti, kako većinu ispitivanih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora eksprimira i stromalno tkivo prostate, a posebice glatke mišićne stanice. Ovakva ekspresija posebice je izražena u uzorcima normalne prostate i benigne prostatične hiperplazije (slika 18 – 25).

Tablica 3. Stanice u kojih je imunohistokemijski utvrđena ekspresija koštanih morfogogenetskih proteina i njihovih receptora (% , srednja vrijednost±SD). Normalna prostata, benigna prostatična hiperplazija, karcinom prostate bez dokazanih koštanih metastaza, karcinom prostate s dokazanim koštanim metastazama i koštane metastaze karcinoma prostate

BMP	NORMALNA PROSTATA	BENIGNA PROSTATIČNA HIPERPLAZIJA	KARCINOM PROSTATE BEZ DOKAZANIH KOŠTANIH METASTAZA	KARCINOM PROSTATE S DOKAZANIM KOŠTANIM METASTAZAMA	KOŠTANE METASTAZE KARCINOMA PROSTATE
BMP-2/4	87,77±11,42	44,55±38,48 ^a	71,71±24,41 ^e	71,53±25,94 ^{c, f}	76,76±8,47 ^g
BMP-3	0,00±0,00	16,70±16,94 ^a	12,17±26,97 ^b	11,16±23,87 ^c	0,00±0,00 ^{g, i, j}
BMP-5	42,55±12,45	44,87±40,82	52,63±40,86	48,36±31,49	52,14±22,71 ^{d, g}
BMP-6	34,51±12,95	47,33±42,62 ^a	48,63±35,59 ^b	20,08±28,07 ^{c, f, h}	48,90±10,01 ^{d, j}
BMP-7	94,63±0,89	57,36±37,36 ^a	70,37±27,05 ^{b, e}	22,55±32,38 ^{c, f, h}	100,00±0,00 ^{g, i, j}
BMPR-IA	70,52±18,25	35,50±32,54 ^a	57,25±30,71 ^e	20,48±31,18 ^{c, f, h}	55,02±22,08 ^{d, g, j}
BMPR-IB	52,23±12,36	36,10±39,93 ^a	53,43±22,67 ^e	53,25±36,41 ^f	95,24±9,51 ^{d, g, i, j}
BMPR-II	41,80±11,32	36,66±35,77	45,96±32,22 ^e	5,59±17,46 ^{c, f, h}	16,40±11,79 ^{d, g, i, j}

^a p<0.05, usporedba normalne prostate i benigne prostatične hiperplazije, ^j p<0.05, usporedba karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama i samih metastaza

^b p<0.05, usporedba normalne prostate i karcinoma bez dokazanih koštanih metastaza,

^c p<0.05, usporedba normalne prostate i karcinoma s dokazanim koštanim metastazama,

^d p<0.05, usporedba normalne prostate i koštanih metastaza,

^e p<0.05, usporedba benigne prostatične hiperplazije i karcinoma bez dokazanih koštanih metastaza,

^f p<0.05, usporedba benigne prostatične hiperplazije i karcinoma s dokazanim koštanim metastazama,

^g p<0.05, usporedba benigne prostatične hiperplazije i koštanih metastaza,

^h p<0.05, usporedba karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza i karcinoma s dokazanim koštanim metastazama,

ⁱ p<0.05, usporedba karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza i samih metastaza te

Tablica 4. Udio uzoraka koji eksprimiraju koštane morfogenetske proteine i njihove receptore (% , n/ukupni broj)¹. Normalna prostata, benigna prostatična hiperplazija, karcinom prostate bez dokazanih koštanih metastaza, karcinom prostate s dokazanim koštanim metastazama i koštane metastaze karcinoma prostate

BMP	NORMALNA PROSTATA		BENIGNA PROSTATIČNA HIPERPLAZIJA		KARCINOM PROSTATE BEZ DOKAZANIH KOŠTANIH METASTAZA		KARCINOM PROSTATE S DOKAZANIM KOŠTANIM METASTAZAMA		KOŠTANE METASTAZE KARCINOMA PROSTATE	
	%	n/20	%	n/20	%	n/35	%	n/20	%	n/10
BMP-2/4	100%	20/20	75%	15/20	100%	35/35	90%	18/20	100%	10/10
BMP-3	0%	0/20	35%	7/20	23%	8/35	20%	4/20	0%	0/10
BMP-5	100%	20/20	75%	15/20	91%	32/35	80%	16/20	100%	10/10
BMP-6	100%	20/20	60%	12/20	75%	26/35	45%	9/20	100%	10/10
BMP-7	100%	20/20	100%	20/20	100%	35/35	45%	9/20	100%	10/10
BMPR-IA	100%	20/20	60%	12/20	100%	35/35	40%	8/20	100%	10/10
BMPR-IB	100%	20/20	60%	12/20	100%	35/35	75%	15/20	100%	10/10
BMPR-II	100%	20/20	60%	12/20	75%	26/35	10%	2/20	50%	5/10

¹ Uzorkom koji eksprimira odgovarajući koštani morfogenetski protein i receptor, smatrao se onaj s $\geq 10\%$ imunohistokemijski pozitivnih stanica.

Tablica 4 prikazuje udio uzoraka koji eksprimiraju koštane morfogenetske proteine i njihove receptore u stanicama:

- normalne prostate,
- benigne prostatične hiperplazije,
- karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza,
- karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama i
- koštanih metastaza karcinoma prostate.

Uzorkom koji eksprimira odgovarajući koštani morfogenetski protein ili receptor, smatrao se onaj s $\geq 10\%$ imunohistokemijski pozitivnih stanica.

U 100% uzoraka normalne prostate ekspimirani su svi koštani morfogenetski proteini i receptori osim BMP-3, koji nije ekspimiran niti u jednom uzorku (tablica 4).

Slična je ekspresija i u uzorcima koštanih metastaza karcinoma prostate, osim BMP-3, koji je ekspimiran u 50% uzoraka (tablica 4).

BMP-3 ne ekspimiraju uzorci normalne prostate niti koštanih metastaza, dok ga eksprimira podjednako mali broj uzoraka benigne prostatične hiperplazije te karcinoma prostate s i bez dokazanih koštanih metastaza (tablica 4).

BMP-2/4 i BMP-5 eksprimira gotovo jednak broj uzoraka tkiva normalne prostate, benigno i maligno alterirane prostate te samih koštanih metastaza (tablica 4).

BMP-6 i -7 eksprimira (tablica 4) najmanji broj uzoraka tkiva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (45%).

Podjednaki broj uzoraka normalne prostate, benigne prostatične hiperplazije i karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza eksprimira receptore koštanih morfogenetskih proteina, dok ih eksprimira značajno manji broj uzoraka karcinoma prostate s

dokazanim koštanim metastazama i samih koštanih metastaza, što se posebeice odnosi na BMPR-II (tablica 4).

Tablica 5. Patohistološki gradus (Gleason score) i prostatični specifični antigen (PSA) u karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza i u karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (srednja vrijednost \pm SD)

	KARCINOM PROSTATE BEZ DOKAZANIH KOŠTANIH METASTAZA	KARCINOM PROSTATE S DOKAZANIM KOŠTANIM METASTAZAMA
Gleason score	4 \pm 1	6 \pm 2 ^a
PSA	10,5 \pm 2,8 ng/ml	105,1 \pm 147,1 ng/ml ^b

^a p<0.05

^b p<0.01

Tablica 5 prikazuje usporedbu karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza i karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama prema razini ukupnog, serumskog prostatičnog, specifičnog antigena (PSA) i patohistološkom gradusu (*Gleason score*).

U karcinomu prostate bez dokazanih koštanih metastaza patohistološki gradus i PSA značajno su niži od onih u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama (tablica 5).

Vrijednosti patohistološkog gradusa u karcinomu prostate bez dokazanih koštanih metastaza kreću se u rasponu od 2 do 5, dok su u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama između 4 i 7.

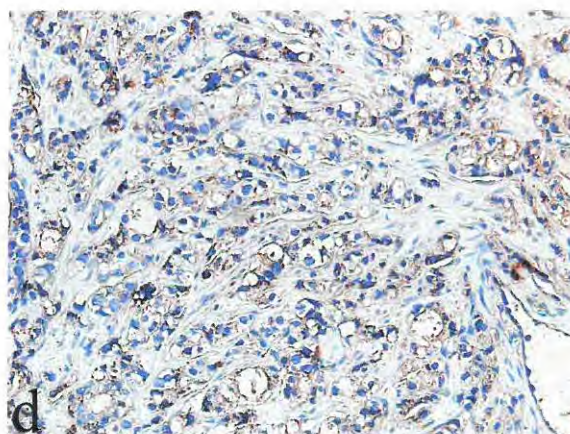
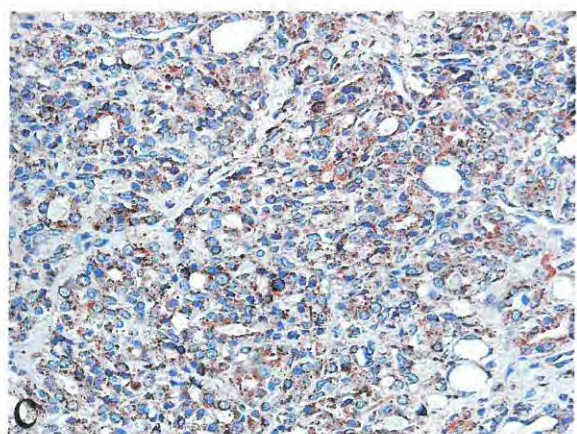
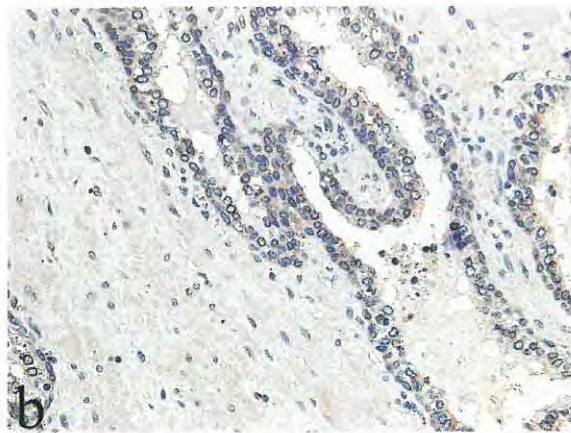
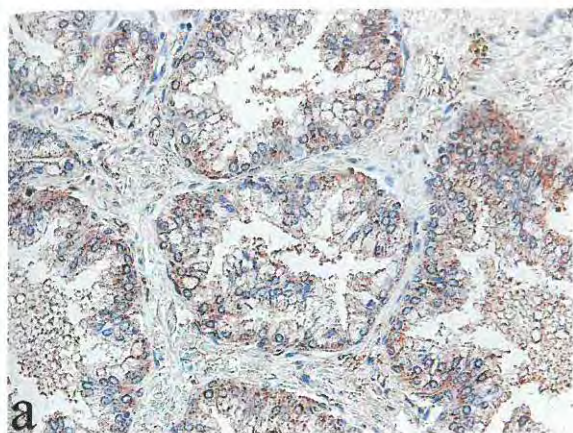
Razina ukupnog, serumskog PSA u karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza iznosi između 4,8 i 19,1 ng/ml, a u karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama je između 28,5 i 500 ng/ml.

*Tablica 6. Vrijednosti ukupne, serumske
alkalne fosfataze (U/l) za svaki uzorak
karcinoma prostate s dokazanim koštanim
metastazama*

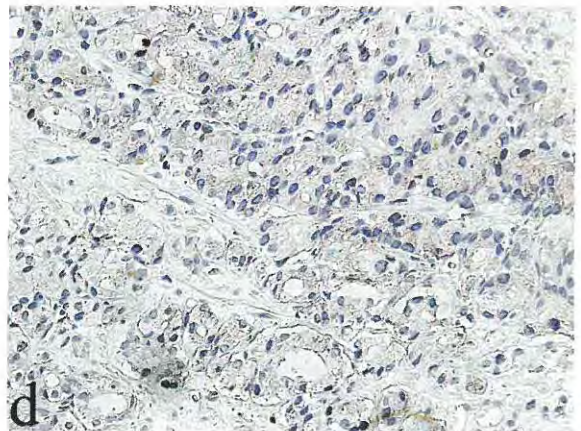
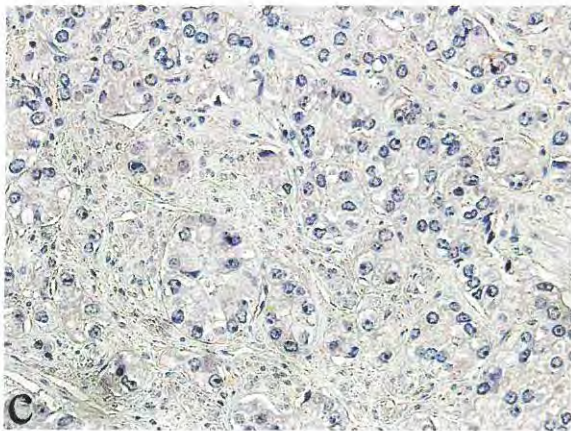
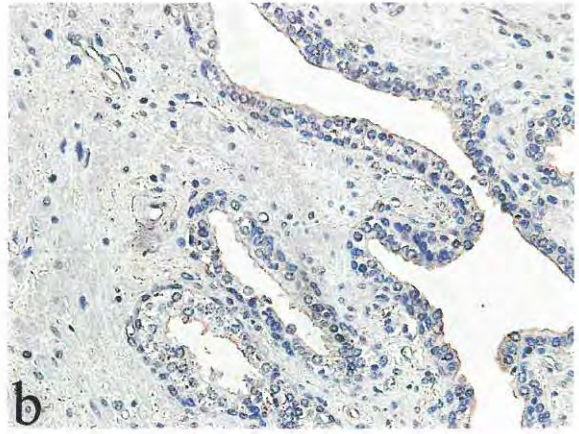
REDNI BROJ UZORKA	VRIJEDNOST UKUPNE SERUMSKE ALKALNE FOSFATAZE (U/l)
1	131
2	158
3	476
4	137
5	329
6	600
7	158
8	1016
9	911
10	371
11	1008
12	154
13	856
14	700
15	1009
16	400
17	356
18	888
19	652
20	159

U tablici 6 prikazane su vrijednosti aktivnosti serumske, ukupne alkalne fosfataze za svaki pojedini slučaj karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama.

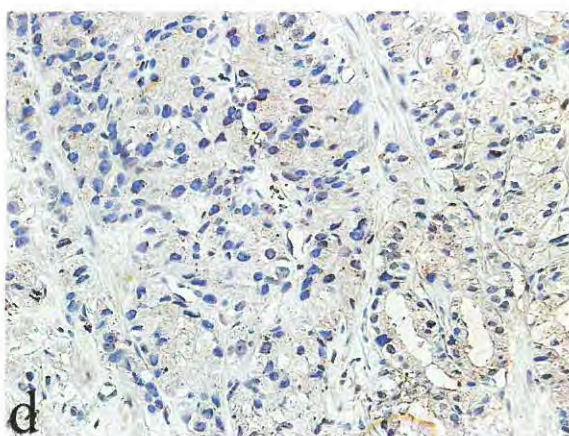
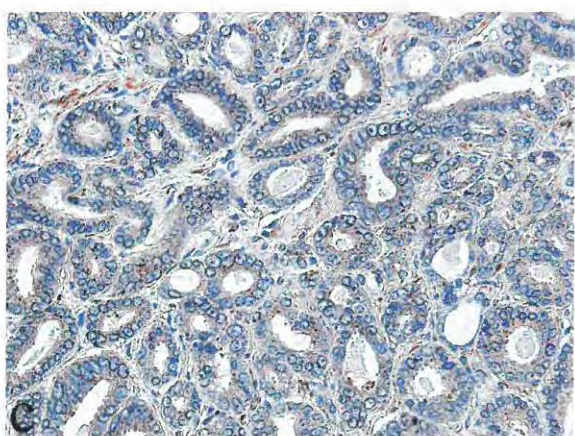
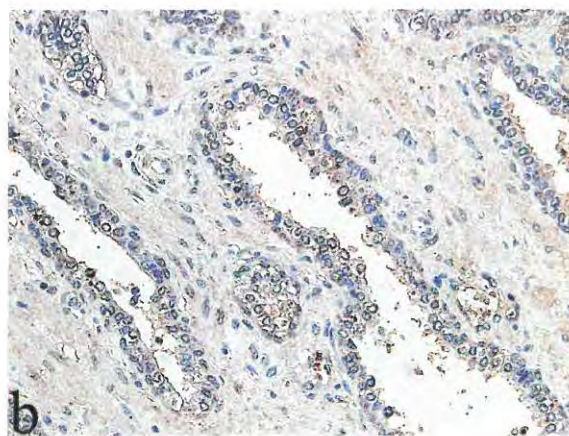
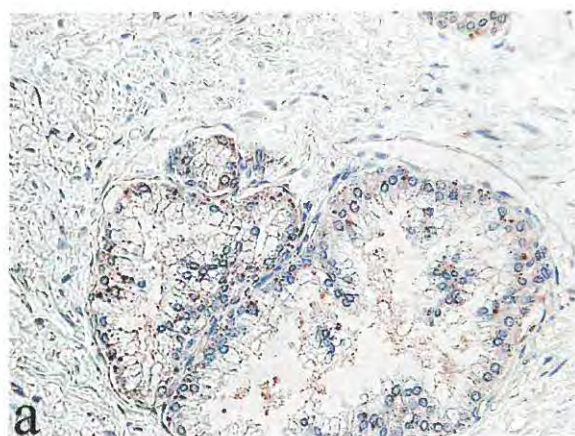
Vidljivo je kako je u svim slučajevima aktivnost bila značajno viša od normalne (30-120 U/l) i kretala se od 131 do 1016 U/l.



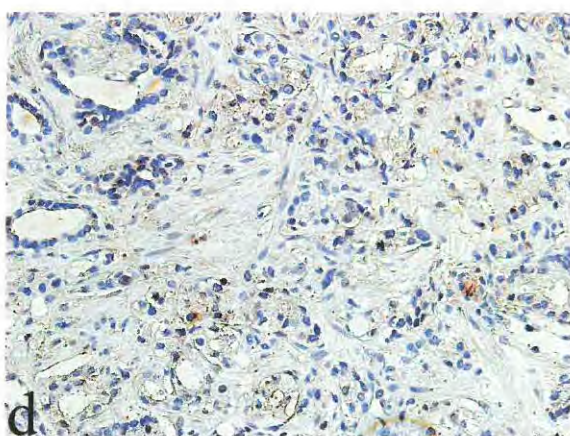
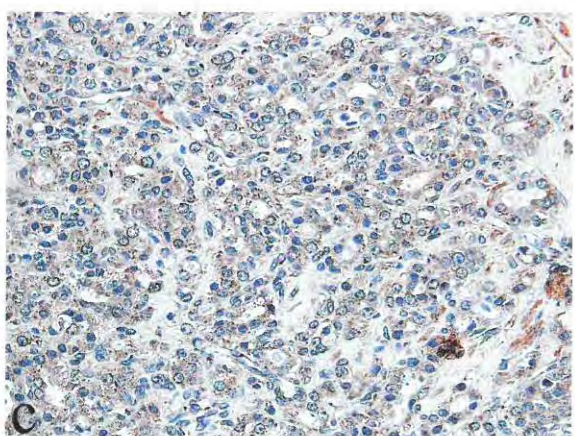
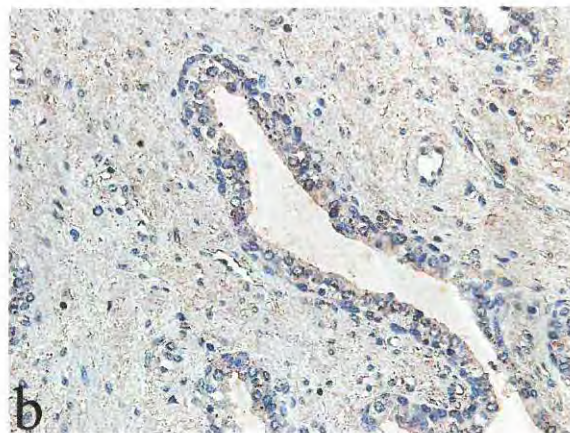
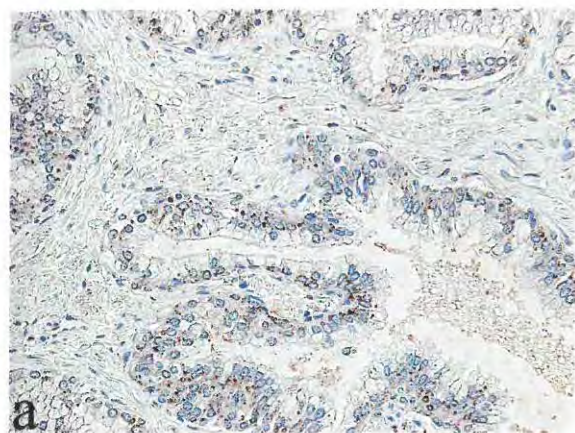
Slika 18. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMP-2/4. Tkivo normalne prostate (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



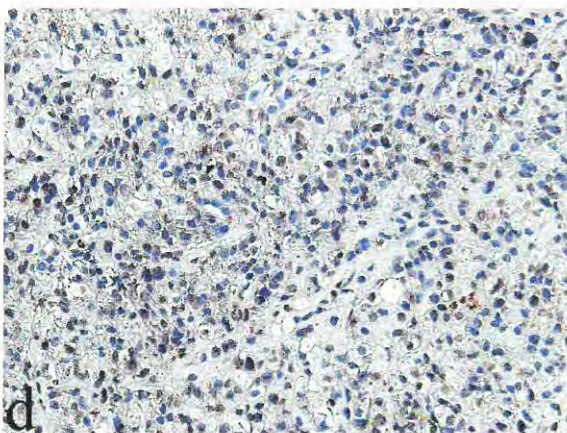
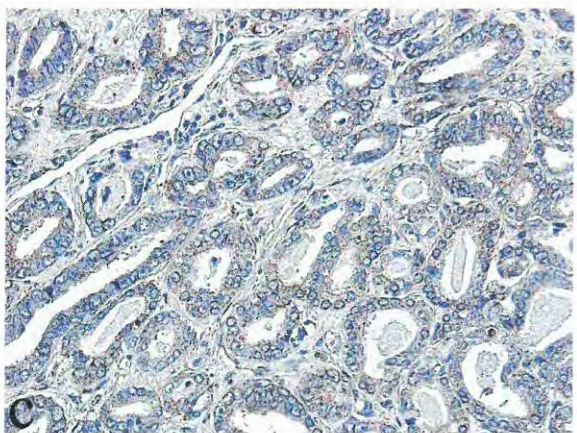
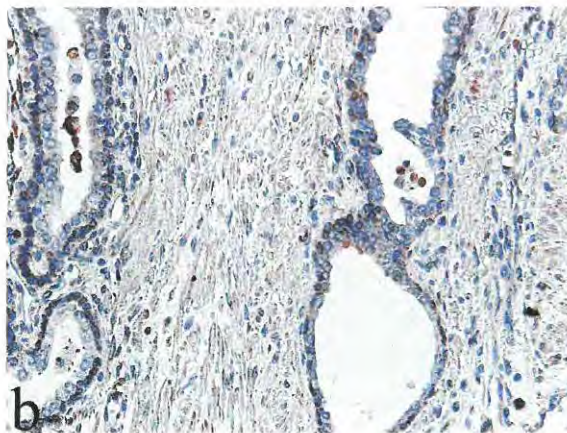
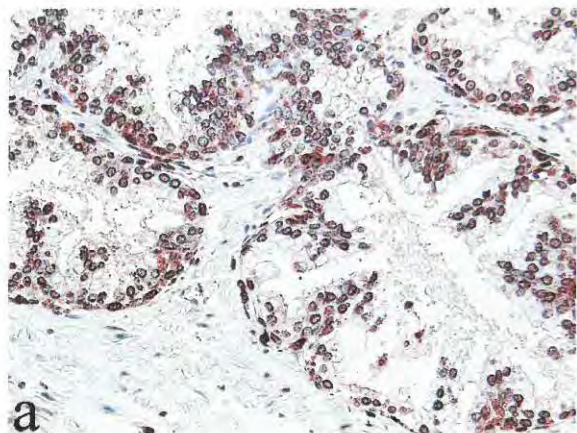
Slika 19. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMP-3. Tkivo normalne prostate (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



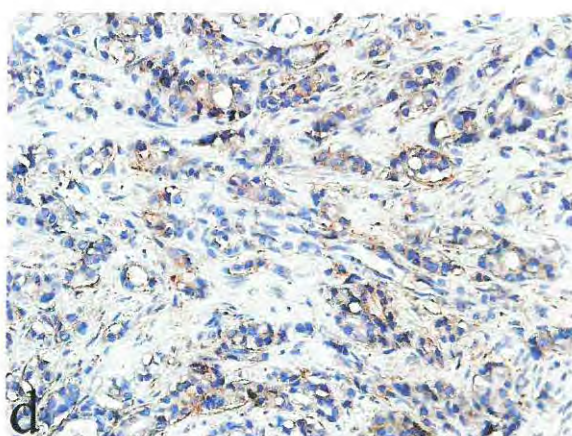
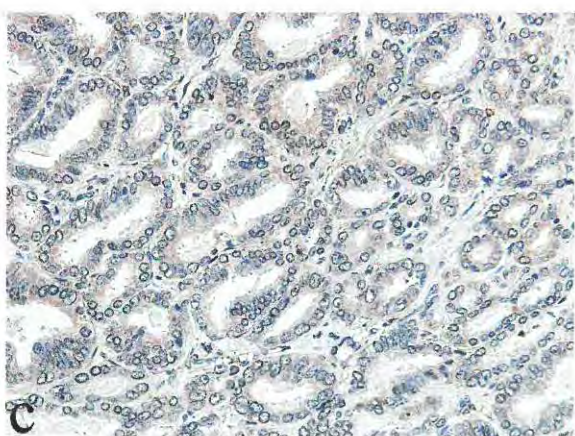
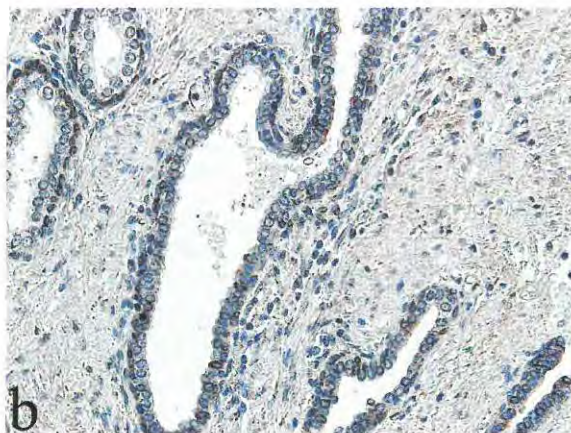
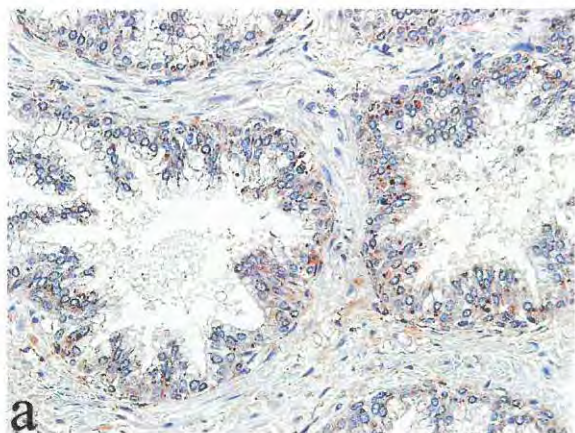
Slika 20. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMP-5. Tkivo normalne prostate (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



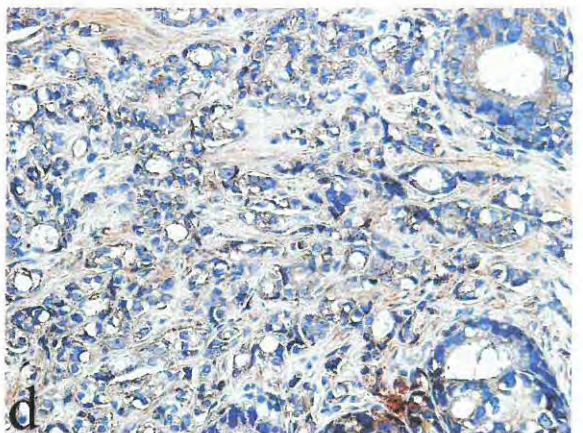
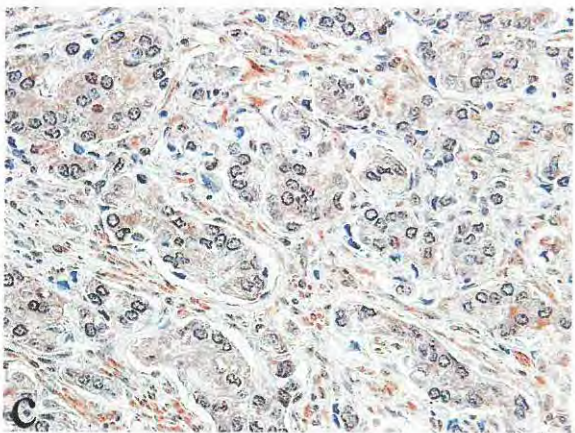
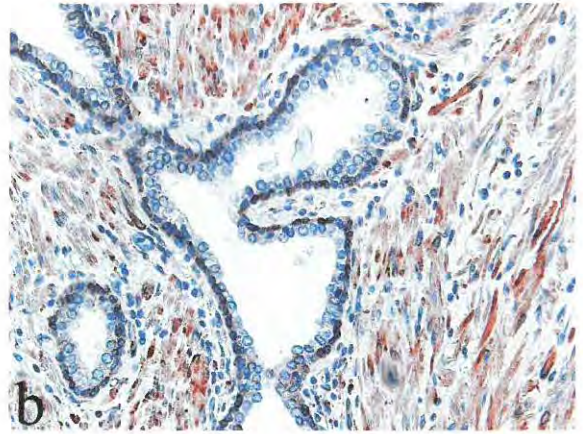
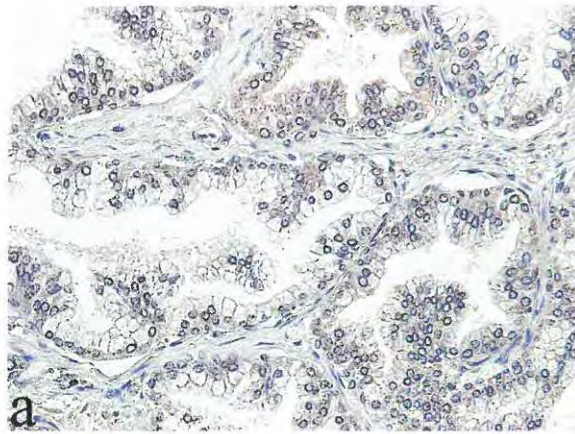
Slika 21. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMP-6. Tkivo normalne prostate (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



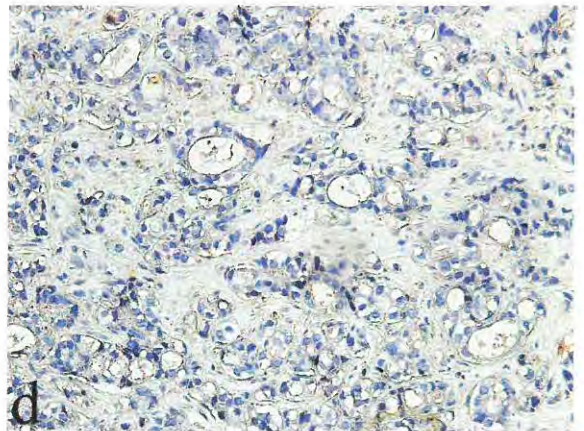
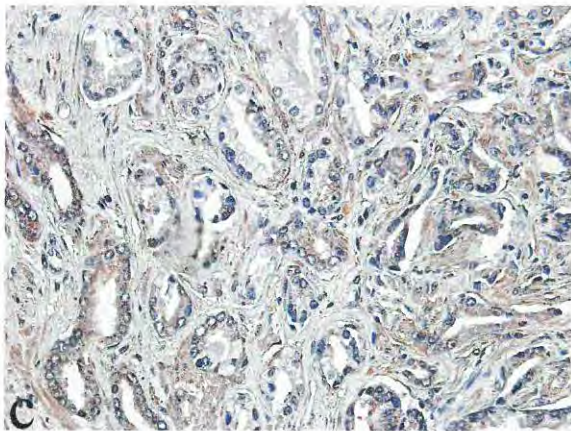
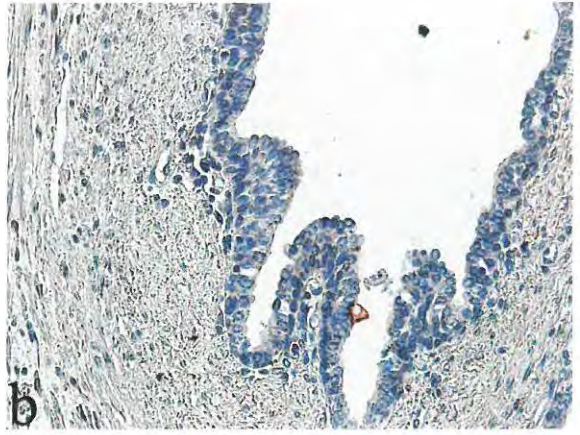
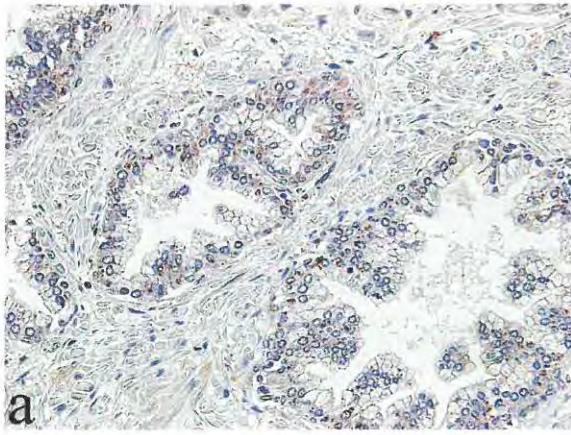
Slika 22. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMP-7. Tkivo normalne prostate-nuklearno bojanje (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



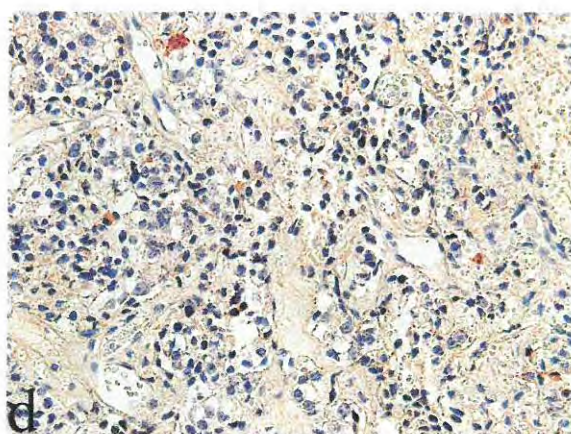
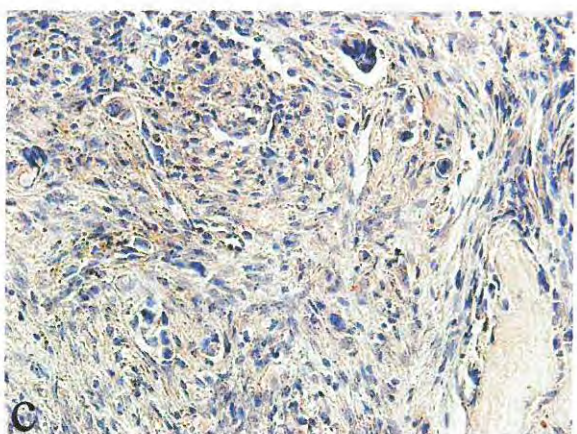
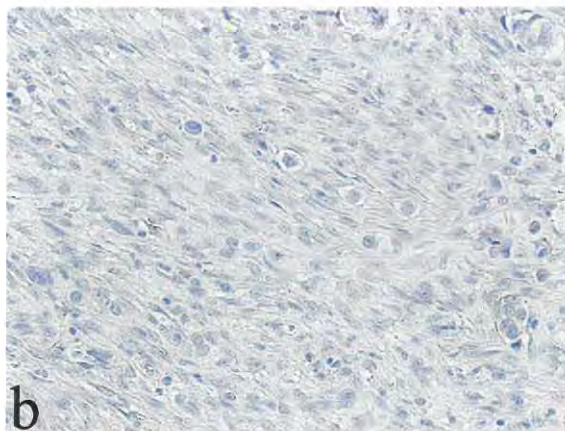
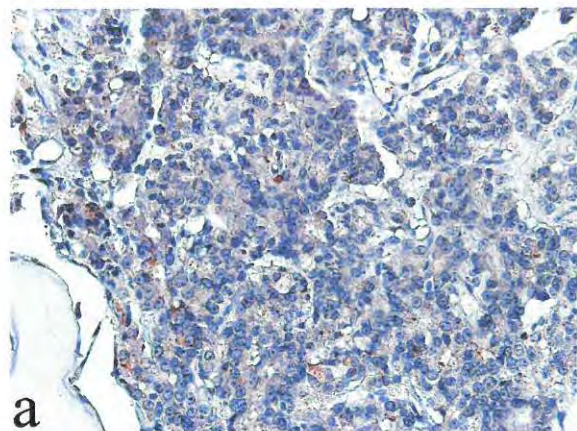
Slika 23. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMPR-IA. Tkivo normalne prostate (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



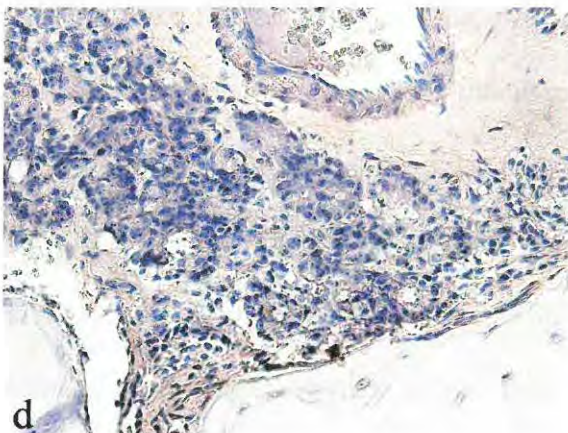
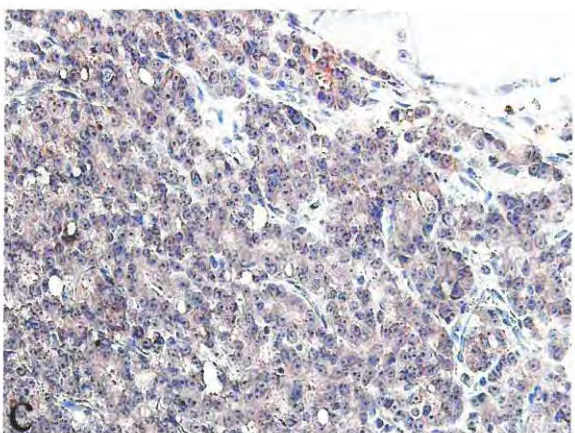
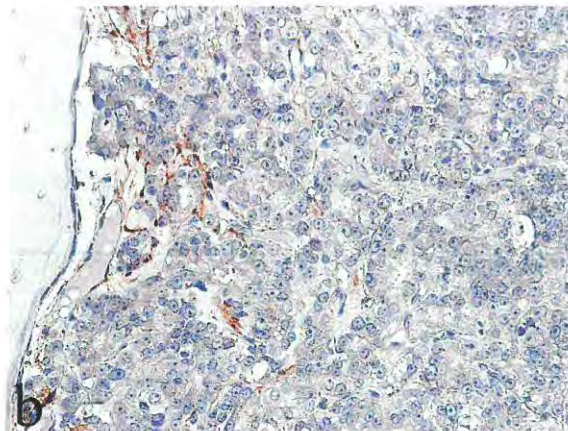
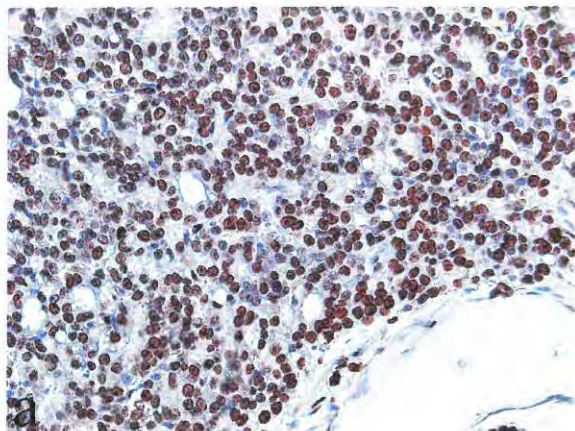
Slika 24. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMPR-IB. Tkivo normalne prostate (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



Slika 25. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMPR-II. Tkivo normalne prostate (a), benigne prostatične hiperplazije (b), karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza (c), karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (d). Povećanje 400x



Slika 26. Tkivo koštane metastaze karcinoma prostate. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMP-2/4 (a), BMP-3 (b), BMP-5 (c), BMP-6 (d). Povećanje 400x



Slika 27. Tkivo koštane metastaze karcinoma prostate. Imunohistokemijski prikaz ekspresije BMP-7 (a), BMPR-IA (b), BMPR-IB (c), BMPR-II (d). Povećanje 400x

5. RASPRAVA

Ranije smo napomenuli kako je širenje tumora u koštane strukture i otkrivanje ekspresije nekih koštanih morfogenetskih proteina u zdravom tkivu prostate kao i u tkivu karcinoma, navelo autore na hipotezu kako je to širenje kao i procesi stvaranja koštanog tkiva uvjetovano upravo osteoinduktivnim čimbenicima rasta. Postoji određen broj radova na tu temu koji stalno podržavaju navedenu hipotezu, ali to ničim nisu potvrdili ^{44, 45, 46, 47, 48, 52, 53, 54, 57, 60}. Rezultate je teško sumirati, jer nisu rađeni na istim uzorcima. Ono što svakako nedostaje u dosadašnjim studijama je detaljnija analiza ekspresije receptora za koštane morfogenetske proteine i eventualne promjene s obzirom na razvojni stadij tumora i koštanih metastaza. Ovako sistematična analiza pojavnosti čimbenika rasta i njihovih receptora, preko kojih djeluju, mogla bi pomoći u tumačenju patogeneze, kako primarnog karcinoma, tako i koštanih metastaza. Nadamo se kako bi mogla dati, barem, element važan za procjenu razvojnog stadija tumora i prognoze bolesti. Ovom smo studijom proveli detaljniju analizu ekspresije koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u patogenezi karcinoma prostate i u njegovim koštanim metastazama. Po prvi puta analizirali smo obrasce ekspresije receptora i samih koštanih morfogenetskih proteina u normalnom tkivu prostate, tkivu benigne hiperplazije, u tkivu karcinoma prostate s obzirom na stupanj diferencijacije tumora, te u tkivu pripadajućih koštanih metastaza. Pronašli smo odgovarajuće obrasce, tj. pravilnosti u ekspresiji koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora.

Naši rezultati pokazuju kako se ekspresija različitih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora između istovrsnih uzoraka uglavnom statistički značajno razlikuje ($p < 0.05$).

BMP-2/4 najjače je eksprimiran u žljezdanim stanicama normalne prostate ($87,77 \pm 11,42\%$ pozitivnih stanica). U uzorcima koštanih metastaza te karcinomu prostate

bez i s dokazanim koštanim metastazama uočili smo ekspresiju BMP-2/4 u velikom postotku stanica. Najmanji udio žljezdanih stanica koje ekspimiraju BMP-2/4 uočili smo u uzorcima benigne prostatične hiperplazije ($44,55 \pm 38,48\%$ pozitivnih stanica).

Ekspresija BMP-3 potpuno je negativna ($0,00 \pm 0,00\%$ pozitivnih stanica) u uzorcima normalne prostate i koštanih metastaza karcinoma prostate, dok je slaba u benignoj prostatičnoj hiperplaziji i tkivu karcinoma prostate.

BMP-5 ekspimiran je približno isto u uzorcima normalne prostate, benigno i maligno promijenjenoj prostati, te u uzorcima koštanih metastaza karcinoma prostate.

BMP-6 najslabije je ekspimiran u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($20,08 \pm 28,07\%$ pozitivnih stanica) i u normalnoj prostati ($34,51 \pm 12,95\%$ pozitivnih stanica), dok je nešto jače izražen u koštanim metastazama, benignoj prostatičnoj hiperplaziji i karcinomu prostate bez dokazanih koštanih metastaza.

Ekspresija BMP-7 izrazito je jaka i prisutna u svim stanicama koštanih metastaza karcinoma prostate ($100,00 \pm 0,00\%$ pozitivnih stanica). Jaku ekspresiju nalazimo i u tkivu normalne prostate ($94,63 \pm 0,89\%$ pozitivnih stanica). Usporedbom ekspresije BMP-7 u uzorcima tkiva karcinoma prostate s i bez dokazanih koštanih metastaza, uočili smo značajno manju ekspresiju u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($22,55 \pm 32,38\%$ pozitivnih stanica).

U tkivu normalne prostate ekspimirani su svi koštani morfogenetski proteini i njihovi receptori osim BMP-3.

U normalnoj prostati najjaču ekspresiju pokazuju BMP-7 ($94,63 \pm 0,89\%$ pozitivnih stanica) i BMP-2/4 ($87,77 \pm 11,42\%$ pozitivnih stanica)

U uzorcima tkiva benigne prostatične hiperplazije prisutna je ekspresija svih koštanih morfogenetskih proteina.

Benigna prostatična hiperplazija pokazuje najizrazitiju ekspresiju BMP-7 (57,36±37,36% pozitivnih stanica). Receptori za koštane morfogenetske proteine ekspimirani su podjednako, ali značajno slabije nego u normalnoj prostati.

Karcinom prostate bez dokazanih koštanih metastaza najjače ekspimirira BMP-2/4 i -7, što smo uočili i u uzorcima tkiva koštanih metastaza. U tkivu karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama najjača je ekspresija BMP-2/4, dok je izraženost ostalih koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora slabija.

Stanice koštanih metastaza karcinoma prostate najjače ekspimiraju BMP-7 (100% pozitivnih stanica) i BMP-2/4 (76,76±8,47% pozitivnih stanica).

Prvi radovi o ekspresiji koštanih morfogenetskih proteina u karcinomu prostate pokazali su ekspresiju BMP-1, -2, -3, -4, -5 i -6⁴⁴. U benignoj prostatičnoj hiperplaziji nije bilo ekspresije BMP-6, dok je njegova ekspresija zabilježena u oko 55% slučajeva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama^{44, 45, 46, 47}.

Stanice normalne prostate produciraju BMP -2, -4 i -6^{44, 45, 46, 47}. PC-3 stanična linija karcinomskih stanica prostate ima količinski sličnu produkciju spomenutih koštanih morfogenetskih proteina, dok je LNCaP stanična linija producirala značajno manje količine. PC-3 linija producirala je i veće količine BMP-3, dok su stanice normalne prostate i LNCaP linije producirale minimalne količine tog proteina⁴⁶. U eksperimentalnim životinjskim modelima LNCaP stanična linija češće je davala koštane metastaze⁴⁶.

Studija koja je proučavala ekspresiju BMP-6 u stanicama normalne prostate i karcinoma, pokazala je kako se pojačava njegova ekspresija u višem tumorskom gradusu (*Gleason score*)⁴¹. Naši rezultati pokazali su ekspresiju BMP-2/4,-5,-6 i -7 u žljezdanim stanicama uzoraka normalne prostate, a ne samo BMP-2/4 i -6⁴⁴.

Naše istraživanje pokazalo je kako su u 100% uzoraka normalne prostate ekspimirani s vi koštani morfogenetski proteini osim BMP-3, koji nije ekspimiran niti u jednom uzorku.

Slična je ekspresija i u uzorcima koštanih metastaza karcinoma prostate.

BMP-3 ne ekspimiraju uzorci normalne prostate niti koštanih metastaza, dok ga ekspimiraju podjednako mali broj uzoraka benigne prostatične hiperplazije te karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza.

BMP-2/4 i BMP-5 ekspimiraju gotovo jednak broj uzoraka tkiva normalne prostate, benigno i maligno alterirane prostate te samih koštanih metastaza.

BMP-6 i -7 ekspimiraju najmanji broj uzoraka tkiva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama (45%).

Prijašnje su analize pokazale kako je BMP-6 ekspimiran u oko 85% slučajeva svih uzoraka tkiva koštanih metastaza karcinoma prostate, dok je u samo 29% koštanih metastaza drugih tumora nađena ekspresija BMP-6⁵¹. U našem istraživanju BMP-6 je ekspimiran u svim uzorcima tkiva (100% slučajeva) koštanih metastaza karcinoma prostate, ali samo u 48,90±10,01% stanica.

Novija istraživanja pokazala su pojačanu ekspresiju BMP-7 u koštanim metastazama karcinoma prostate⁶⁰. Ekspresija BMP-7 nije zabilježena u koštanim metastazama karcinoma bubrega, mokraćnog mjehura i kože. Nije uočena razlika u jačini ekspresije između metastaza i primarnog sjedla karcinoma prostate⁶⁰.

Najnovija studija pokazala je kako je ekspresija BMP-7 androgen ovisna i opada s deplecijom muških spolnih hormona, a viša je u tkivu koštanih metastaza nego u normalnom koštanom tkivu^{56, 60}. Ekspresija BMP-7 otkrivena je u 91% uzoraka normalne prostate, u 64% *de novo* dijagnosticiranih slučajeva karcinoma prostate i u oko 30% lokalnih recidiva karcinoma^{56, 60}.

S razvojem i progresijom maligne bolesti ekspresija BMP-7 imala je tendenciju opadanja^{56, 60}. U našem istraživanju BMP-7 pokazao je najjaču ekspresiju u uzorcima tkiva koštanih metastaza (100% pozitivnih stanica) i u normalnoj prostati (94,6±0,89% pozitivnih stanica). Izrazitu ekspresiju BMP-7 uočili smo u tkivu benigne prostatične hiperplazije (57,86±37,36%

pozitivnih stanica) i karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza ($70,37 \pm 27,05\%$ pozitivnih stanica). Najslabija ekspresija BMP-7 bila je u uzorcima tkiva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama ($22,55 \pm 32,38\%$ pozitivnih stanica).

Naši rezultati pokazuju kako su u žljezdanim stanicama normalne prostate izražena sva tri tipa receptora, specifična za djelovanje ispitivanih koštanih morfogenetskih proteina. U benignoj prostatičnoj hiperplaziji ekspresija receptora za koštane morfogenetske proteine značajno se smanjuje u odnosu na normalnu prostatu. Izrazitije smanjenje ekspresije receptora uočili smo u uzorcima tkiva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama. Posebice se smanjuje ekspresija receptora tipa BMPR-IA ($20,48 \pm 31,18\%$ pozitivnih stanica) i BMPR-II ($5,59 \pm 17,46\%$ pozitivnih stanica). U tkivu karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza smanjuje se ekspresija BMPR-IA, dok je ekspresija ostalih tipova receptora ista kao u normalnoj prostati. U tkivu koštanih metastaza karcinoma prostate pronašli smo ekspresiju sva tri tipa receptora. Uspoređujući uzorke koštanih metastaza karcinoma prostate i normalne prostate uočili smo, kako se značajno povećao udio stanica koje ekspimiraju BMPR-IB, dok se značajno smanjila ekspresija receptora tipa BMPR-II.

BMPR-IA najjače je ekspimiran u uzorcima normalne prostate ($70,52 \pm 18,25\%$ pozitivnih stanica), a najslabije u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama ($20,48 \pm 31,18\%$ pozitivnih stanica).

Ekspresija receptora tipa BMPR-IB najizrazitija je u koštanim metastazama ($95,24 \pm 9,51\%$ pozitivnih stanica), a najslabija u benignoj prostatičnoj hiperplaziji ($36,10 \pm 39,93\%$ pozitivnih stanica), dok ekspresija u uzorcima normalne prostate i karcinoma prostate nije statistički značajno različita.

Nova istraživanja pokazala su kako je gubitak ekspresije receptora za koštane morfogenetske proteine u karcinomu prostate udružen s visokim patohistološkim gradusom, povećanom incidencijom recidiva i smanjenim preživljenjem, tj. ekspresija receptora za

koštane morfogenetske proteine u stanicama karcinoma prostate korelira s patohistološkim gradusom (*Gleason score*). Naime, viši gradusi imaju slabiju, do u cijelosti odsutnu, ekspresiju receptora ^{58, 59, 62}. Naša studija pokazala je sličan obrazac ekspresije receptora za koštane morfogenetske proteine, a to se posebice odnosi na receptor tipa BMPR-II.

BMPR-II podjednako je dobro eksprimiran u uzorcima tkiva normalne prostate, benigne prostatične hiperplazije i karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza, dok je najslabije eksprimiran u tkivu karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama ($5,59 \pm 17,46\%$ pozitivnih stanica) i u stanicama samih koštanih metastaza ($16,40 \pm 11,79\%$ pozitivnih stanica).

Već smo spomenuli kako normalna prostata u odraslih ljudi ne raste brzo te nije za očekivati obilje čimbenika rasta u samom tkivu prostate, no ipak u velikom broju slučajeva u normalnoj odrasloj prostati prisutna je visoka razina čimbenika rasta. Pretpostavlja se kako mnogi od čimbenika rasta koji se nalaze u tkivu prostate zapravo nisu aktivni jer su sekvestrirani vezom za strukture ekstracelularnog matriksa, kao što je heparan, tj. heparan-sulfat. Učinak faktora rasta najvećim dijelom ovisi o mehanizmima vezanja i otpuštanja od komponenti ekstracelularnog matriksa ². Mjerenjem količine faktora rasta u prostati ne dobiva se njihova stvarna biološka aktivnost. U svim tipovima rasta, pa tako i u rastu prostate, postoje elementi koji ga potiču i oni koji ga usporavaju. Najvažniji supresorski element u prostati je upravo ekstracelularni matriks zbog svoje sposobnosti vezanja i inhibicije brojnih čimbenika rasta ^{2, 3, 4}. Valja napomenuti kako stromalne i epitelne stanice prostate mogu sintetizirati i reagirati na brojne čimbenike rasta, a mnogi od njih su pod hormonalnom kontrolom posebice androgena i estrogena. Androgeni i čimbenici rasta mogu stimulirati sintezu i degradaciju komponenti ekstracelularnog matriksa, mijenjajući na taj način i stanični odgovor na stimulaciju steroidima i čimbenicima rasta. Stoga je interakcija između steroida,

čimbenika rasta, ekstracelularnog matriksa i samih stanica dinamičan proces koji može imati bilo pozitivne, bilo negativne učinke u regulaciji rasta prostate^{2,3,4}.

Naši rezultati pokazuju kako stanice uzoraka tkiva normalne prostate eksprimiraju BMP-2/4, -5, -6, -7 i receptore tipa BMPR-IA, -IB i II, ali ne eksprimiraju BMP-3. Iz literature je poznato kako koštani morfogenetski proteini igraju ključnu ulogu u razvoju skeleta i stvaranju kosti, ali prema zadnjim istraživanjima oni su ubikvitarni i imaju važnu ulogu u embrionalnom razvoju brojnih organskih sustava^{17, 19, 20, 21, 22}. Najveću osteogenu aktivnost na osteoblastičnim progenitorskim staničnim linijama imaju BMP-2, -6, i -9 dok BMP-3 nema osteogenu aktivnost već antagonizira djelovanje BMP-2, -4, -6, -7 i -9^{23,24,25}.

BMP-6 je jedan od važnijih osteogenih proteina^{17, 23}. Njegova ekspresija tijekom embrionalnog razvoja u bliskoj je vezi s ekspresijom BMP-2^{17,20}. Pokazalo se kako potiče intramembranoznu i enhondralnu osifikaciju. BMP-2 ima snažnu osteogenu aktivnost potičući osteoblastične progenitorske stanice, dok je BMP-7 pokazao jači utjecaj na zrele osteoblaste^{17, 23}. Možemo pretpostaviti kako najjači i najpotpuniji osteoinduktivni učinak koštani morfogenetski proteini ostvaruju sinergističkim djelovanjem^{17,22,23}.

Deplecija BMP-7 tijekom embrionalnog razvoja uzrokuje teška oštećenja bubrega, oka te defekte rebra, lubanje i ekstremiteta^{17, 26, 27, 30}. BMP-4 sudjeluje u morfogenezi plućnog epitela, a poremećaj u njegovoj ekspresiji dovodi do razvoja malih pluća s nedostatnom funkcijom pri porodu^{17,20}.

Pojačana ekspresija BMP-6 tijekom razvoja epidermisa dovodi do nastanka lezija sličnih psorijazi¹⁷. Otkriveno je kako koštani morfogenetski proteini sudjeluju u razvoju središnjeg živčanog sustava, a *in vitro* induciraju neuronalnu diferencijaciju^{17, 20}. Nedostatak BMP-8 dovodi do defekta u građi placente i spermatogenezi¹⁷.

Nedavno je dokazano kako je nastanak interdigitalnih prostora kontroliran koštanim morfogogenetskim proteinima putem apoptoze mezenhimalnih stanica¹⁷. Koštani morfogogenetski proteini mogu mijenjati fenotip nekih stanica (mišićne i masne) u osteoblastične^{17, 19, 22, 29, 30}.

Uloga je koštanih morfogogenetskih proteina u normalnoj prostati, za sada, nepoznata, ali možemo pretpostaviti, s obzirom na obrazac ekspresije posebice receptora (ekspimirani su podjednako svi), kako djeluju u parakrinoj i autokrinoj signalizaciji i kontroli rasta prostate.

Naime, koštani morfogogenetski proteini djeluju putem receptora^{31, 32}. Transdukcija signala identična je onoj TGF- β signaliranju. Oni ostvaruju svoj učinak u interakciji s heteromernim kompleksom membranskih receptora tipa I i II. Vezanjem liganda (BMP) aktivira se receptor tipa I (BMPR-I) i to ukriženom fosforilacijom putem receptora tipa II (BMPR-II)^{31, 32}. Receptor tipa I je odgovoran za daljnje prenošenje signala^{31, 32}.

Postoje tri vrste receptora tipa I: Act-RI, BMPR-IA i BMPR-IB; također i tri vrste tipa II: Act-RII, Act-RIIB i BMPR-II^{31, 32}. Koštani morfogogenetski proteini vežu se uglavnom za receptore tipa BMPR-IA, -IB i -II, dok ostali spomenuti receptorski tipovi služe vezivanju aktina i njima sličnih molekula pripadnika TGF- β nadobitelji^{31, 32}.

In vitro eksperimenti pokazali su kako se svi koštani morfogogenetski proteini članovi TGF- β nadobitelji vežu na receptor tipa II u kombinaciji bilo s tipom IA ili IB^{31, 32}. Signal se dalje prenosi intracelularno putem skupine proteina koje zovemo SMAD. Oni aktiviraju specifične gene^{31, 32}. Receptori za koštane morfogogenetske proteine su strukturalno gledano serin-treonin kinaze^{31, 32}. Tip I i tip II receptora mogu vezati ligande samostalno, ali je vezanje značajno olakšano kada su istovremeno nazočni u kombinaciji^{31, 32}. Aktivacijom receptora tipa I dolazi do fosforilacije SMAD -1, -5 i -8 proteina te njihovog vezanja sa «zajedničkim partnerom» SMAD-4. Na taj način stvara se kompleks SMAD proteina koji se nakuplja u jezgri gdje regulira transkripcijski proces ciljanih gena^{31, 32}. SMAD -1 i -2 na sličan način prenose signal TGF- β i aktivina. SMAD -6 i -7 ometaju BMP signaliranje vezivanjem za BMPR-II receptor i

onemogućuju fosforilaciju SMAD -1 proteina^{31, 32}. Postoje i drugi signalni putevi koštanih morfogogenetskih proteina osim onog posredovanog SMAD proteinima. Koštani morfogogenetski proteini mogu aktivirati različite kinaze: MAPK, ERK i p38^{31, 32}.

Aktivacija p38 putem BMP receptora zahtijeva nazočnost TAK1, XIAP i TAB1 molekula³². Postoji međudjelovanje između SMAD i p38 aktivacijskog puta, što je potvrđeno činjenicom kako SMAD -6 inhibira SMAD -1 ali i p38 aktivaciju vežući se za TAK1 molekulu³².

Najnovija istraživanja su pokazala kako vezivanjem koštanih morfogogenetskih proteina za preformirani receptorski kompleks koji se sastoji od receptora tipa I i II, dolazi do SMAD aktivacije³². Međutim, vezivanjem za monomerni receptor tipa I visokog afiniteta, dolazi do homodimerizacije receptora, a nakon toga do stvaranja kompleksa s receptorom tipa II³².

Ovaj kompleks (BISC - BMP inducirani signalni kompleks) rezultira SMAD neovisnom aktivacijom p38 signalnog puta.

Smatra se kako ekspresija receptora tipa II utječe na strukturu i organizaciju receptora tipa I povećavajući njihov afinitet za stvaranje klastera i preformiranih receptorskih kompleksa i to upravo na onim dijelovima stanične membrane gdje je SMAD signaliranje najefikasnije³².

Dakle, nema adekvatnog BMP – signaliranja bez prisutnosti receptora tipa II i IA, ili IB.

Odsutnost ekspresije BMP-3 u uzorcima tkiva normalne prostate i koštanih metastaza karcinoma prostate, valja promatrati u sklopu njegove inhibitorne uloge. Naime, poznato je kako pojedine molekule BMP-a mogu inhibirati djelovanje drugih. Najzastupljeniji BMP u koštanom matriksu je BMP -3. On inducira osteogenu diferencijaciju ali ujedno i inhibira djelovanje osteoinduktivnih BMP -2, -4, -6 i -7³¹.

U našoj studiji uočili smo ekspresiju BMP -2/4, -3, -6, -7, te receptora tipa BMPR-IA, -IB i -II u stromi prostate. Stromalnu ulogu koštanih morfogogenetskih proteina valja promatrati u sklopu stromalno-epitelne interakcije. Naime, ranije smo naveli kako postoji dinamičan i recipročni odnos funkcije stromalnih i epitelnih stanica. Međusobne interakcije najvećim

dijelom ovise o prostornoj organizaciji elemenata ekstracelularnog matriksa koji tvore vezu s bazalnom membranom^{2, 8, 9}. Ta veza predstavlja filter i dvosmjerni parakrini komunikacijski put između dva stanična odjeljka. Hormoni, plinovi, čimbenici rasta i hranjive tvari dolaze do prostate putem krvi i prolaze najprije kroz stromu, tj. ekstracelularni matriks i bazalnu membranu kako bi došli do epitelnih stanica. Rano, tijekom razvoja, funkcija epitelnih i stromalnih elemenata mijenja se ovisno o međusobnim interakcijama, stoga integrirana biologija ovih dvaju sustava kao i njihova dinamika tijekom starenja igraju ključnu ulogu u funkciji prostate kao žlijezde^{2, 3, 4, 8}. Upravo poremećaj ovih tkivnih interakcija predstavlja početak abnormalnog rasta prostate, koji počinje već vrlo rano tijekom života, otprilike neposredno nakon vremena maksimalne virilizacije, tj. oko 25-te godine^{2, 3, 4, 5, 8, 9}. Prve se primjećuju promjene u svojstvima i organizaciji stromalno-epitelnih elemenata, a započinju kao kaskada patoloških procesa koji se manifestiraju kao displazija, atipija, atrofija i hiperplazija kako epitelnih, tako i stromalnih komponenti^{2, 3, 4, 5, 8, 9}. Starenjem te najranije promjene postupno prelaze u ranu benignu prostatičnu hiperplaziju pa u intraepitelijalnu neoplaziju (PIN) i zaključno u različite tipove prostatičnog adenokarcinoma. Za sada još nije poznato koliko su tijesno povezane narečene patološke promjene^{2, 3, 4, 5, 8, 9}. Poznato je kako ekstracelularni matriks ima važnu induktivnu ulogu tijekom razvoja i diferencijacije brojnih staničnih tipova, a također ima važnu ulogu u kontroli rada samih stanica^{2, 3, 4, 5, 8, 9}.

Uzorci tkiva benigne prostatične hiperplazije eksprimiraju značajno slabije od normalne BMP-2/4 (44,55±38,48% pozitivnih stanica) i BMP-7 (57,36±37,36% pozitivnih stanica), što može govoriti u prilog njihovoj inhibitornoj ulozi u nastanku hiperplazije. U tom svjetlu valja promatrati i značajno slabiju ekspresiju receptora koštanih morfogenetskih proteina u benignoj prostatičnoj hiperplaziji u odnosu na normalnu prostatu. Naime, postoje različite pretpostavke o tome kako dolazi do gubitka normalnog obrasca ponašanja prostatičnih stanica i razvoja benigne hiperplazije, ali isto tako i maligne transformacije

epitela. Očito je kako starenjem promjene zahvaćaju prostatično tkivo na više nivoa. Starenjem dolazi do bržeg propadanja sekretornih stanica, a bazalne stanice su spriječene u diferencijaciji prema sekretornim stanicama zadržavajući proliferacijsku sposobnost. Za to je djelomično odgovoran relativni porast estrogena u starijoj životnoj dobi, ali i promjene koje zahvaćaju stromalno-epitelne interakcije (promjene u sastavu ekstracelularnog matriksa, bazalne membrane te ekspresiji receptora za adhezijske molekule)^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Dokaz kako dolazi do smanjenja broja sekretornih stanica je i smanjena prostatična sekrecija u starijoj životnoj dobi. Za rast i bujanje kako stromalnih tako i bazalnih stanica nužna je prisutnost androgena, ali i drugih čimbenika rasta čija uloga nije do kraja razjašnjena^{3, 4, 5, 7, 8, 9}. Često se u tumorskom rastu i progresiji događaju mutacije koje imaju za posljedicu pojačanu ekspresiju raznih receptora, posebice za hormone i čimbenike rasta^{3, 4, 5}. Uočena je tako pojačana aktivacija i ekspresija androgenih receptora u hormon neovisnih slučajeva karcinoma prostate, dok je hiperekspresija AR rijetka pojava u početnim stadijima bolesti i lokaliziranim tumorima^{3, 4, 5}. U karcinomu prostate eksprimirani su TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, kao i njihovi receptori, i mogu suprimirati imunološki sustav, poticati angiogenezu i stvaranje ekstracelularnog matriksa te povećati motilitet stanica^{3, 4, 5}. Na taj način pospješuju progresiju samog karcinoma. Povišena je i produkcija ED-1, posebice u karcinomu prostate s koštanim metastazama, koji djeluje kao mitogen na stanice karcinoma *in vitro*, također povećava aktivnost alkalne fosfataze u novostvorenoj kosti^{3, 4, 5}. Uočena je i hiperekspresija TGF-α, fibroblastnih čimbenika rasta te koštanih morfogenetskih proteina^{3, 4, 5}.

Naše istraživanje je pokazalo kako u karcinomu prostate bez dokazanih koštanih metastaza dolazi do značajnog porasta ekspresije BMP-2/4, -7 i svih receptora za koštane morfogenetske proteine.

Značajno smanjenje ekspresije BMP-6 i -7, te receptora koštanih morfogenetskih proteina, a posebice BMPR-II, uočena je u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama.

Ovakav obrazac ekspresije koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora govori u prilog potpunog gubitka normalnog BMP-signaliranja, što uz depleciju njihove inhibicijske uloge vjerojatno omogućava i pospješuje metastaziranje. Zato, kao potencijalne markere, koji ukazuju na postojanje koštanih metastaza, valja izdvojiti smanjenu ekspresiju BMP-6, i -7, a posebice gotovo potpuni gubitak ekspresije receptora koštanih morfogenetskih proteina tipa BMPR-II.

Naime, već smo rekli kako neki koštani morfogenetski proteini mogu u određenim uvjetima inhibirati proliferaciju stanica karcinoma prostate, a gubitak ekspresije njihovih receptora može predstavljati način na koji stanice karcinoma prostate postaju rezistentne na inhibitorno djelovanje BMP-a^{54, 57, 58, 59}. Nova istraživanja pokazala su kako je gubitak ekspresije receptora za koštane morfogenetske proteine u karcinomu prostate udružen s visokim patohistološkim gradusom, povećanom incidencijom recidiva i smanjenim preživljenjem^{58, 59, 62}.

Stanične linije karcinoma prostate LNCaP, DU-145, PC3 i PC3M su inhibirane na dozno ovisan način koštanim morfogenetskim proteinom -6^{57, 59}. Ove četiri stanične linije ekspimiraju receptore tipa BMPR-IA, -IB i BMPR-II. Kada se u stanice linije PC3M ubaci gen za sintezu inaktivnog receptora tipa BMPR-II (BMPR-IIDN), BMP-6 više nije sposoban inhibirati njihovu proliferaciju, a tumorogenost samih stanica se povećala^{57, 59}. Možemo zaključiti kako bi gubitak ekspresije receptora tipa BMPR-II mogao poslužiti kao prognostički čimbenik u pacijenata s karcinomom prostate^{57, 59}.

Gubitak BMP - signaliranja u stanicama karcinoma prostate može biti uzrokom tumorske progresije. Koštani morfogenetski proteini mogu inhibirati proliferaciju i inducirati apoptozu stanica želučanog, bubrežnog i plućnog karcinoma, te mijeloma^{59, 63, 64}.

U karcinomu prostate uočene su i višestruke mutacije gena za receptor tipa BMPR-II, a alterirano BMP signaliranje može omogućiti preživljenje i proliferaciju stanica karcinoma prostate u kosti ^{59, 65}.

U našoj studiji BMP-3 je uglavnom izrazito slabo eksprimiran u svim grupama uzoraka. Možemo zaključiti kako BMP-3 ne igra, kao čimbenik, nikakvu ulogu u procesima važnim za kontrolu rasta prostate.

BMP-2/4 eksprimiran je dobro u svim grupama uzoraka, a posebice u normalnoj prostati, iz čega možemo zaključiti kako ima važnu ulogu u rastu i preživljavanju prostatičnih stanica.

Ne smijemo zaboraviti kako učinak koštanih morfogenetskih proteina na stanice prostate često ovisi i o interakciji s drugim čimbenicima. Naime, istraživana je i regulacija rasta stanica karcinoma prostate putem BMP-2, koji u odsutnosti androgena stimulira, a u prisutnosti androgena inhibira proliferaciju LNCaP stanične linije ⁵³. Ova pojava povezuje se s androgen ovisnom ekspresijom receptora za koštane morfogenetske proteine ⁵³.

Stanice uzoraka koštanih metastaza karcinoma prostate u našoj studiji jasno i intenzivno eksprimiraju osteoinduktivne koštane morfogenetske proteine:

- BMP-7 (100% pozitivnih stanica),
- BMP-2/4 (76,76±8,47% pozitivnih stanica),
- BMP-5 (52,14±22,71% pozitivnih stanica) te
- BMP-6 (48,90±10,01% pozitivnih stanica).

Ne eksprimiraju BMP-3 (0% pozitivnih stanica).

BMP-7, - 2/4, -5 i -6 imaju dokazano osteoinduktivno djelovanje *in vitro* i *in vivo* ^{13, 15} te njihovim djelovanjem na okolno koštano tkivo zasigurno dolazi do stimulacije osteoblasta i stvaranja nove kosti. U tom procesu važna je i neekspresija BMP-3, kao inhibitora osteoinduktivnih koštanih morfogenetskih proteina ^{13, 15}.

Prvi put do sada, naša studija je pokazala izrazito smanjenu ekspresiju receptora tipa BMPR-II ($16,40 \pm 11,70\%$ pozitivnih stanica) u tkivu koštanih metastaza karcinoma prostate. Promatrajući udio pozitivnih uzoraka tkiva koštanih metastaza karcinoma prostate vidimo kako 50% uzoraka eksprimira receptor tipa BMPR-II. Samo 10 % uzoraka karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama eksprimira receptor tipa II, a receptor tipa BMPR-IA eksprimira 40 %, te receptor tipa BMPR-IB 75% uzoraka tkiva.

Prije smo napomenuli kako je mehanizam djelovanja ovih proteina složen³¹. Radi se o dimernim proteinskim molekulama koje često tvore heteromere^{31, 32}. Primjerice, dimer se može sastojati od jedne podjedinice BMP-2 i druge od BMP-7. Djelovanje ostvaruju putem receptora^{31, 32}. Transdukcija signala identična je onoj TGF- β signaliranju. Naime, oni ostavljaju svoj učinak u interakciji s heteromernim kompleksom membranskih receptora tipa I i II. Vežanjem liganda (BMP) aktivira se receptor tipa I (BMPR-I) i to ukriženom fosforilacijom putem receptora tipa II (BMPR-II)^{31, 32}. Receptor tipa I je odgovoran za daljnje prenošenje signala^{31, 32}.

In vitro eksperimenti pokazali su kako se svi koštani morfogenetski proteini članovi TGF- β nadobitelji vežu na receptor tipa II u kombinaciji bilo s tipom IA ili IB^{31, 32}.

Možemo zaključiti kako bez istovremene ekspresije BMPR-II i BMPR-IA ili IB nema učinkovitog BMP signaliranja u dotičnih stanica. Koštani morfogenetski proteini, dakle, nemaju učinka na stanice koštanih metastaza karcinoma prostate, ali zato mogu djelovati na okolne osteoblaste i osteoklaste.

Slaba ekspresija receptora tipa BMPR-II važna je za progresiju koštanih metastaza, zbog izostanka inhibitornog učinka koštanih morfogenetskih proteina na same stanice metastaza¹⁷. Rastom metastaza u kosti dolazi do oslobađanja brojnih čimbenika iz koštanog matriksa, pa tako i koštanih morfogenetskih proteina¹⁷.

Dosadašnje spoznaje pokazuju koliko je biologija tumorskog nastanka i napredovanja složena, a veliki je broj interakcija na molekularnoj razini koji olakšavaju diseminaciju primarnog tumora^{34,35}. U koštanom metastaziranju ključni su procesi koji omogućuju prodor tumorskih stanica kroz ekstracelularni matriks, potom ulazak u sistemske cirkulacije, te procesi koji omogućuju implantaciju uz destrukciju ili stvaranje nove kosti^{34,35}.

Tumorski i metastatski rast posljedica su sposobnosti tumorskih stanica, da u interakcijama sa stanicama koje ih okružuju koriste čimbenike iz okoline u poticanju vlastitog rasta i umnožavanja^{34,35,36,37,38,39}. Priroda koštanih metastaza se razlikuje ovisno o tome koja je vrsta koštanih stanica stimulirana: osteoblasti ili osteoklasti³⁴.

Prodiranje tumorskih stanica u ekstracelularni matriks, ulazak i izlazak iz vaskularnih struktura zahtijeva adheziju, tj. vezivanje sa specifičnim glikoproteinima matriksa. Takvo vezivanje omogućeno je serijom integrinskih receptora na površini tumorskih stanica^{34,35,36,37,38,39}. Postoji više od 20 subtipova integrina. Radi se o $\alpha\beta$ heterodimernim receptorima.

Brojni autori su izvijestili kako pojačana ekspresija integrina povećava metastatski potencijal tumora^{34,35,36,37,38,39}.

Koštani ekstracelularni matriks bogat je lamininom, kolagenom tipa I, osteopontinom i fibronektinom, a upravo $\beta 1$ podjedinica integrina specifično veže narečene molekule koštanog matriksa i eksprimirana je često u tumorima koji daju koštane metastaze³⁴.

Receptor za kolagen eksprimiran je u brojnim tumorima, što djelomično objašnjava činjenicu kako je kost često ciljno tkivo brojnih metastaza^{34,35,36,37,38,39}.

Stanice karcinoma prostate pokazuju visoki adhezijski afinitet prema endotelnim stanicama u koštanoj srži^{34,40,41}.

Tumorske stanice sposobne su lučiti i potaknuti lučenje proteolitičkih enzima s ciljem razgradnje ekstracelularnog matriksa, olakšavajući invaziju^{34,35,36,37,38,39}. Poznata je uloga u metastaziranju serinskih proteaza: urokinaze, aktivatora plazminogena, elastaze, plazmina,

katapsina G, cisteinskih proteaza, aspartat proteaza i matriks metaloproteinaza (MMP). Ove posljednje posebno su važne u razgradnji kolagena, a njihova produkcija regulirana je čimbenicima rasta, hormonima, upalnim citokinima i onkoproteinima ³⁴. Kolagen tipa IV razgrađuju MMP-9 i -12, a stanice karcinoma prostate izlučuju MMP-1, koja razgrađuje kolagen tipa I ³⁴.

Razgradnjom ekstracelularnog matriksa oslobađaju se brojni čimbenici rasta (TGF- β , PDGF, IGF-1, -2, FGF i koštani morfogogenetski proteini) koji mogu pospješiti proces metastaziranja ^{34, 35, 36, 37, 38, 39}.

Stanice karcinoma prostate produciraju TGF- β koji je snažan osteoinduktivni čimbenik *in vivo*. Proizvode i FGF, koji se pokazao kao stimulator osteoblastne proliferacije. Intenzivna je i proizvodnja endotelina-1, te koštanih morfogogenetskih proteina ⁴².

Endotelin-1 snažan je mitogen za stanice karcinoma prostate, a njegova aktivnost je posredovana pojačanom produkcijom IGF-1, -2, PDGF i epidermalnim čimbenikom rasta ⁴¹.

Endotelin-1 snažan je vazokonstriktor i djeluje preko ET_A i ET_B receptora. Otkriven je u osteocitima, osteoblastima, osteoklastima i vaskularnim endotelnim stanicama ⁴¹. On stimulira mitozu osteoblasta i pojačava učinak drugih osteoinduktivnih čimbenika, kao što je BMP-7 ⁴¹.

Stimulira transport fosfata i produkciju osteopontina, osteokalcina i matriks metaloproteinaza ⁴¹.

Spriječavanje gubitka, tj. smanjenje ekspresije receptora tipa BMPR-II moglo bi spriječiti nastanak koštanih metastaza. Inhibicijom djelovanja osteoinduktivnih koštanih morfogogenetskih proteina (BMP-2/4, -5, -6 i -7) na osteoblaste i osteoklaste mogao bi se spriječiti rast i napredovanje osteoblastičnih koštanih metastaza.

Naime, postoje proteini koji vezivanjem za koštane morfogogenetske proteine reguliraju njihovu funkciju ^{31, 32}. Inhibicija BMP signaliranja zbiva se na više razina, višestrukim mehanizmima: intracelularno (pomoću inhibitornih SMAD, SMURF i SANE proteina), na

samoj membrani (inhibicija pseudoreceptorom BAMBI/nma) i ekstracelularno (antagonisti i inhibitori koštanih morfogenetskih proteina)^{31,33}.

NOGGIN se veže za molekule BMP -2 i -4 visokim afinitetom i sprječava njihovo vezanje za receptore³³. Chordin djeluje na sličan način. Oba inhibiraju i druge članove BMP obitelji, ali nešto slabijim afinitetom. Fallistatin se veže i inhibira BMP -4 i -7. Noviji inhibitori su Cerebrens i Gremlin³³.

U prilog do sada iznesenim tvrdnjama govori i udio uzoraka koji eksprimiraju koštane morfogenetske proteine i njihove receptore. Svi uzorci (100%) tkiva normalne prostate i koštanih metastaza eksprimiraju sve ispitivane koštane morfogenetske proteine, osim BMP-3, kojeg ne eksprimira niti jedan uzorak. Nagli pad pozitivnih uzoraka primijećujemo u karcinomu prostate s dokazanim koštanim metastazama, što se posebice odnosi na BMP-6 (45% pozitivnih uzoraka) i BMP-7 (45% pozitivnih uzoraka). Slično je i s ekspresijom receptora koštanih morfogenetskih proteina, posebice receptora tipa IA (40% pozitivnih uzoraka) i II (10% pozitivnih uzoraka).

U našoj studiji usporedili smo karcinom prostate bez dokazanih koštanih metastaza i karcinom prostate s dokazanim koštanim metastazama prema razini ukupnog, serumskog prostatičnog, specifičnog antigena (PSA) i patohistološkom gradusu (*Gleason score*).

U karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza patohistološki gradus i PSA značajno su niži od onih u karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama.

Vrijednosti patohistološkog gradusa u karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza kreću se u rasponu od 2 do 5, dok su u karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama između 4 i 7.

Razina ukupnog, serumskog PSA u karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza iznosi između 4,8 i 19,1 ng/ml, a u karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama je između 28,5 i 500 ng/ml.

Ovakav odnos između ove dvije skupine u skladu je s literaturnim podacima^{5, 11}. Ove dvije grupe statistički se značajno razlikuju ($p < 0.05$) u razini ukupnog serumskog PSA i patohistološkom gradusu, a različiti su im i obrasci ekspresije koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora.

Možemo zaključiti kako ekspresija koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora ovisi o patohistološkom gradusu, tj. o razini PSA. S porastom patohistološkog gradusa i PSA došlo je do smanjenja ekspresije BMP-6, -7, BMPR-IA i posebice BMPR-II.

U svim našim slučajevima karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama razina ukupne, serumske, alkalne fosfataze bila je viša od normale (30-120 U/l) i kretala se od 131 do 1016 U/l.

Radiološki su sve dokazane koštane metastaze imale osteosklerotični izgled, a u svih 10 uzoraka tkiva koštanih metastaza osteoblastičnost je potvrđena i histološki.

Iz dostupne literature vidimo kako postoje, donekle dva, različita razmišljanja o ulozi koštanih morfogenetskih proteina. Veliki broj dosadašnjih studija pokazao je postojanje ekspresije različitih koštanih morfogenetskih proteina u tkivu normalne prostate, u adenomu te u karcinomu i u samim koštanim metastazama karcinoma prostate i time su pokušali objasniti metastaziranje karcinoma prostate uglavnom u kost s osteoblastičnim tipom koštanih metastaza^{44, 45, 46, 47, 48, 52, 53, 54, 57, 60}. Najnovije studije pokazale su gubitak ekspresije receptora za koštane morfogenetske proteine s porastom patohistološkog gradusa karcinoma prostate, što može upućivati na inhibitornu ulogu samih koštanih morfogenetskih proteina u tumorskom bujanju^{58, 59}. No, mi smo prvi puta proučili obrazac ekspresije receptora koštanih morfogenetskih proteina i njihovih receptora u samom tkivu koštanih metastaza karcinoma prostate. Sukladno našim rezultatima, moramo naglasiti kako važan trenutak u patogenezi karcinoma prostate predstavlja gubitak ekspresije receptora koštanih morfogenetskih proteina tipa II (BMPR-II), tj. gubitak normalnog BMP – signaliranja.

I dalje je nejasna točna uloga i mehanizam djelovanja koštanih morfogenetskih proteina u kontroli rasta prostate, u nastanku benigne prostatične hiperplazije i karcinoma prostate. Za sada samo naslućujemo mehanizam i ulogu koštanih morfogenetskih proteina u koštanom metastaziranju karcinoma prostate, a čije će izučavanje biti predmetom interesa budućih studija.

6. ZAKLJUČCI

1. Postoji različita ekspresija koštanih morfogogenetskih proteina (BMP-2/4, -3, -5, -6, -7) i njihovih receptora (BMPR-IA, -IB i -II) u uzorcima tkiva:
 - normalne prostate,
 - benigne prostatične hiperplazije,
 - karcinoma prostate bez dokazanih koštanih metastaza,
 - karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama i
 - samih koštanih metastaza karcinoma prostate.
2. Izrazito je smanjena ekspresija receptora tipa BMPR-II, te BMPR-IA, i koštanih morfogogenetskih proteina BMP-6 i -7 u uzorcima tkiva karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama.
3. Obrasci ekspresije koštanih morfogogenetskih proteina (BMP-2/4, -3, -5, -6, -7) i njihovih receptora (BMPR-IA, -IB i -II) u različitim grupama uzoraka (normalna prostata, benigna prostatična hiperplazija, karcinom prostate bez dokazanih koštanih metastaza, karcinom prostate s dokazanim koštanim metastazama i koštane metastaze karcinoma prostate) međusobno se razlikuju.
4. BMP-3 nema uloge u kontroli rasta normalne prostate.

5. Dva su možebitna mjesta u patogenezi koštanog metastaziranja karcinoma prostate važna za terapijsko djelovanje s ciljem sprječavanja nastanka koštanih metastaza:
 - a. sprječavanje smanjenja ekspresije BMPR-II i
 - b. inhibicija djelovanja osteoinduktivnih koštanih morfogenetskih proteina na osteoblaste i osteoklaste u samoj koštanoj metastazi.
6. S porastom patohistološkog gradusa karcinoma prostate smanjuje se ekspresija BMP-6 i -7, te receptora tipa BMPR-IA i II.
7. U stanicama koštanih metastaza karcinoma prostate izrazita je ekspresija osteoinduktivnih koštanih morfogenetskih proteina (BMP-2/4, -5, -6, -7), te je izrazito slaba ekspresija receptora tipa BMPR-II.
8. BMP – signaliranje je narušeno u stanicama karcinoma prostate s dokazanim koštanim metastazama i u stanicama koštanih metastaza.
9. Nejasna je točna uloga i mehanizam djelovanja koštanih morfogenetskih proteina u kontroli rasta prostate, u nastanku benigne prostatične hiperplazije i karcinoma prostate. Za sada samo naslućujemo mehanizam i ulogu koštanih morfogenetskih proteina u koštanom metastaziranju karcinoma prostate, a čije će izučavanje biti predmetom interesa budućih studija.

7. LITERATURA

1. Križan Z. Kompendij anatomije čovjeka III. dio: Pregled građe grudi, trbuha, zdjelice, noge i ruke. Zagreb: Školska knjiga; 1997, str. 182-7.
2. Partin AW, Rodriguez R. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. U: Campbell MF, Retik AB, Vaughn ED, Walsh PC, ur. Campbells urology. 8th edition. Philadelphia: Saunders; 2002.str.1237-96.
3. Bonkhoff H. Morphogenetic aspects of prostate cancer. U: Hofmann R, Heidenreich A, Moul JW, ur. Prostate cancer. Berlin: Springer, 2003; str. 3-25.
4. Platz EA, Kantoff PW, Giovannucci E. Epidemiology of and risk factors for prostate cancer. U: Klein EA, ur. Management of prostate cancer. Totowa: Humana Press, 2000; str. 19-46.
5. Reiter R, deKernion JB. Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. U: Campbell MF, Retik AB, Vaughn ED, Walsh PC, ur. Campbells urology. 8th edition. Philadelphia: Saunders; 2002.str.3003-226.
6. Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ, Mundy GR. Expression of bone morphogenic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells. Prostate 1994;24(4):204-11.

7. Roehrborn CG, McConnell JD. Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. U: Campbell MF, Retik AB, Vaughn ED, Walsh PC, ur. Campbells urology. 8th edition. Philadelphia: Saunders; 2002.str.1297-335.
8. Deftos LJ. Prostate carcinoma: Production of bioactive factors. Cancer 2000;88:3002-8.
9. Coopre CR, Chay CH, Gendernalik JD i sur. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. Cancer 2003;97:739-47.
10. de la Rosette J, Alivizatos G, Madersbacher S i sur. Benign prostatic hyperplasia. Eur Urol 2001;40:256-63.
11. Aus G, Abbou C, Bolla M i sur. Guidelines on prostate cancer. Eur Urol 2001;40:97-101.
12. Maričić A, Velčić G. Naša iskustva u liječenju karcinoma prostate. Medicina 2004;42:115-120.
13. Fučkar Ž, Tucak A. Transrektalna sonografija prostatovezikularnog segmenta. Med Vjesn 1985;1:25-35.
14. Fučkar Ž. Transrektalna sektorska sonografija bolesti prostate (klinička evaluacija). Urol Arh 1986;26:135-43.

15. Fučkar Ž, Dimec D. Prostata. U: Fučkar Ž, ur. Sonografija urogenitalnog sustava: II. dio. 1. izdanje. Rijeka: Digital point; 2000.str.209-34.
16. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, ur. World Health Organization classification of tumors. Tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon (France): JARC Press; 2004.
17. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. Spine 2002;27:2-8.
18. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965;150:893-9.
19. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation, J Bone Miner Res 1993;8(2):565-72.
20. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. Curr Opin Genet Dev 1996;6:432-8.
21. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. Kidney Int 2000;57(6):2207-14.
22. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. Mol Rep Development 1992;32(2):160-7.

23. Cheng H, Jiang W, Phillips F i sur. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *JBJS* 2003;85A(8):1544-52.
24. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative axtraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*.1981;78:7599-603.
25. Faucheux C, Ulysse F, Bareille R, Reddi AH, Amedee J. Opposing actions of BMP3 and TGF beta 1 in human bone marrow stromal cell growth and differentiation. *Bioch Bioph Res Comm* 1997;241:787-93.
26. Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi AH, Sampath TK. Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes. *Bioch Bioph Res Comm* 1994;198(2):693-700.
27. Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP. Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein-3 (osteogenin). *JHC* 1994;42(7):869-75.
28. Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT i sur. Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein 7) in human and mouse development. *JHC* 1995;43:1035-44.

29. Perr HA, Ye J, Gitelman SE. Smooth muscle express bone morphogenetic protein (Vgr-1/BMP-6) in human fetal intestine. *Biol Neonath* 1999;75:210-4.
30. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83A(1):1-6.
31. Ebara S, Nakayama K. Mechanism for the action of bone morphogenetic proteins and regulation of their activity. *Spine* 2002;27:10-5.
32. Hassel S, Schmitt S, Hartung A i sur. Initiation of SMAD-dependent and SMAD-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *JBJS* 2003; 85A(3):44-51.
33. Groppe J, Greenwald J, Wiater E i sur. Structural basis of BMP signaling inhibition by Noggin, a novel twelve-membered cystine knot protein. *JBJS* 2003;85A(3):52-58.
34. Choong PF. The molecular basis of skeletal metastases. *Clin Orth Rel Res* 2003;415:19-31.
35. Orr FW, Sancez-Sweatman OH, Kostenuik P, Singh G. Tunor-bone interactions in skeletal metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 1995;312:19-33.
36. Lee Y, Schwarz E, Davies M i sur. Differences in the cytokine profiles associated with prostate cancer cell induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. *Orth Res J* 2003;21:62-72.

37. Mundy GR. Mechanisms of bone metastasis. *Cancer* 1997;80(8):1546-56.
38. Lange PH, Vessella RL. Mechanisms, hypotheses and questions regarding prostate cancer micrometastases to bone. *Cancer Met Rev* 1998;17(4):331-6.
39. Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment. *Prostate* 1999;39:246-61.
40. Jacob K, Weber M, Benayahu D, Klienman HK. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res* 1999;59:4453-7.
41. Mohammad KS, Guise TA. Mechanisms of osteoblastic metastases: Role of endothelin-1. *Clin Orth Rel Res* 2003;415:67-74.
42. Keller ET, Brown J. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. *J Cell Bioch* 2004;91(4):718-29.
43. Iddon J, Bundred N, Hoyland J i sur. Expression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in bone metastases from prostate cancer. *Path J* 2000;191:170-4.

44. Bentley H, Hamdy FC, Hart KA i sur. Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *J Br Cancer* 1992; 66(6):1159-63.
45. Barnes J, Anthony CT, Wall N, Steiner MS. Bone morphogenetic protein-6 expression in normal and malignant prostate. *World J Urol* 1995;13:337-43.
46. Thomas BG, Hamdy FC. Bone morphogenetic protein-6:potential mediator of osteoblastic metastases in prostate cancer. *Prostate Cancer Disease* 2000;3(4):283-5.
47. Hamdy FC, Autzen P, Robinson MC i sur. Immunolocalisation and messenger RNA expression of bone morphogenetic protein 6 in human benign and malignant prostatic tissue. *Cancer Research* 1997;57:4427-31.
48. Tamada H, Kitazawa R, Gohji K, Kitazawa S. Epigenetic regulation of human bone morphogenetic protein 6 gene expression in prostate cancer. *J Bone Min Res* 2001;16(3):487-96.
49. Miyzaki H, Watabe T, Kitamura T i sur. BMP signals inhibit proliferation and in vivo tumor growth of androgen-insensitive prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2004;23:9326-35.
50. Gruber R, Graninger W, Bobacz K i sur. BMP-6 induced osteogenic differentiation of mesenchymal cell lines is not modulated by sex steroids and resveratrol. *Cytokine* 2003;23:133-7.

51. Autzen P, Robson CN, Bjartell A. Bone morphogenetic protein 6 in skeletal metastases from prostate cancer and other common human malignancies. *J Br Cancer* 1998;78(9):1219-23.
52. De Pinieux G, Flam T, Zerbib M i sur. Bone sialoprotein, bone morphogenetic protein 6 and thymidine phosphorylase expression in localised human prostatic adenocarcinoma as predictors of clinical outcome: a clinicopathological and immunohistochemical study of 43 cases. *Urol J* 2001;166(5):1924-30.
53. Ide H, Yoshida T, Matsumoto N i sur. Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2. *Cancer Res* 1997;57(22):5022-7.
54. Haudenschild DR, Palmer SM, Moseley TA i sur. Bone morphogenetic protein (BMP)-6 signaling and BMP antagonist Noggin in prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64:8276-84.
55. Regi T, Anderson WA, Raman V, Reddi H. Androgen-dependent gene expression of bone morphogenetic protein 7 in mouse prostate. *Prostate* 1998;37:236-45.
56. Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Shimizu N, Yamanaka H. Expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in human prostate. *Prostate* 2004;59(1):101-6.
57. Brubaker KD, Corey E, Brown LG, Vessella RL. Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J Cell Bioch* 2004;91(1):151-60.

58. Kim IY, Lee DH, Ahn HJ i sur. Expression of bone morphogenetic protein receptors type-IA, -IB and II correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Cancer Res* 2000;60:2840-4.
59. Kim IY, Lee DH, Lee DK i sur. Loss of expression of bone morphogenetic protein receptor type II in human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;10:7651-59.
60. Masuda H, Fukabori Y, Nakano K i sur. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate* 2003;54:268-74.
61. Bobinac D, Maric I, Zoricic S, Spanjol J i sur. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. *Croat Med J* 2004;46(3):389-96.
62. Nagpal S. Interaction of bone morphogenetic protein receptor type IB with metastatic prostate cancer proteins via the Yeast Two-Hybrid System. *Bug J* 1999;2:105-11.
63. Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Loery SF, Amenta P, Langenfeld J. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 2003;24(9):1445-54.
64. Yamada N, Kato M, ten Dijke P i sur. Bone morphogenetic protein type IB receptor is progressively expressed in malignant glioma tumors. *BJ Cancer* 1996;73:624-9.

65. Dai JL, Kitagawa Y, Zhang J i sur. Vascular endothelial factor contributes to the prostate cancer-induced osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic protein. *Cancer Research* 2004;64(3):994-9.
66. Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983;21:731-48.

ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME

Josip Španjol

DATUM I MJESTO ROĐENJA

17.svibnja 1976., Rijeka, Republika Hrvatska

ADRESA

Liganj 58D, 51415 Lovran

RADNO MJESTO

Odjel za urologiju Klinike za kirurgiju, Klinički bolnički centar Rijeka

ŠKOLOVANJE

1994.-2000. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci (prosječna ocjena 4.9, 2001. položen državni ispit);

2000.- Upisao Poslijediplomski znanstveni studij iz Biomedicine na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Rijeci;

2004.- Obranio magistarski rad na Medicinskom fakultetu sveučilišta u Rijeci pod naslovom *Histomorfološke promjene hrskavice i subhondralne kosti koljenoga zgloba u ljudi starije životne dobi i onih s osteoartritisom;*

POZNAVANJE JEZIKA

Aktivno: njemački, engleski, talijanski i francuski;

AKADEMSKI STUPNJEVI

12. srpnja 2000. Doktor medicine, Medicinski fakultet u Rijeci (2001. položen državni ispit);

30. siječnja 2004. Magistar znanosti, Medicinski fakultet u Rijeci;

ZNANSTVENI STUPNJEVI

2001. istraživač-suradnik, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci;

ČLANSTVO U STRUKOVNIM UDRUŽENJIMA

Hrvatska liječnička komora, Zagreb (od 2001.);

Hrvatsko društvo za hitnu medicinu, Rijeka (od 2001.);

NASTAVNA DJELATNOST

1996.-2000. - Student-demonstrator, Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet u Rijeci;

2000.-2002. - vježbe i seminari, «Anatomija», dodiplomski studij iz opće medicine, Medicinski fakultet u Rijeci;

RADNO ISKUSTVO

2000.-2002. – Znanstveni novak, Zavod za anatomiju, Medicinski fakultet u Rijeci;

NAGRADE, ODLIKOVANJA I PRIZNANJA

2000.-Nagrada «Plive» za najboljeg diplomanta na studiju medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci;

ZNANSTVENI RADOVI

Znanstvena kongresna priopćenja

1. Cvijanović O, Kristofić I, Španjol J, Zoričić S, Marić I, Bobinac D. Bone structure of the iliac crest and lumbar spine: a histomorphometric study of adult population in Croatia. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Calcified Tissue Society, June, Madrid, 2001:197.
2. Cvijanović O, Crnčević-Orlić Ž, Kristofić I, Španjol J, Zoričić S, Marić I, Bobinac D. Trabecular bone volume and bone mineral density correlation in lumbar spine. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Calcified Tissue Society, June, Madrid, 2001:173.
3. Španjol J, Bobinac D, Zoričić S, Kristofić I, Vitković B, Marić I. Cartilage and subchondral bone interaction in normal and osteoarthritic human knee joint: a histological and histomorphometrical study. 29th European Symposium on Calcified Tissues, May, Zagreb, 2002: 273.
4. Španjol J, Bobinac D, Zoričić S, Marić I, Kristofić I. BMP-7 protein expression in normal and OA articular cartilage from knee joints in humans. Second European Conference on Bone Morphogenetic Proteins, May, Zagreb, 2002:59.
5. Bobinac D, Španjol J, Zoričić S, Marić I. Expression of BMP-3, BMP-7, CDMP-1 and CDMP-2 in healthy and osteoarthritic knee articular cartilage in elderly people. 30th European Symposium on Calcified Tissues, May, Rome, 2003: P-106.

6. Bobinac D, Španjol J, Zoričić S, Marić I, Fučkar Ž. Expression of bone morphogenetic proteins in human prostate cancer with skeletal metastases. 30th European Symposium on Calcified Tissues, May, Rome, 2003: P-37.

CC

1. Bobinac D, Španjol J, Zoricic S, Maric I. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. Bone 2003; 32: 284-90.
2. Bobinac D, Maric I, Zoricic S, Španjol J i sur. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. Croat Med J 2004;46(3):389-96.

INDEX MEDICUS

1. Markic D, Španjol J, Sotosek S, Fuckar Z. Bilateral testicular tumors. Medicina 2004;42(40):153-6.

IZDANJE
MEDIKAL