



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗΝ  
ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ, ΤΗΝ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΤΟ  
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΓΡΙΒΑΣ**

Ιατρός

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΗΝ  
ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ, ΤΗΝ ΕΝΔΟΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΤΟ  
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ**

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ Κ. ΓΡΙΒΑΣ**

Ιατρός

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**Ημερομηνία αίτησης του κ. Γρίβα Νικολάου: 4-9-2008**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 65373-2-2009**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Στεφάνου Δημήτριος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γιαννάκης Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γούσια Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27-2-2009**

*«Ανοσοϊστοχημική μελέτη της αγγειογένεσης στην υπερπλασία, την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

<b>Κάτσιος Χρήστος</b>	Καθηγητής Χειρουργικής, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων	Ιατρικής Σχολής
<b>Λεβειδιώτου -Στεφάνου Σταματίνα</b>	Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων	Ιατρικής Σχολής
<b>Στεφάνου Δημήτριος</b>	Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων	Ιατρικής Σχολής
<b>Γιαννάκης Δημήτριος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας επί του επιστημονικού πεδίου της Φυσιοπαθολογίας του ουροποιητικού συστήματος και της ενδοσκοπικής Ουρολογίας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων	Ιατρικής Σχολής
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων	
<b>Γούσια Άννα</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων	
<b>Μπαλτογιάννης Δημήτριος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Ουρολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων	Ιατρικής Σχολής

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 14-6-2013

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Μαργαρίτα Τζαφλίδου**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Υπομαμάτας της Σχολής

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Στεφάνου, Καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής και επιστημονικό υπεύθυνο της διατριβής μου, για την ανάθεση του θέματος και την επιστημονική καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι απέναντι στην κυρία Άννα Γούσια, Επίκουρο Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής για τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε μαζί μου ώστε να γίνει η μελέτη των δειγμάτων και η εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κύριο Δημήτριο Γιαννάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ουρολογίας για την βοήθεια κατά την συλλογή των κλινικών στοιχείων της μελέτης. Ευχαριστώ επίσης την κυρία Άννα Μπατιστάτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, την κυρία Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σταματίνα, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, τον κύριο Χρήστο Κάτσιο, Καθηγητή Χειρουργικής και τον κύριο Δημήτριο Μπαλτογιάννη, Επίκουρο Καθηγητή Ουρολογίας, οι οποίοι διετέλεσαν μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου.

Ευχαριστώ την κυρία Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, τους ειδικευόμενους ιατρούς και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου της Παθολογικής Ανατομικής για την βοήθεια τους σε ότι χρειάστηκα καθόλο το διάστημα της διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Διευθυντή, τους επιμελητές και τους ειδικευόμενους ιατρούς της Ουρολογικής Κλινικής του Γ.Ν Χατζηκώστα για το ενδιαφέρον και την συμπαράσταση τους.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η καλοήθης υπερπλασία και το καρκίνωμα αποτελούν αναμφισβήτητα τις δύο πιο συχνές νοσολογικές οντότητες του προστάτη αδένου. Η καλοήθης υπερπλασία απαντάται πολύ συχνά στους άντρες ηλικίας άνω των 50 ετών. Η αιτιολογία της δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένη, ωστόσο φαίνεται ότι σε μεγάλο βαθμό εμπλέκονται τα ανδρογόνα. Το αδενοκαρκίνωμα αποτελεί την πιο διαδεδομένη μορφή καρκίνου στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Κοινός παρανομαστής και στις δύο παθήσεις είναι η αγγειογένεση.

Η αγγειογένεση χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ποικίλων αγγειογενών παραγόντων, προερχόμενων κυρίως από τα νεοπλασματικά κύτταρα. Είναι μια πολύπλοκη διαδικασία με την οποία τα καρκινικά κύτταρα εξασφαλίζουν τις απαραίτητες ουσίες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ παράλληλα καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη μεταστατική τους ικανότητα. Στον μηχανισμό αυτό αδιαμφισβήτητα κεντρική θέση κατέχει ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και οι υποδοχείς του VEGFR-1 (Flt-1) και VEGFR-2 (Flk-1). Η μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density-MVD) είναι ένα μέτρο που αντιπροσωπεύει την ικανότητα νέο-αγγειογένεσης και αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του προστάτη. Καλύτερος δείκτης για την εκτίμηση της MVD θεωρείται η ενδογλίμη (CD105). Είναι επίσης γεγονός ότι η αγγειογένεση παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη της καλοήθους υπερπλασίας καθώς μελέτες έχουν δείξει υψηλότερη μικροαγγειακή πυκνότητα συγκριτικά με τον φυσιολογικό προστάτη. Επίσης ο ρόλος της αγγειογένεσης στην προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία δεν έχει διερευνηθεί καθώς υπάρχουν πολύ λίγες αναφορές στη βιβλιογραφία.

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερο καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ανεύρεσης δεικτών που θα διαχωρίζουν τους ασθενείς με βάση την πρόγνωση τους. Ταυτόχρονα η διασαφήνιση του μηχανισμού εκδήλωσης μιας πάθησης βοηθά στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση. Τα παραπάνω καθίστανται σημαντικά και όσον αφορά τον καρκίνο του προστάτη γεγονός που αποδεικνύεται και από την ανάπτυξη προγνωστικών

μοντέλων με βάση τους δείκτες αγγειογένεσης ενώ μονοκλωνικά αντισώματα κατά του VEGF βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών για την αντιμετώπιση της νόσου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση και η σύγκριση της αγγειογένεσης μεταξύ της καλοήθους υπερπλασίας, της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και του καρκινώματος του προστάτη. Τέλος καταγράφηκαν οι πιθανές συσχετίσεις των δεικτών αγγειογένεσης με συγκεκριμένες παθολογοανατομικές παραμέτρους του καρκινώματος, όπως το παθολογοανατομικό στάδιο και το Gleason score.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	6-64
<b>1.ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ ΑΔΕΝΑΣ</b>	6-10
1.1. Ανατομία-Ιστολογία	6-10
<b>2.ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ</b>	11-15
2.1. Επιδημιολογικά δεδομένα-Αιτιολογία-Αντιμετώπιση	11
2.2. Ιστολογία-Παθολογική Ανατομία	14
<b>3.ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ</b>	16-35
3.1. Επιδημιολογικά δεδομένα-Αιτιολογία	16
3.2. Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Οδοί μεταστάσεων	18
3.3. Σταδιοποίηση	22
3.4. Ιστολογία-Παθολογική Ανατομία	26
3.5. Αντιμετώπιση-πρόγνωση	30
<b>4.ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ</b>	36-64
4.1. Εισαγωγή	36
4.2. Μηχανισμοί αγγειογένεσης-Αγγειογενετικοί παράγοντες	37
4.3. Αναστολείς αγγειογένεσης	41
4.4. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)	44
4.4.1. Γονίδιο-Πρωτεϊνική δομή	45
4.4.2. Βιολογικές δράσεις-Ρύθμιση παραγωγής	47
4.4.3. Υποδοχείς του VEGF	51
4.4.4. VEGF στην υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη	55
4.4.5. Θεραπευτικές προοπτικές	56

4.5. Μικροαγγειακή πυκνότητα (Microvessel Density-MVD)	59
4.5.1. Επιλογή αντισώματος	60
4.5.2. Μέθοδοι καταμέτρησης αγγείων	61
4.5.3. Μικροαγγειακή πυκνότητα στην υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη	62
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	65
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	66-87
1. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ	66-74
1.1. Επιλογή δείγματος	66
1.2. Κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα	67
1.3. Περιγραφή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων	69
1.4. Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης για τους VEGF, VEGFR-1 και VEGFR-2	72
1.5. Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του CD105- Υπολογισμός MVD	73
1.6. Στατιστική ανάλυση	73
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	75-87
2.1. VEGF: Υπερπλασία-καρκίνωμα-PIN	75
2.2. VEGFR-1, VEGFR-2: Υπερπλασία-καρκίνωμα-PIN	77
2.3. CD105: Υπερπλασία-καρκίνωμα-PIN	81
2.4. Υπερπλασία: Συσχέτιση έκφρασης των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, CD105	82

2.5. Καρκίνωμα: Συσχέτιση έκφρασης των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, CD105	83
2.6. Συσχέτιση των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, CD105 με παθολογοανατομικές παραμέτρους στον καρκίνο του προστάτη	84
<b>ΣΧΟΛΙΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	88-91
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ</b>	92-93
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	95-97
<b>ABSTRACT</b>	98-101
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	102-145

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. ΠΡΟΣΤΑΤΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

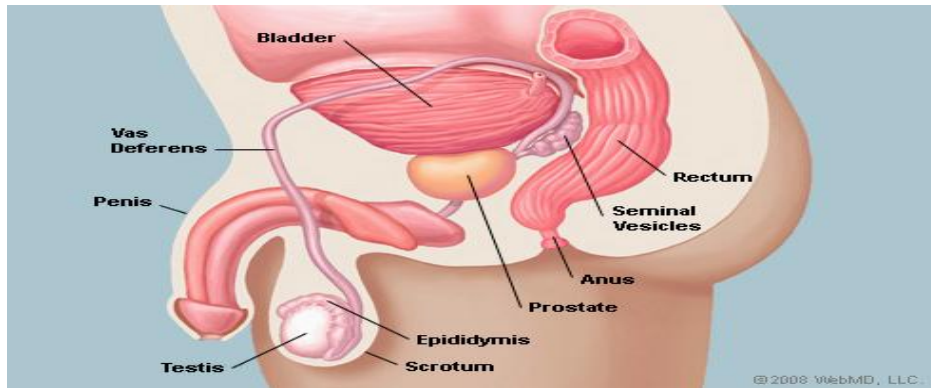
#### 1.1. Ανατομία-Ιστολογία

Εμβρυολογικά, ο προστάτης αδένας αρχίζει να αναπτύσσεται κατά τον τρίτο μήνα της ενδομήτριας ζωής. Προέρχεται από τον ουρογεννητικό κόλπο ο οποίος με τη σειρά του αποτελεί μια δομή ενδοδερμικής προελεύσεως που σχηματίζεται από επιθηλιακά και μεσεγυματικά κύτταρα<sup>1</sup>. Ο σχηματισμός των προστατικών πόρων και αδενίων ξεκινά την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής με την σταδιακή αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων σε σχέση με τα μεσεγυματικά<sup>2</sup>. Μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα τα προστατικά αδένια και οι πόροι αποτελούνται από αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα σε πολύστιβη διάταξη. Η δομή του προστάτη παραμένει ίδια κατά την παιδική και προεφηβική ηλικία ενώ μορφολογικές αλλαγές αρχίζουν να εμφανίζονται κατά την ενήλικη ζωή και συνεχίζονται με την πάροδο της ηλικίας.

Τα ανδρογόνα και οι υποδοχείς τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του προστάτη και είναι χαρακτηριστικό ότι επί απουσίας των ανδρογόνων παρατηρείται μαζική απόπτωση των προστατικών κυττάρων<sup>3</sup>. Η 5α-αναγωγή μετατρέπει την τεστοστερόνη σε διδροτεστοστερόνη, η οποία αποτελεί την κυριότερη επαγωγική ορμόνη για την ανάπτυξη του προστάτη<sup>4</sup>. Με την δράση των ανδρογόνων το επιθήλιο μετατρέπεται σταδιακά σε απλό κυλινδρικό<sup>5</sup>. Υπάρχει μια πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται σε όλη αυτή τη διαδικασία με κυριότερους εκπροσώπους τα γονίδια Hoxa13, Hoxb13, Hoxd13, FoxA1-FoxA2 και Shh.<sup>6,7,8</sup>

Στον ενήλικα ο προστάτης αποτελείται από αδένια που καταλαμβάνουν το 70% του αδένα ενώ το υπόλοιπο 30% αποτελείται από ινομύδες στρώμα<sup>9</sup>. Τοπογραφικά βρίσκεται αμέσως κάτω από τον αυχένα της κύστεως και περιβάλλει την αρχή της ουρήθρας πίσω από την ηβική σύμφυση, πάνω από το ουρογεννητικό

διάφραγμα και έμπροσθεν του ορθού από το οποίο χωρίζεται με την ισχυρή περιτονία του Denovillier<sup>10</sup> prostate cancer. Έχει σχήμα κάστανου με τις σπερματοδόχους κύστες να βρίσκονται στην οπίσθια επιφάνεια του, ενώ διαπερνάται από την προστατική ουρήθρα και τους εκσπερματιστικούς πόρους οι οποίοι καταλήγουν στο σπερματικό λοφίδιο ( **Εικόνα 1**).



Εικόνα 1. Τοπογραφική απεικόνιση του προστάτη σε σχέση με τα παρακείμενα όργανα.

Τα προστατικά αδένια διατάσσονται σε τρεις συγκεκριμένες ομάδες: Μία μικρή ομάδα από αδένια που εκβάλλουν απευθείας στην ουρήθρα, μία μεγαλύτερη ομάδα από υποβλεννογόνια αδένια τα οποία εκβάλλουν στην ουρήθρα μέσω μικρών πόρων και τέλος μία κύρια εξωτερική ομάδα από τα κύρια προστατικά αδένια τα οποία εκβάλλουν στην ουρήθρα μέσω μεγαλύτερων σε μήκος πόρων ( **Εικόνα 2**).



Εικόνα 2 .Διάταξη προστατικών αδενίων σε ομάδες.

Τα αδένια αποτελούνται από εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα ενώ κάτω από τη βασική μεμβράνη απαντώνται τα πολυδύναμα κύτταρα (stem cells)<sup>11</sup>. Το έκκριμα των αδενίων συλλέγεται από ένα σύστημα πόρων οι οποίοι με τη σειρά τους καταλήγουν

στους μείζονες εκσπερματιστικούς πόρους. Το στρώμα αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα και ινοβλάστες και περιβάλλει του επιθηλιακούς αδένες ενώ η προστατική κάψα σχηματίζεται από κολλαγόνο, ελαστικές και λείες μυικές ίνες<sup>12</sup> (**Εικόνα 3**).

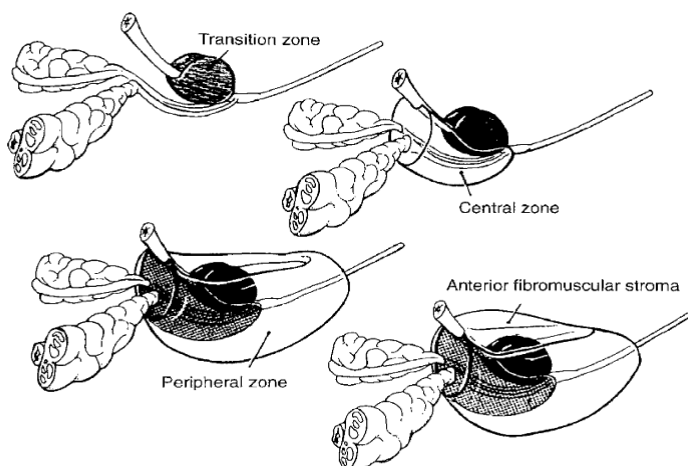


Εικόνα 3. Μικροσκοπική εικόνα φυσιολογικού προστάτη ( χρώση A-H).

Πρώτος ο Losley αναφέρθηκε στο διαχωρισμό του προστάτη σε λοβούς: α) το μέσο λοβό, β) το δεξιό πλαγίο, γ) τον αριστερό πλάγιο, δ) τον οπίσθιο και ε) τον πρόθιο<sup>13</sup>. Ο McNeal ήταν αυτός όμως που καθιέρωσε τον περιγραφικό διαχωρισμό του προστάτη με βάση την παρουσία ζωνών<sup>14</sup> (**Εικόνα 4**). Οι 4 ζώνες κατά McNeal είναι οι παρακάτω:

- Περιφερική ζώνη: Αποτελεί το 70-75% του προστάτη, σχηματίζει την οπίσθια και πλάγια επιφάνεια ενώ στη ζώνη αυτή αναπτύσσεται το 70-80% των καρκίνων.
- Κεντρική ζώνη: Αποτελεί το 20-25% του προστάτη και περιβάλει τους εκσπερματιστικούς πόρους στην πορεία τους προς το σπερματικό λοφίδιο. Σπάνια (5%) παρατηρείται ανάπτυξη καρκίνου.
- Μεταβατική ζώνη: Αποτελεί το 5-10% του οργάνου, βρίσκεται κεντρικότερα του σπερματικού λοφιδίου και είναι η ζώνη ανάπτυξης της καλοήθους υπερπλασίας. Μόνο το 10% των καρκίνων αναπτύσσονται στη ζώνη αυτή.

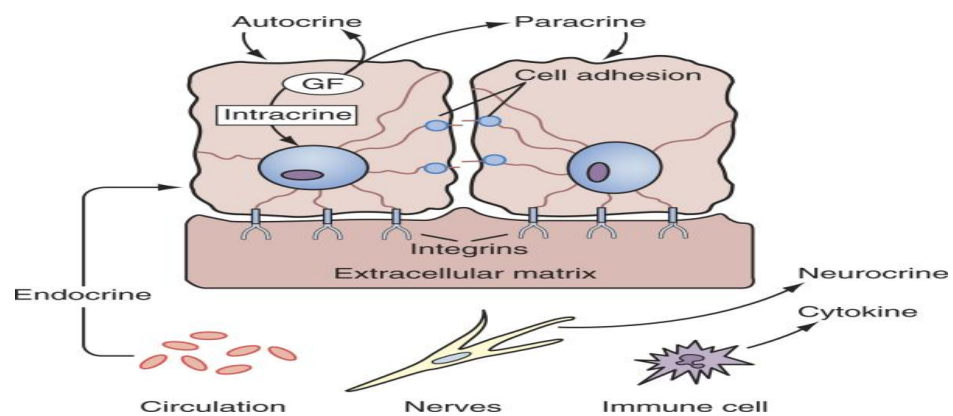
- Πρόσθιο ινομυώδες στρώμα :Περιλαμβάνει τμήμα του εξωστήρα, τον έσω και έξω σφιγκτήρα ενώ στερείται αδενικού επιθηλίου.



Εικόνα 4. Τοπογραφική απεικόνιση των ζωνών του προστάτου κατά McNeal

Οι αρτηρίες του προστάτη είναι κλάδοι της κάτω κυστικής και μέσης αιμορροϊδικής αρτηρίας ενώ οι φλέβες σχηματίζουν το περιπροστατικό φλεβικό πλέγμα το οποίο εκβάλει στις έσω λαγόνιες φλέβες. Τα λεμφαγγεία του προστάτη καταλήγουν απευθείας στους έσω-εξώ λαγόνιους και ιερούς λεμφαδένες. Η νεύρωση γίνεται τόσο από συμπαθητικές ίνες που προέρχονται από το κάτω υπογάστριο πλέγμα όσο και από παρασυμπαθητικές προερχόμενες από τα πυελικά σπλαχνικά νεύρα. Τα αγγειονευρώδη δεμάτια σχηματίζονται από το πυελικό πλέγμα και πορεύονται στην οπισθοπλάγια επιφάνεια του οργάνου καταλήγοντας στα σηραγγώδη νεύρα<sup>15</sup>.

Φαίνεται ότι το στρώμα και τα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται σε μια διαρκή αλληλεπίδραση, μια διαδικασία στη οποία εμπλέκονται ένας μεγάλος αριθμός αυξητικών παραγόντων (Εικόνα 5). Διαταραχή αυτής της ισορροπίας παρατηρείται τόσο στην υπερπλασία όσο και στο υπερπλασία όσο και στο καρκίνωμα του προστάτη<sup>16,17</sup>.



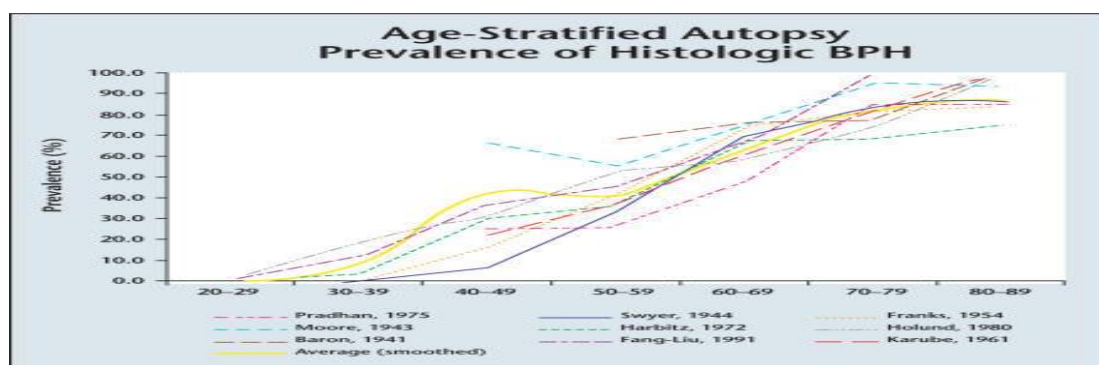
Εικόνα 5. Αλληλεπίδραση στρώματος-επιθηλιακών κυττάρων με τη δράση ενδοκρινών και παρακρινών αυξητικών παραγόντων



## 2. ΚΑΛΟΗΘΗΣ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

### 2.1. Επιδημιολογικά δεδομένα-Αιτιολογία-Αντιμετώπιση

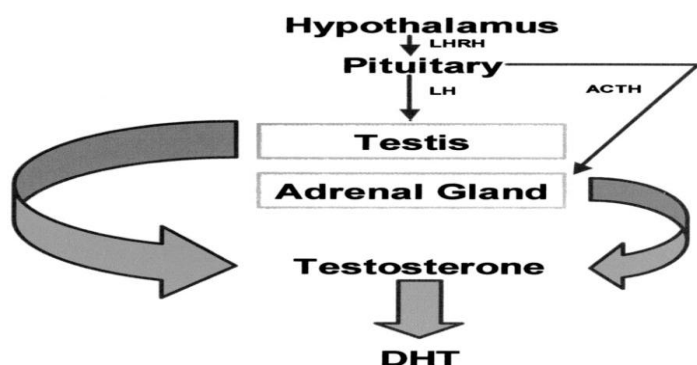
Η καλοήθης υπερπλασία του προστάτη (ΚΥΠ) είναι μια από τις συχνότερες παθήσεις μεταξύ αυτών που προσβάλουν άνδρες μέσης ηλικίας. Ιστολογικά εμφανίζεται στο 60% και το 90% των ανδρών ηλικίας 60 και >85 ετών, αντίστοιχα<sup>18,19</sup>(**Εικόνα 5**). Κλινική συμπτωματολογία παρατηρείται στο 40% των ασθενών.



Εικόνα 5. Ηλικιακή επίπτωση της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη (Campbell's Urology. 8th ed.)

Οι μόνοι σαφείς παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ΚΥΠ είναι η ηλικία και η ύπαρξη λειτουργικών όρχεων ώστε να εξασφαλίζεται η παραγωγή των ανδρογόνων καθώς είναι αποδεδειγμένο ότι τα τελευταία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη της νόσου. Άνδρες που έχουν υποστεί ευνουχισμό πριν την εφηβεία ή έχουν προσβληθεί από γενετικά νοσήματα που προκαλούν διαταραχή της δράσης ή της σύνθεσης των ανδρογόνων δεν αναπτύσσουν ΚΥΠ<sup>21,22</sup>. Τα κύτταρα Leydig των όρχεων εκκρίνουν το 90% της τεστοστερόνης ενώ το υπόλοιπο 10% προέρχεται από τα επινεφρίδια (**Εικόνα 6**). Το κύριο ανδρογόνο που είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη και την επιβίωση των προστατικών κυττάρων είναι η διυδροτεστοστερόνη. Η 5α-

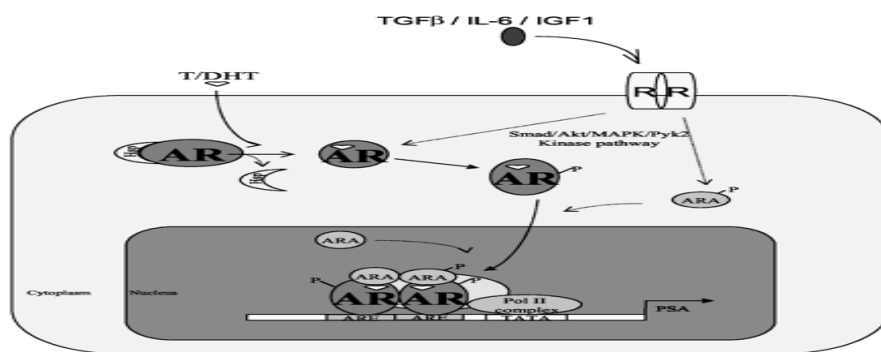
ρεδουκτάση (τύπος 2) μετατρέπει την τεστοστερόνη σε διυδροτεστοστερόνη. Μέσα στο προστατικό κύτταρο η τεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη συνδέονται με τον ίδιο ανδρογονικό υποδοχέα. Ωστόσο η σύνδεση της διυδροτεστοστερόνης είναι ισχυρότερη και σταθερότερη.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης των ανδρογόνων.

Το σύμπλεγμα διυδροτεστοστερόνης-υποδοχέα συνδέεται σε ειδική θέση με το DNA του πυρήνα του προστατικού κυττάρου με αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφή των ανδρογονο-εξαρτώμενων γονιδίων. Η παρατηρούμενη υπερπλασία πιθανόν οφείλεται στη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-απόπτωσης.

Στην διαδικασία αυτή εμπλέκονται επίσης αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυξητικών παραγόντων και των στεροειδών ορμονών. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι μικρά πεπτιδικά μόρια που διεγείρουν ή αναστέλλουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Παράγοντες με παρακρινή δράση όπως ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας β (FGF-β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης (IGF) εκκρίνονται από τα στρωματικά κύτταρα υπό την επίδραση της διυδροτεστοστερόνης και εμφανίζουν συνεργική δράση στην ανάπτυξη της ΚΥΠ<sup>23</sup> (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της συνεργικής δράσης αυξητικών παραγόντων-διυδροτεστοστερόνης στην διαδικασία της ΚΥΠ.

Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο στην εμφάνιση της ΚΥΠ είναι οι ακόλουθοι:

- Φυλή : Η πάθηση εμφανίζεται πιο συχνά στη μαύρη φυλή<sup>24</sup>.
- Διατροφή: Η ΚΥΠ είναι λιγότερο συχνή σε φυτοφάγους ενώ η παχυσαρκία, το μεταβολικό σύνδρομο και ο σακχαρώδης διαβήτης έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου<sup>25</sup>.
- Γενετικά αίτια: Περίπου το 50% των ατόμων που υποβάλλονται σε προστατεκτομή σε ηλικία μικρότερη των 60 έχουν την οικογενή μορφή της νόσου, ενώ ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΚΥΠ, η λεπτομερής αναφορά των οποίων δεν είναι στα πλαίσια της μελέτης<sup>26</sup>.

Η κλινική συμπτωματολογία της ΚΥΠ χαρακτηρίζεται από αποφρακτικά συμπτώματα (καθυστέρηση έναρξης ούρησης, ελάττωση ακτίνας ούρησης, παράταση χρόνου ροής, διακοπές ούρησης, αίσθημα ατελούς κένωσης) και ερεθιστικά συμπτώματα (συχνουρία, νυκτουρία, επιτακτική ούρηση, επιτακτική ακράτεια)<sup>27</sup>. Η θεραπευτική αντιμετώπιση συνίσταται σε φαρμακευτική αγωγή ( $\alpha$ -blockers, αναστολείς 5<sup>α</sup>-ρεδουκτάσης) ή χειρουργική αφαίρεση του αδενώματος (διουρηθρική ή διακυστική προστατεκτομή).

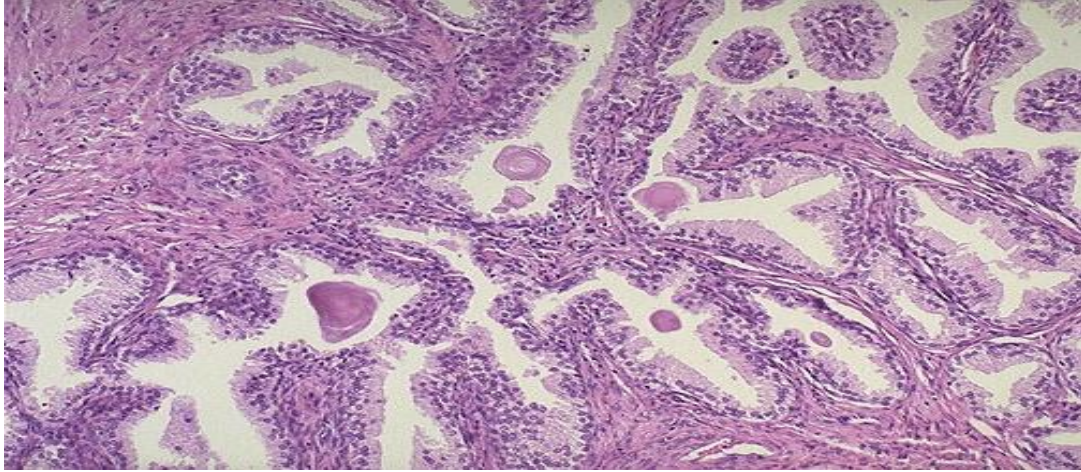
## 2.2. Ιστολογία-Παθολογική Ανατομία

Η πρόωμη οξώδης υπερπλασία του προστάτη ξεκινά από την μεταβατική ζώνη. Οι αναπτυσσόμενοι προστατικοί όζοι συμπιέζουν τόσο τον ουρηθρικό αυλό όσο και τα πιο περιφερικά τμήματα του φυσιολογικού προστάτη<sup>28</sup> ( **Εικόνα 8**).



Εικόνα 8. Μακροσκοπική εικόνα υπερπλασίας προστάτη.

Μικροσκοπικά παρατηρείται υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των αδενίων και των πόρων, των λείων μυϊκών κυττάρων και των ινοβλαστών του στρώματος. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται οι προστατικοί όζοι, οι οποίοι διακρίνονται σε 5 τύπους: στρωματικοί, ινομυώδεις, μυώδεις, ινοαδενωματώδεις και ινομυοαδενωματώδεις, με τον τελευταίο να αποτελεί το συνηθέστερο τύπο. Τα επιθηλιακά κύτταρα των αδενίων είναι ψηλά κυλινδρικά κύτταρα και διατάσσονται σε διπλή στοιβάδα<sup>29</sup> ( **Εικόνα 9**). Χαρακτηριστική είναι η θηλώδης υπερπλασία του αδενικού επιθηλίου. Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημικές τεχνικές διαπιστώνεται ότι το υπερπλαστικό επιθήλιο είναι πάντα θετικό για το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) και την προστατική όξινη φωσφατάση (PAP).



Εικόνα 9. Υπερπλαστικά αδένια (Χρώση Α-Η). Τα επιθηλιακά κύτταρα διατάσσονται σε 2 στοιβάδες.

Ο βαθμός της απόφραξης δεν αυξάνεται αναλογικά με το μέγεθος του προστάτη. Αυτό οφείλεται σε διαφορετικούς παράγοντες όπως σε διαφορές στη σχέση επιθηλίου στρώματος και στη συμπαθητική νεύρωση των λείων μυϊκών ινών . Υπάρχει λοιπόν, πέραν της υπερπλασίας και η δυναμική συνιστώσα της απόφραξης η οποία καθορίζεται από τον τόνο των λείων μυϊκών ινών ο οποίος με τη σειρά του ρυθμίζεται από τους α1 αδρενεργικούς υποδοχείς<sup>30</sup>.

### 3. ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΠΡΟΣΤΑΤΗ

#### 3.1. Επιδημιολογικά δεδομένα-Αιτιολογία

Ο καρκίνος του προστάτη βρίσκεται στη δεύτερη θέση όσον αφορά τη συχνότητα σε παγκόσμιο επίπεδο ενώ στις δυτικές κοινωνίες αποτελεί τον πιο συχνά διαγνωσκόμενο καρκίνο<sup>31</sup>. Αποτελεί την δεύτερη και έκτη αιτία θανάτου από νεοπλασματική νόσο στις δυτικές χώρες και παγκοσμίως, αντίστοιχα ενώ είναι υπεύθυνος για το 14% των νέων περιστατικών καρκίνου και το 6% των θανάτων από καρκίνο<sup>32</sup>. Το 16% των ανδρών ηλικίας άνω των 50 ετών στις ΗΠΑ θα εμφανίσει κλινική νόσο αλλά μόνο το 2,9% θα πεθάνει από το συγκεκριμένο νεόπλασμα. Σε παγκόσμιο επίπεδο, το 1% του πληθυσμού πεθαίνει από καρκίνο του προστάτη, ενώ εκτιμάται ότι το 2015 στις ΗΠΑ 280.000 άνδρες θα διαγνωστούν με τη νόσο και το 2025 ο αριθμός αυτός θα έχει αυξηθεί σε 350.000<sup>33</sup>.

Υπάρχει μεγάλη διακύμανση (> 25 φορές) στην επίπτωση της νόσου ανά τον κόσμο. Η επίπτωση είναι μικρότερη στις Ασιατικές χώρες (1,9/100.000 στην Κίνα) από ότι στην Ευρώπη (100/100.000) και στις ΗΠΑ (272/100.000)<sup>34,35</sup>. Αντίστοιχα, η μεγαλύτερη θνητότητα παρατηρείται στους Αφρο-αμερικανούς άνδρες της Καραϊβικής (23/100.000) ενώ η μικρότερη παρατηρείται στις χώρες της Ασίας (<5/100.000)<sup>36</sup>. Γενικά η μαύρη φυλή αποτελεί ομάδα υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του προστάτη.

Εκτός από τον κλινικό καρκίνο (clinical carcinoma) πολλές φορές η διάγνωση αποτελεί τυχαίο εύρημα κατά την ιστολογική εξέταση υλικού διουρηθρικής ή διακυστικής προστατεκτομής (incidental carcinoma) ή αποτέλεσμα μια νεκροτομικής μελέτης (λανθάνων καρκίνος-latent carcinoma). Υπολογίζεται ότι η συχνότητα του λανθάνοντα καρκίνου διπλασιάζεται για κάθε δεκαετία της ζωής με αποτέλεσμα να εμφανίζεται στο 70% των ανδρών ηλικίας 80 ετών, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται

από γεωγραφικούς, εθνικούς ή φυλετικούς παράγοντες<sup>37</sup>. Απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να εξελιχθεί ένας λανθάνων καρκίνος σε κλινική νόσο<sup>38,39</sup>. Στις ΗΠΑ υπολογίζεται ότι 1 στους 55 άνδρες ηλικίας μεταξύ 40 και 60 ετών, θα αναπτύξει κλινική νόσο ενώ στις ηλικίες μεταξύ 60 και 80 ο αντίστοιχος λόγος γίνεται 1/7<sup>40</sup>. Η αύξηση της επίπτωσης της νόσου τα τελευταία χρόνια δεν οφείλεται μόνο στην αύξηση του μέσου όρου ζωής αλλά και στην ευρεία χρήση μεθόδων πρώιμης διάγνωσης με κύριο εκπρόσωπο το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA).

Η εξέλιξη και προαγωγή της νόσου επηρεάζεται από διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες. Βάση των υπάρχουσών μελετών φαίνεται ότι στην αιτιολογία της νόσου υπεισέρχονται τόσο γενετικό-κληρονομικοί παράγοντες όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες<sup>41</sup>. Οι μόνοι διαπιστωμένοι παράγοντες κινδύνου είναι η ηλικία, η φυλή και το κληρονομικό ιστορικό<sup>42</sup>. Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου είναι οι διατροφικές συνήθειες, η παχυσαρκία, η ορμονική κατάσταση καθώς και επαγγελματικοί παράγοντες<sup>43</sup>.

Όπως προαναφέρθηκε η επίπτωση του καρκίνου του προστάτη αυξάνεται με την ηλικία. Η νόσος εμφανίζεται στις μεγαλύτερες ηλικίες και είναι εξαιρετικά σπάνια σε ηλικίες < 40 ετών<sup>44</sup>. Το 85% των ανδρών διαγιγνώσκονται μετά την ηλικία των 65 ετών, με τη μεγαλύτερη επίπτωση να καταγράφεται στην ηλικιακή ομάδα 70-74<sup>45</sup>.

Είναι γνωστό επίσης ότι η κληρονομικότητα παίζει σπουδαίο ρόλο στη εμφάνιση της νόσου. Ο κίνδυνος εμφάνισης σε πρώτου βαθμού συγγενείς είναι διπλάσιος και αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των προσβεβλημένων ατόμων στην οικογένεια<sup>46</sup>. Το γενετικό υπόβαθρο της νόσου επιβεβαιώνεται από την σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ των μονοζυγωτικών διδύμων σε σχέση με τα διζυγωτικά<sup>47</sup>. Ο κληρονομούμενος προστατικός καρκίνος είναι υπεύθυνος για το 43%

των περιπτώσεων καρκίνου έως την ηλικία των 55 ετών και για το 9% έως την ηλικία των 80 ετών, ενώ τουλάχιστον 8 γονίδια (*RNase L/HPC1*, *ELAC2/HPC2*, *SR-A/MSR1*, *CHEK2*, *BRCA2*, *PON1*, *OGG1*, *MIC1*) έχουν συσχετιστεί με το συγκεκριμένο τύπο<sup>48,49,50</sup>. Το 88% των ανδρών που εκφράζουν αυτά τα γονίδια αυτά θα εμφανίσουν καρκίνο του προστάτη μέχρι την ηλικία των 75 ετών.

Διατροφή πλούσια σε ζωικά λίπη και πτωχή σε φυτικές ίνες ευνοούν την εμφάνιση καρκίνου επειδή ενδεχομένως αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της χοληστερόλης για τη σύνθεση των ανδρογόνων<sup>51</sup>. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο περιορισμός της κατανάλωσης κρέατος επιβραδύνει την εξέλιξη του προστατικού καρκίνου όπως και η πλούσια σε φυτικές ίνες διατροφή των κατοίκων των Ασιατικών χωρών, γεγονός που εν μέρει οφείλεται στη δράση των φυτοοιστρογόνων<sup>52,53</sup>. Επίσης, τροφές πλούσιες σε βιταμίνες E και D και ουσίες όπως το σελήνιο, η λυκοπένη και το  $\alpha$ -λινολενικό έχουν ενδεχομένως προστατευτικό ρόλο<sup>54</sup>.

Τα ανδρογόνα έχουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του προστάτη ενώ είναι γνωστό ότι η απόσυρση των ανδρογόνων προκαλεί μαζική απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων<sup>55</sup>. Επιπλέον, η νόσος είναι εξαιρετικά σπάνια στους ευνούχους ενώ γενετικά ελλείμματα που προκαλούν διαταραχή στην παραγωγή της 5<sup>α</sup> ρεδουκτάσης σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου<sup>56</sup>. Αντίστοιχα, η αυξημένη επίπτωση της νόσου στους Αφροαμερικανούς πιθανόν οφείλεται στην αυξημένη κατά 15% ποσότητα κυκλοφορούντων ανδρογόνων.

### **3.2. Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Οδοί μεταστάσεων**

Ο κλινικά αντιληπτός καρκίνος του προστάτη αναπτύσσεται συνήθως στην περιφερική ζώνη του αδένου και για το λόγο αυτό μπορεί να ψηλαφηθεί κατά την

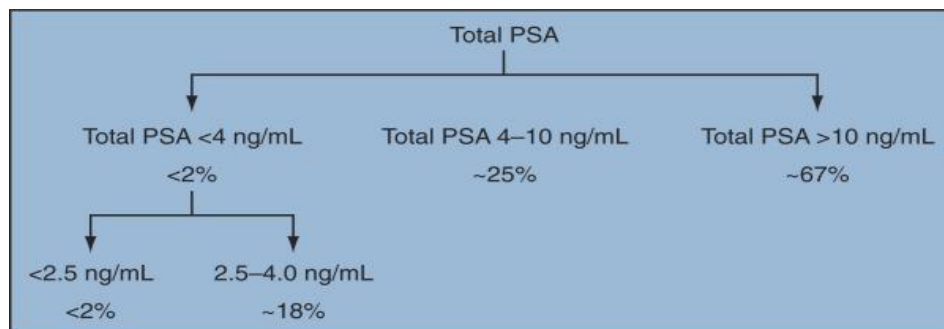


δακτυλική εξέταση. Επειδή η νόσος προκαλεί έντονη αντίδραση του στρώματος η νεοπλασματική περιοχή είναι σκληρής σύστασης ενώ για να ψηλαφηθεί θα πρέπει να είναι μεγέθους  $>0,2$  ml. Στο 18% των ασθενών η διάγνωση τίθεται λόγω της ύποπτης δακτυλικής εξέτασης ανεξάρτητα από την τιμή του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA)<sup>57</sup>. Σε ασθενείς με τιμή PSA  $>2$  ng/ml, η θετική προγνωστική αξία μιας ύποπτης δακτυλικής εξέτασης ανέρχεται σε 5-30%<sup>58</sup>.

Ο καρκίνος του προστάτη όταν βρίσκεται σε αρχικό στάδιο συνήθως δεν εμφανίζει συμπτώματα . Σε προχωρημένη νόσο είναι δυνατό ο ασθενής να παρουσιάζει κλινική συμπτωματολογία αποφρακτικού ή ερεθιστικού τύπου παρόμοια με αυτά της υπερπλασίας<sup>59</sup>. Σπανιότερα η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με αιματουρία, επώδυνη εκσπερμάτιση , ανικανότητα, αιμοσπερμία ή περινεϊκό άλγος<sup>60</sup>. Σε μεταστατική νόσο ο ασθενής μπορεί να προσέλθει με αδυναμία και καταβολή, οστικά άλγη (κυρίως σπονδυλική στήλη, λεκάνη, άκρα), παραπληγία από συμπίεση νωτιαίου μυελού, παθολογικά κατάγματα ή ακόμη και οξεία νεφρική ανεπάρκεια από αμφοτερόπλευρη ουρητήρουδρονέφρωση<sup>61</sup>.

Η ειδικότητα του PSA για την διάγνωση του καρκίνου του προστάτη γρήγορα το καθιέρωσε ως τον πιο ευαίσθητο καρκινικό δείκτη αντικαθιστώντας την όξινη προστατική φωσφατάση. Ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και μπήκε στην κλινική πράξη μια δεκαετία αργότερα<sup>62</sup>. Το PSA είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 33 KD που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αδενίων και των πόρων και εκκρίνεται στο σπέρμα σε υψηλές συγκεντρώσεις (0,5-2 mg/ml) ενώ η συγκέντρωση του στον ορό φυσιολογικά είναι συνήθως μικρή (0-4 ng/ml)<sup>63,64</sup>. Πλήθος μελετών έχουν δείξει ότι το PSA παράγεται επιπλέον και από το ενδομήτριο, τους μαστούς καθώς και από το καρκινικά κύτταρα του νεφρού και των επινεφριδίων<sup>65,66</sup>. Το PSA προκαλεί την ρευστοποίηση του σπέρματος μέσω της

διάσπασης πρωτεϊνών όπως η σεμενογελίνη και φιμπρονεκτίνη<sup>67</sup>. Τιμές PSA <4 ng/ml θεωρούνται φυσιολογικές ενώ 20-30% των ανδρών με τιμές PSA 4-10 ng/ml (γκρίζα ζώνη) και 67% αυτών με τιμές >10 ng/ml έχουν καρκίνο<sup>68</sup> (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Πιθανότητα καρκίνου προστάτη ανάλογα με την τιμή του PSA

Η μεγαλύτερη ποσότητα (65-95%) του PSA κυκλοφορεί στον ορό συνδεδεμένη με τις πρωτεΐνες αντιχυμοθρυψίνη και μακροσφαιρίνη, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα κυκλοφορεί ως ελεύθερη μορφή (fPSA) η οποία στερείται ενζυμικής δραστηριότητας<sup>69</sup>. Η τιμή του fPSA είναι υψηλότερη στην υπερπλασία ενώ το συνδεδεμένου PSA είναι υψηλότερο στον καρκίνο. Ο λόγος fPSA/ total PSA αναμένεται επομένως χαμηλότερος στον καρκίνο, με τιμές λόγου <0,15 να θεωρούνται ενδεικτικές καρκίνου σε πολύ σημαντικό ποσοστό<sup>70</sup>. Αύξηση της τιμής του PSA στον ορό παρατηρείται επίσης στην προστατίτιδα καθώς και μετά από βιοψία προστάτη<sup>71</sup>. Αγωγή με LHRH ανάλογα ή αναστολείς της 5<sup>α</sup> ρεδοκτάσης καθώς επίσης η ακτινοθεραπεία και η ορχεκτομή έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής του PSA<sup>72</sup>.

Μέθοδοι που βοηθούν επίσης στην διάγνωση του προστατικού καρκίνου είναι οι ακόλουθοι:

- Η πυκνότητα του PSA (PSA Density) : Ορίζεται ως το πηλικό της τιμής του PSA διά του όγκου του προστάτη. Τιμές PSAD >0,15 θεωρούνται ενδεικτικές

καρκίνου<sup>73</sup>. Μελέτες ωστόσο έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αμφισβητείται<sup>74</sup>.

- Η ταχύτητα αύξησης του PSA ( PSA velocity) : Ορίζεται ως ο ετήσιος ρυθμός αύξησης του PSA<sup>75</sup>. Μελέτες έδειξαν ότι ρυθμός αύξησης > 0,75 ng/ml σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα καρκίνου<sup>76</sup>.
- Μοριακές μορφές του PSA (Molecular Derivatives of PSA): Το ελεύθερο κλάσμα του PSA αποτελείται από 3 μορφές : πρόδρομο PSA (pro PSA), καλοήθες PSA (BPSA) και το ακέραιο PSA (I-PSA). Η χρησιμοποίηση του λόγου proPSA/BPSA έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ειδικότητα στην ομάδα με τιμές PSA 4-10 και λόγο f/t PSA < 0,15<sup>77</sup>. Τέλος η διαγνωστική αξία του ακέραιου PSA είναι υπό διερεύνηση.

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες για την διάγνωση του προστατικού καρκίνου όλοι οι άντρες ηλικίας άνω των 50 ετών θα πρέπει να υποβάλλονται σε ετήσια δακτυλική εξέταση και έλεγχο της τιμής του PSA<sup>78</sup>. Η οριστική διάγνωση θα τεθεί από την βιοψία του προστάτη η οποία συνήθως γίνεται με την καθοδήγηση διορθικού υπερήχου<sup>79</sup>. Συνήθως λαμβάνονται 6-12 τυχαίες αλλά συστηματικές βιοψίες. Το ποσοστό θετικών βιοψιών ανέρχεται στο 35-40%<sup>80</sup>. Επανάληψη της βιοψίας συνιστάται σε περιπτώσεις ισχυρών ενδείξεων καρκίνου του προστάτη (παθολογική δακτυλική εξέταση, αυξημένα επίπεδα PSA ή ιστολογικά ευρήματα ύποπτα για κακοήθεια στην πρώτη βιοψία).

Τοπικά το νεόπλασμα επεκτείνεται διηθώντας τους παρακείμενους ιστούς. Όταν εντοπίζεται στην κορυφή ή την βάση του οργάνου υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες να επεκταθεί έξω από την κάψα του αδένου λόγω της απουσίας κάψας στην περιοχή αυτή<sup>81</sup>. Άλλα σημεία με μεγαλύτερη πιθανότητα να διασπαστεί η κάψα

είναι τα σημεία εισόδου αγγείων και νεύρων<sup>82</sup>. Διήθηση του κυστικού τριγώνου με ταυτόχρονη υδρονέφρωση (συνήθως ετερόπλευρη) είναι δυνατόν να συμβεί σε προχωρημένη νόσο ενώ οι σπερματοδοχές κύστες μπορούν επίσης να διηθούν κατά συνέχεια ιστού<sup>83</sup>. Η διήθηση του ορθού είναι σπάνια εξαιτίας της ισχυρής περιτονίας του Denovillier που παρεμβάλλεται ανάμεσα τους<sup>84</sup>.

Ο καρκίνος του προστάτη μεθίσταται αιματογενώς και λεμφογενώς. Πιο συχνά οι μεταστάσεις εντοπίζονται στα οστά ενώ είναι χαρακτηριστικό ότι το 85% των ασθενών που πεθαίνουν από τη νόσο έχουν οστικές μεταστάσεις. Αυτές εντοπίζονται κυρίως στη σπονδυλική στήλη, τα οστά της λεκάνης, τις πλευρές και το κρανίο. Άλλες θέσεις αιματογενούς διασποράς κατά σειρά συχνότητας είναι οι πνεύμονες, η ουροδόχος κύστη, το ήπαρ, τα επινεφρίδια και ο εγκέφαλος<sup>85</sup>. Η λεμφαδενική διασπορά γίνεται προς τους έσω, έξω λαγόνιους, στους θυρεοειδικούς και τους προϊερούς λεμφαδένες μέσω του ενδό- και περιπροστατικού πλέγματος<sup>86</sup>

### 3.3. Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση κάθε νεοπλασματος στοχεύει στον καθορισμό της πρόγνωσης και στο σχεδιασμό της καταλληλότερης θεραπείας<sup>87</sup>. Στον καρκίνο του προστάτη για να επιτευχθεί η καλύτερη σταδιοποίηση είναι απαραίτητη η περιγραφή της πρωτοπαθούς εστίας, η αξιολόγηση των επιχώριων λεμφαδένων και η διερεύνηση της ύπαρξης απομακρυσμένων μεταστάσεων. Γι αυτό το λόγο το ευρέως αποδεκτό και χρησιμοποιούμενο σύστημα σταδιοποίησης είναι το TNM (Tumor Node Metastasis), όπως αυτό καθιερώθηκε από την ICCC (International Union Against Cancer) και τροποποιήθηκε το 2009<sup>88</sup> (Πίνακας 1).

Η τοπική σταδιοποίηση του καρκίνου του προστάτη βασίζεται στα ευρήματα της δακτυλικής εξέτασης, του διορθικού υπερηχογραφήματος και πιθανά της MRI.

Επιπλέον πληροφορίες παρέχονται από την εντόπιση και τον αριθμό των θετικών ιστοτεμαχίων κατά την βιοψία του προστάτη, τη διαφοροποίηση του όγκου και τα επίπεδα του PSA<sup>89</sup>. Παρά την υψηλή ειδικότητα στην εκτίμηση της εξωκαψικής επέκτασης και της διήθησης των σπερματοδόχων κύστεων, η αξία του διορθικού υπερηχογράφηματος περιορίζεται από την χαμηλή του ευαισθησία<sup>90</sup>. Ακόμα και με την έλευση του έγχρωμου και του δυναμικού Doppler, η ακρίβεια του διορθικού υπερηχογραφήματος στη σταδιοποίηση της νόσου παραμένει ανεπαρκής. Η μαγνητική τομογραφία συγκρινόμενη με τη δακτυλική εξέταση, το διορθικό υπερηχογράφημα και την αξονική τομογραφία, επιδεικνύει υψηλότερη ακρίβεια στην εκτίμηση επέκτασης στον ένα ή και τους δύο λοβούς (T2), εξωκαψικής επέκτασης ή διήθησης σπερματοδόχου κύστης (T3) όπως και στη διήθηση γειτονικών δομών (T4)<sup>91</sup>. Βιβλιογραφικά όμως παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις στην ακρίβεια της τοπικής σταδιοποίησης με ποσοστά που κυμαίνονται από 50-92%. Η προσθήκη της δυναμικής ενισχυόμενης με σκιαγραφικό μαγνητικής τομογραφίας (DCE-MRI) μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη σε ύποπτα περιστατικά, ενώ η χρησιμοποίηση της μαγνητικής σπεκτροσκοπίας (MRSI) αυξάνει την ειδικότητα στην εκτίμηση της εξωκαψικής επέκτασης<sup>92</sup>.

Δεδομένου των σημαντικών περιορισμών των προεγχειρητικών απεικονιστικών μεθόδων (CT και MRI) στην ανίχνευση μικρών (< 5 mm) λεμφαδενικών μεταστάσεων, η πυελική λεμφαδενεκτομή παραμένει η μόνη αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού της λεμφαδενικής επέκτασης<sup>93,94</sup>. Ασθενείς με στάδιο T2 ή λιγότερο, PSA <20 ng/dl και Gleason score 6 ή μικρότερο έχουν λιγότερο από 10% πιθανότητα να έχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Η καλύτερη μέθοδος για την πρόωμη διάγνωση των οστικών μεταστάσεων είναι το σπινθηρογράφημα των οστών<sup>95,96</sup>. Επί αμφιβολίας σε επιλεγμένους ασθενείς

είναι δυνατόν να βοηθήσουν η 11C-choline-, 18F-flouride- PET/CT ή ολόσωμη MRI<sup>97</sup>.

**Πίνακας 1:** Το σύστημα TNM

T	Πρωτοπαθής όγκος
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί
T0	Χωρίς ενδείξεις πρωτοπαθούς όγκου
T1	Κλινικά μη εμφανής όγκος, μη ψηλαφητός, μη ορατός με απεικονιστικές μεθόδους
T1a	Τυχαίο ιστολογικό εύρημα σε λιγότερο από το 5% του ιστού διουρηθρικής ή διακυστικής προστατεκτομής
T1b	Τυχαίο ιστολογικό εύρημα σε περισσότερο από το 5% του ιστού διουρηθρικής ή διακυστικής προστατεκτομής
T1c	Όγκος που ανευρέθηκε με βιοψία προστάτη
T2	Όγκος εντοπισμένος στον προστάτη <sup>1</sup>
T2a	Ο όγκος καταλαμβάνει το μισό ή λιγότερο του ενός λοβού
T2b	Ο όγκος καταλαμβάνει περισσότερο από το μισό του ενός λοβού, όχι όμως τους δύο λοβούς

- T2c Ο όγκος καταλαμβάνει και τους δύο λοβούς
- T3 Όγκος που επεκτείνεται πέραν της προστατικής κάψας<sup>2</sup>
- T3a Εξωκαψική επέκταση (ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη)
- T3b Ο όγκος επεκτείνεται στη σπερματοδόχο κύστη(εις)
- T4 Ο όγκος είναι καθηλωμένος ή διηθεί γειτονικές δομές εκτός των σπερματοδόχων κύστεων: έξω σφιγκτήρα, ορθό, ανελκτήρα του ορθού και/ή πυελικά τοιχώματα.

---

N Επιχώριοι λεμφαδένες<sup>3</sup>

---

NX Δεν είναι δυνατή η εκτίμηση των λεμφαδένων

N0 Απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων

N1 Μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες

---

M Απομακρυσμένες μεταστάσεις<sup>4</sup>

---

M0 Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις

M1 Απομακρυσμένες μεταστάσεις

M1a Σε μη-επιχώριο λεμφαδένα(ες)

M1b Οστικές

M1c Άλλη εντόπιση

<sup>1</sup> Όγκος που ανευρίσκεται και στους δύο λοβούς στη βιοψία, αλλά είναι αψηλάφητος ή δεν απεικονίζεται ταξινομείται ως T1c.

<sup>2</sup> Επέκταση στην κορυφή του προστάτη ή εντός (αλλά όχι πέραν) της προστατικής κάψας δεν ταξινομείται ως T3, αλλά T2.

<sup>3</sup> Επιχώριοι είναι οι λεμφαδένες κάτω από τον διχασμό της κοινής λαγονίου αρτηρίας. Η εντόπιση δεν μεταβάλλει την ταξινόμηση.

<sup>4</sup> Όταν εντοπίζονται περισσότερες από μια μεταστατικές εστίες, χρησιμοποιείται αυτή με το μεγαλύτερο στάδιο.

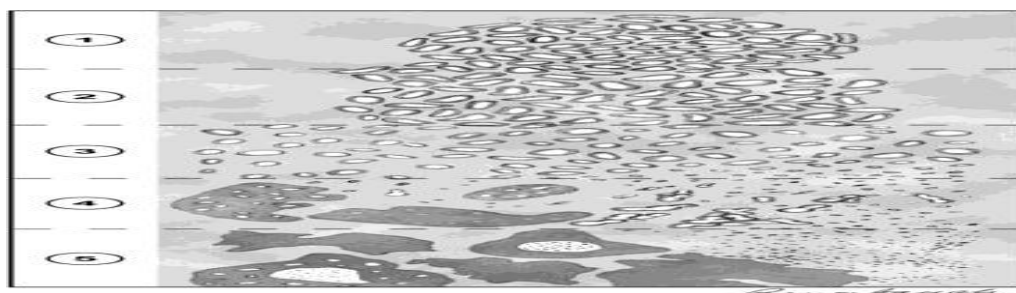
### 3.4. Ιστολογία-Παθολογική Ανατομία

Το καρκίνωμα του προστάτη διακρίνεται ανάλογα με την κυτταρική του προέλευση σε επιθηλιακής προέλευσης (αδενοκαρκίνωμα, καρκίνωμα προστατικών πόρων, νευροενδοκρινικό καρκίνωμα) και μεσεγχυματικής προέλευσης (ραβδομυοσάρκωμα, λειομυοσάρκωμα) ενώ σπάνιοι είναι οι δευτεροπαθείς όγκοι του προστάτη προερχόμενοι κυρίως από διήθηση από όγκους γειτονικών οργάνων, όπως της ουροδόχου κύστεως και του παχέος εντέρου καθώς και μεταστατικά νεοπλάσματα, κυρίως λεμφώματα<sup>98,99,100</sup>.

Το αδενοκαρκίνωμα αντιστοιχεί στο 98% όλων των πρωτοπαθών όγκων και συνήθως εντοπίζεται στην περιφερική ζώνη του οργάνου<sup>101</sup>. Ιστολογικά το νεόπλασμα του προστάτη χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια. Μπορεί να παρατηρηθούν διάφορες μορφές ανάπτυξης, από καλά διαφοροποιημένα αδένια με ομοιόμορφη ανάπτυξη έως πτωχά διαφοροποιημένα που συρρέουν ή έχουν άναρχη

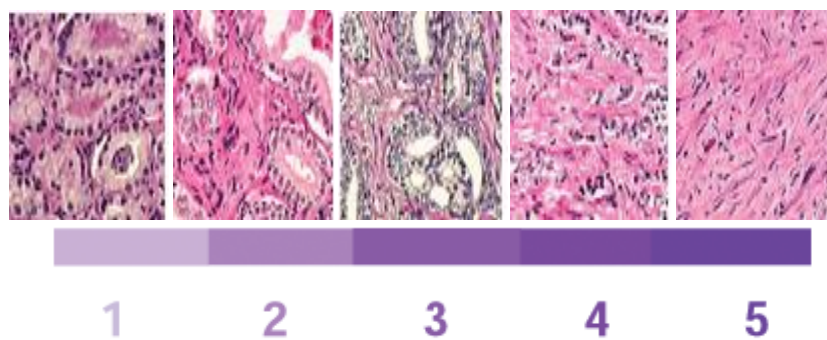


κατανομή. Το περισσότερο διαδεδομένο σύστημα κυτταρικής ταξινόμησης είναι το τροποποιημένο ISUP 2005 Gleason score<sup>102</sup>. Το σύστημα ταξινόμησης Gleason δεν λαμβάνει υπόψη τα κυτταρικά χαρακτηριστικά παρά μόνο τη μορφολογία και αρχιτεκτονική διάταξη των κακοήθων αδενίων τα οποία ταξινομεί σε βαθμούς από 1 έως 5<sup>103</sup> (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής των αδενίων ανάλογα με το Gleason score (ISUP 2005)

Οι βαθμοί 1 και 2 αντιστοιχούν σε απλά, στρογγυλά αδένια, κατανεμημένα σε στρογγυλές μάζες με καθορισμένα όρια. Ο βαθμός 3 αντιστοιχεί σε μικρά έως πολύ μικρά αδένια ακανόνιστου σχήματος και θέσης, ο βαθμός 4 σε αδένια που σχηματίζουν αλυσίδες ή χορδές ενώ ο βαθμός 5 αντιστοιχεί σε αδένια με θηλοειδές και ηθμοειδές επιθήλιο με κεντρική νέκρωση<sup>104</sup> (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Βαθμίδες Gleason score (Dr. D.F. Gleason, Minneapolis, Minnesota)

Το συνολικό Gleason score παίρνει τιμές από 2 έως 10. Σε υλικό διορθικής βιοψίας το συνολικό Gleason score προκύπτει αθροίζοντας τον βαθμό του κυρίαρχο (περισσότερο εκτεταμένου) τύπου ανάπτυξης με τον μεγαλύτερο (αριθμητικά) βαθμό, ανεξάρτητα από την έκταση του τελευταίου (no 5% rule). Στην ιστολογική έκθεση βιοψίας προστάτη έχουν σπουδαία προγνωστική αξία τα ακόλουθα<sup>104</sup>

1. Ιστολογικός τύπος του καρκίνου.
2. Ιστολογικό grade.
3. Αριθμός των ιστοτεμαχίων που διηθούνται από το καρκίνωμα.
4. Τυχόν ύπαρξη περινευρικής διηθήσης.

Κατά την εξέταση υλικού ριζικής προστατεκτομής το Gleason score προκύπτει αθροίζοντας τον βαθμό των δύο κυρίαρχων μορφών ανάπτυξης, ενώ δεν λαμβάνεται υπ' όψιν ο βαθμός κακοήθειας της περιοχής με έκταση <5%<sup>102</sup>. Συνοπτικά στην ιστολογική έκθεση παρασκευάσματος ριζικής προστατεκτομής τα χαρακτηριστικά του καρκινώματος που έχουν την μεγαλύτερη σημασία είναι τα ακόλουθα<sup>105</sup>.

1. Ιστολογικός τύπος.
  2. Ιστολογική διαφοροποίηση.
- Πρωτεύον (κυρίαρχο) grade.
  - Δευτερεύον grade.
  - Συνολικό Gleason score.

3. Ποσοστό του προστατικού ιστού που διηθείται από το νεόπλασμα.

4. Παθολογοανατομικό στάδιο (pTNM).

- Τυχόν ύπαρξη εξωπροστατικής επέκτασης (εστιακή ή εκτεταμένη).

- Τυχόν διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων.

- Η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων, ο αριθμός των εξαιρεθέντων

λεμφαδένων και ο συνολικός αριθμός των θετικών λεμφαδένων.

6. Χειρουργικά όρια.

- Διήθηση ή μη του χειρουργικού ορίου.

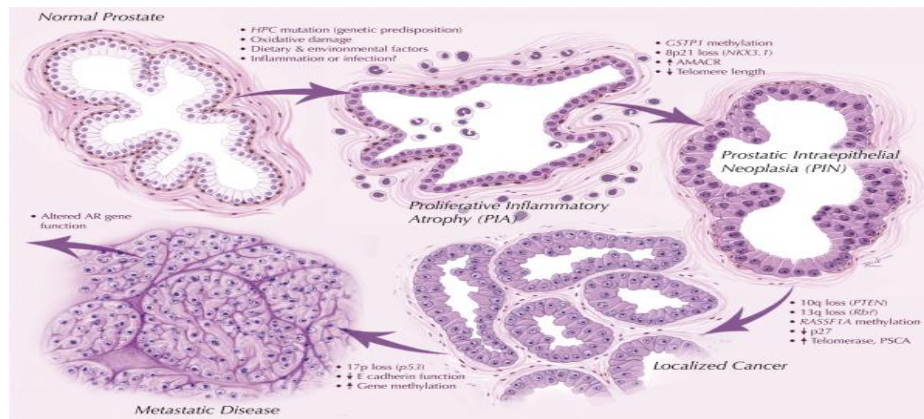
7. Παρουσία αγγειακών διηθήσεων, αν αναγνωρίζονται.

8. Περινευρική διήθηση.

Όγκοι με Gleason score 2-4 θεωρούνται καλής διαφοροποίησης, 5-6 μέσης διαφοροποίησης και 7-10 κακής διαφοροποίησης. Το πρόβλημα που υπάρχει στην αξιολόγηση της κυτταρικής διαφοροποίησης είναι ότι η τελευταία συνήθως υποεκτιμάται στο υλικό της διορθικής βιοψίας σε σύγκριση με το αντίστοιχο της ριζικής προστατεκτομής, ενώ προκειμένου να αυξηθεί η ειδικότητα του Gleason score αποφεύγονται τα score 2-4 σε υλικό βιοψίας προστάτου<sup>106,107</sup>.

Η προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (Prostate Intraepithelial Neoplasia, PIN) χαρακτηρίζεται από δυσπλαστικές αλλοιώσεις των επιθηλιακών κυττάρων και διακρίνεται σε χαμηλού (Low grade, LGPIN) ή υψηλού (High grade, HGPIN) βαθμού ανάλογα με τις ιστολογικές αλλοιώσεις<sup>108</sup>. Η υψηλού βαθμού θεωρείται

προκαρκινική κατάσταση και συνυπάρχει με το αδενοκαρκίνωμα στο 65% των περιπτώσεων<sup>109</sup> (Εικόνα 13). Επιπλέον μελέτες χρειάζονται για να εξακριβωθεί αν στους ασθενείς με διάγνωση HGPIN, χρειάζονται επανάληψη της βιοψίας<sup>110</sup>.



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων νεοπλασματικής εξαλλαγής του προστατικού κυττάρου.

### 3.5. Αντιμετώπιση-Πρόγνωση

Η αντιμετώπιση του προστατικού καρκίνου εξαρτάται πρωτίτως από το στάδιο και τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου αλλά και από παράγοντες όπως η ηλικία, η γενική κατάσταση και το προσδόκιμο επιβίωσης του ασθενούς<sup>111</sup>. Επειδή η πρόοδος της νόσου είναι βραδεία ασθενείς με προσδόκιμο επιβίωσης <10 έτη δεν χρειάζονται ριζική αντιμετώπιση.

Το Gleason score αποτελεί το σπουδαιότερο προγνωστικό παράγοντα του καρκίνου του προστάτη<sup>112</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος θανάτου στη 15ετία χωρίς καμία θεραπεία είναι πολύ υψηλός (60-87%) για όγκους με Gleason score 7-10, ενδιάμεσος (18-30%) για όγκους με Gleason score 6 και χαμηλός (4-11%) για όγκους με Gleason score 2-5<sup>113,114</sup>.

Ασθενείς σταδίου T1a, Gleason score <6 και με προσδόκιμο επιβίωσης <10

έτη μπορούν να συμπεριληφθούν σε πρωτοκόλλα προσεκτικής παρακολούθησης (watchful waiting) και ενεργούς επαγρύπνησης (active surveillance) ώστε να επιτευχθεί η συντηρητική αντιμετώπιση μιας νόσου που δεν θέτει σε κίνδυνο την ζωή του ασθενούς<sup>115</sup>. Η 10ετής επιβίωση σε αυτούς τους ασθενείς κυμαίνεται από 82-87%<sup>116</sup>. Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθούνται ανά διαστήματα με δακτυλική εξέταση, διορθικό υπέρηχο και πιθανόν επαναληπτική βιοψία, ενώ σε περίπτωση προόδου της νόσου οι ασθενείς ακολουθούν ανάλογη φαρμακευτική θεραπεία<sup>117,118</sup>.

Ασθενείς σταδίου T1b-T2c και Gleason score >6 συνήθως υποβάλλονται σε ριζική προστατεκτομή ειδικά εάν έχουν προσδόκιμο επιβίωσης >10 έτη<sup>119</sup>. Παραμένει η θεραπεία εκλογής όσον αφορά την αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη καθώς τόσο η όρμονο- όσο και η χήμειο-θεραπεία δεν αποτελούν ποτέ ριζική αντιμετώπιση της νόσου<sup>120</sup>. Η επέμβαση περιλαμβάνει την αφαίρεση του προστάτη με το περιπροστατικό λίπος και τις σπερματοδοχές κύστες ενώ το κολόβωμα της ουρήθρας αναστομώνεται με τον αυχένα της κύστεως, ενώ απαραίτητος θεωρείται ο λεμφαδενικός καθαρισμός ειδικά σε ασθενείς μεσαίου και υψηλού κινδύνου<sup>121,122</sup>.

Η εξωτερική ακτινοβολία σε δόσεις > 72 Gy είναι μια άλλη ριζική αντιμετώπιση της νόσου και θεωρείται ότι επιτυγχάνεται παρόμοιο διάστημα επιβίωσης με την ριζική προστατεκτομή<sup>123</sup>. Αποτελεί εναλλακτική μέθοδο της ριζικής προστατεκτομής σε εντοπισμένη νόσο (cT1, cT2) ενώ είναι η συνιστώμενη μέθοδος σε τοπικά προχωρημένη νόσο (cT3, cT4). Με την εφαρμογή της τρισδιάστατης σύμμορφης ακτινοβολίας (3D-CRT) και πιο πρόσφατα της διαμορφούμενης έντασης ακτινοθεραπείας (IMRT), μπορεί να χορηγηθεί η επιθυμητή δόση ακτινοβολίας σε συγκεκριμένη περιοχή με ταυτόχρονη δυνατότητα επίτευξης υψηλών δόσεων<sup>124,125</sup>.

Η βραχυθεραπεία μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική θεραπεία σε χαμηλού κινδύνου ασθενείς με PCa με όγκο προστάτη < 50 mL. Η διαδικασία συνίσταται στην

ενδοϊστική τοποθέτηση, με την καθοδήγηση υπερηχογράφου, ραδιοϊσοτόπων όπως το ιώδιο-125 και το παλλάδιο-103 και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μόνιμη ακτινοβόληση του προστάτη<sup>126</sup>. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι σε χαμηλού-μετρίου κινδύνου ασθενείς τα ποσοστά 10ετούς επιβίωσης είναι παρόμοια με αυτά της εξωτερικής ακτινοβόλησης<sup>127</sup>.

Νεοεπικουρικός (neo-adjuvant) και επικουρικός (adjuvant) ανδρογονικός αποκλεισμός μπορεί να εφαρμοστεί σε συνδυασμό τόσο με την ριζική προστατεκτομή (σε περίπτωση σταδίου pT3, pT4) όσο και με την ακτινοθεραπεία (σε τοπικά εκτεταμένη νόσο- high risk patients)<sup>128,129</sup>. Σε ασθενείς υψηλού κινδύνου η συνδυασμένη θεραπεία έχει επιτύχει καλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία<sup>130</sup>.

Η αντιμετώπιση της τοπικά προχωρημένης νόσου (cT3N0M0, cT4N0M0, anyT, N1) αποτελεί αντικείμενο συζητήσεων. Ο θεραπευτικός στόχος σε αυτή την κατηγορία ασθενών είναι διττός και έγκειται στον τοπικό έλεγχο της νόσου καθώς και στην αντιμετώπιση των μικροσκοπικών μεταστάσεων οι οποίες δεν ανιχνεύονται με τις υπάρχουσες μεθόδους. Οι ασθενείς αυτοί μπορούν να υποβληθούν σε ριζική προστατεκτομή με την προϋπόθεση ότι ο όγκος δεν διηθεί το πυελικό τοίχωμα ή τον έξω σφιγκτήρα<sup>131</sup>. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι οι ασθενείς σταδίου T4 είχαν καλύτερη επιβίωση όταν υποβλήθηκαν σε ριζική προστατεκτομή σε σύγκριση με αυτούς που αντιμετωπίστηκαν με ορμονο- ή ακτινοθεραπεία ενώ τα ποσοστά επιβίωσης ήταν παρόμοια με αυτούς που υποβλήθηκαν συνδυασμένη ορμονο- και ακτινο-θεραπεία<sup>132,133,134</sup>.

Σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις ο συνδυασμός ριζικής προστατεκτομής και ορμονοθεραπείας έχει επιτύχει ποσοστά 10ετούς επιβίωσης που προσεγγίζουν το 80%<sup>135,136</sup>. Η εξωτερική ακτινοβόληση των πυελικών λεμφαδένων

δεν σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά επιβίωσης, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες<sup>137</sup>. Τέλος με ενδιαφέρον αναμένονται τα αποτελέσματα δύο προοπτικών μελετών που συγκρίνουν την επιβίωση των ασθενών σταδίου T3-T4 όταν αυτοί αντιμετωπίζονται με ολικό ανδρογονικό αποκλεισμό συγκριτικά με τον συνδυασμό άκτινο- και όρμονοθεραπείας<sup>138,139</sup>.

Στην περίπτωση του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη δε υπάρχει ριζική αντιμετώπιση. Πρώτοι οι Huggins and Hodges επιβεβαίωσαν ότι ο καρκίνος του προστάτη είναι ανδρογόνο-εξαρτώμενη νόσος καθώς η εφαρμογή θεραπειών που είχαν ως στόχο την αναστολή παραγωγής των ανδρογόνων βελτίωναν σημαντικά την επιβίωση των ασθενών με μεταστάσεις<sup>140</sup>. Οι θεραπευτικοί χειρισμοί αποβλέπουν στην ελάττωση των επιπλοκών της νόσου καθώς και στην βελτίωση της ποιότητας της ζωής των ασθενών χωρίς όμως να είναι βέβαιο ότι αυξάνουν την επιβίωση<sup>141</sup>. Η αναστολή της παραγωγής των ανδρογόνων μπορεί να γίνει είτε σε επίπεδο όρχεων, είτε σε επίπεδο υπόφυσης, είτε σε επίπεδο επινεφριδίων ή και εντός του προστατικού κυττάρου (σε επίπεδο ανδρογονικού υποδοχέα)<sup>142</sup>.

Η διάμεση ανταπόκριση στη θεραπεία ανδρογονικού αποκλεισμού είναι 2 έτη<sup>143</sup>. Στην πορεία της νόσου αναπτύσσονται κλώνοι καρκινικών κυττάρων ανθεκτικών στον ανδρογονικό αποκλεισμό και η νόσος μεταπηδά στο ευνοχοάντοχο στάδιο το οποίο συνοδεύεται από την αύξηση της τιμής του PSA και επιδείνωση της κλινικής εικόνας του ασθενούς<sup>144</sup>. Συνοπτικά η θεραπευτική αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη συνίσταται στα εξής :

- Αμφοτερόπλευρη ορχεκτομή: Θεωρείται η μέθοδος εκλογής για την επίτευξη ανδρογονικού αποκλεισμού καθώς επιτυγχάνονται εντός 12 ωρών επίπεδα τεστοστερόνης <50 ng/dl<sup>145</sup>. Παρενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν είναι

στυτική δυσλειτουργία, μυϊκή αδυναμία, εξάψεις, αδυναμία συγκέντρωσης ενώ μεγάλη είναι η ψυχολογική επιβάρυνση του ασθενούς<sup>146</sup>.

- **Οιστρογόνα:** Ελαττώνουν την τεστοστερόνη μέσω της αναστολής της παραγωγής της LHRH, της καταστολής της λειτουργίας των κυττάρων Leydig καθώς και της κυτταροτοξικής τους δράσης στα προστατικά κύτταρα<sup>147</sup>. Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο οιστρογόνο είναι η διαιθυλστιρβεστρολή, ενώ πιθανές παρενέργειες είναι η γυναικομαστία, η ηπατο-τοξικότητα καθώς και τα θρομβοεμβολικά και καρδιαγγειακά επεισόδια<sup>148</sup>.
- **LHRH ανάλογα** (γοσερελίνη, τριπτορελίνη, λευπρορελίνη και βουσερελίνη): Είναι συνθετικά πεπτίδια ανάλογα της LHRH. Αρχικά διεγείρουν την παραγωγή της LHRH (flare up) αλλά μετά από 7 περίπου ημέρες υπορυθμίζουν τους υποδοχείς LHRH της υπόφυσης με τελικό αποτέλεσμα την ελαττωμένη παραγωγή της LH<sup>149</sup>. Επίπεδα ευνουχισμού επιτυγχάνονται εντός 2-4 εβδομάδων ενώ τα αποτελέσματα της θεραπείας είναι παρόμοια με της ορχεκτομής<sup>150</sup>.
- **LHRH ανταγωνιστές** (abarelix, degarelix): Επιτυγχάνουν τον άμεσο αποκλεισμό των υποδοχέων της υπόφυσης άρα και την άμεση φαρμακευτική ορχεκτομή χωρίς όμως να υπάρχει η αρχική αύξηση των επιπέδων της τεστοστερόνης<sup>151</sup>.
- **Αντιανδρογόνα** (φλουταμίδα, νικαλουταμίδα, βικαλουταμίδα, οξική κυπροτερόνη): Αποκλείουν τον ανδρογονικό υποδοχέα στο επίπεδο του πυρήνα των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας έτσι την μαζική απόπτωση αυτών<sup>152</sup>.
- **Πλήρης ανδρογονικός αποκλεισμός:** Αποτελεί τον συνδυασμό LHRH αναλόγου και αντιανδρογόνου έτσι ώστε να καταστέλλεται η παραγωγή των ανδρογόνων σε 2 επίπεδα<sup>153</sup>.



- Κετοκοναζόλη και κορτικοστεροειδή: Χρησιμοποιούνται ως θεραπείες δεύτερης γραμμής σε ασθενείς με ευνουχοάντοχο καρκίνο του προστάτη. Αναστέλλουν την παραγωγή των ανδρογόνων από τα επινεφρίδια<sup>154</sup>.
- Κυτταροστατικά (δοσεταξέλη, εστραμουστίνη, βινβλαστίνη, ετοποσίδη, μιτοξαντρονη, πρεδνισόνη, καβαζιταξέλη): Η παρατηρούμενη ανταπόκριση είναι από 10-20% αλλά η διάρκεια της δεν ξεπερνά τους 10 μήνες<sup>155,156</sup>.
- Νέες θεραπείες: Μονοκλωνικά αντισώματα (bevacizumab-thalidomide) που μπλοκάρουν τον VEGF ή τον υποδοχέα του βρίσκονται ήδη σε μελέτες φάσης III και σε συνδυασμό με την δοσεταξέλη φαίνεται να έχουν την δυνατότητα να προστεθούν στην θεραπευτική φαρέτρα της αντιμετώπισης του καρκίνου του προστάτη<sup>157,158,159</sup>.

## 4. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

### 4.1. Εισαγωγή

Ο όρος αγγειογένεση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Hertig το 1935 για να περιγράψει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων στον πλακούντα και επανεμφανίστηκε το 1972 από τον Folkman για να περιγράψει την εμφάνιση νέων αγγείων κατά τα στάδια ανάπτυξης των συμπαγών όγκων<sup>160</sup>. Το κυκλοφορικό σύστημα είναι απαραίτητο για την επιβίωση κάθε πολυκύτταρου οργανισμού καθώς μέσω του συστήματος αυτού οι ιστοί προσλαμβάνουν οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες και αποβάλλουν διοξείδιο του άνθρακα και μεταβολικά προϊόντα. Είναι επίσης γνωστό ότι οι όγκοι αδυνατούν να αναπτυχθούν πάνω από 2 mm χωρίς αγγειογένεση<sup>161,162</sup>.

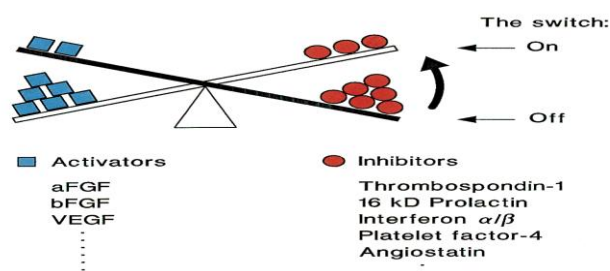
Κατά τη εμβρυϊκή ανάπτυξη η διαδικασία είναι γνωστή ως «γένεσις του αγγειακού συστήματος», (vasculogenesis)<sup>163</sup>. Στην φάση αυτή οι κύριες αγγειακές δομές σχηματίζονται de novo μέσω της μετατροπής των μεσεγχυματικών κυττάρων σε αιμαγγειοβλάστες. Τα μικρότερα αγγεία εκφύονται διακλαδιζόμενα από τα μεγαλύτερα μέσω της παραγωγής νέων ενδοθηλιακών κυττάρων, μια διαδικασία γνωστή ως δευτερογενής αγγειογένεση (angiogenesis)<sup>164</sup>.

Στον ενήλικα φυσιολογικά η αγγειογένεση ενεργοποιείται σε συνθήκες όπως στο γυναικείο καταμήνιο κύκλο και κατά την επούλωση των τραυμάτων<sup>165</sup>. Η διαδικασία αυτή όμως εμπλέκεται και στην παθογένεια πολλών νόσων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια<sup>166</sup>. Αναμφισβήτητα όμως η αγγειογένεση ρυθμίζει την επιβίωση, την ανάπτυξη και το μεταστατικό δυναμικό των νεοπλασματικών κυττάρων<sup>167</sup>.

#### 4.2. Μηχανισμοί αγγειογένεσης-Αγγειογενετικοί παράγοντες

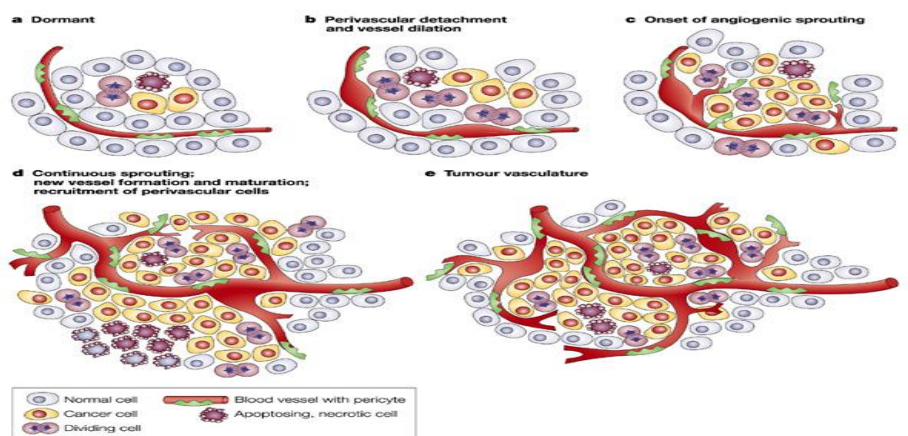
Παρ' όλο που αρχικά είχε θεωρηθεί ότι η εμβρυική αγγειογένεση (vasculogenesis) περιορίζεται μόνο κατά την εμβρυική ηλικία, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (endothelial precursors cells) προσελκύονται σε περιοχές in situ ανάπτυξης αγγείων όπως στα σημεία εμφάνισης των όγκων<sup>168</sup>. Αρκετοί αυξητικοί παράγοντες έχουν την δυνατότητα να προσελκύσουν αυτά τα κύτταρα από το μυελό των οστών σε περιοχές νεοαγγείωσης<sup>169</sup>. Πρώτοι οι Greenblatt and Shubi καθώς και οι Ehrmann and Knoth πραγματοποίησαν πειραματικές μελέτες και απέδειξαν ότι η αγγειογένεση προάγεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα του μελανώματος και του χοριοκαρκινώματος μέσω της παραγωγής συγκεκριμένων ουσιών<sup>170,171</sup>. Επίσης σε μια σειρά από κακοήθεις όγκους (μελάνωμα, καρκίνος μαστού, ωοθηκών, προστάτη, πνεύμονα, νεφρού) έχει αποδειχθεί ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα μιμούνται τη συμπεριφορά των ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων και έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν νεοαγγεία που αποτελούνται όχι από ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά από καρκινικά κύτταρα<sup>172</sup>. Η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται αγγειογενετική μίμηση (vasculogenic mimicry) και μολονότι σπάνια σχετίζεται με κακή πρόγνωση.

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ενδοογκική αγγειογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία ρυθμιζόμενη από διάφορα μόρια που προάγουν ή αναστέλλουν την αγγειογένεση<sup>173</sup>. Φαίνεται ότι οι παραπάνω παράγοντες βρίσκονται σε διαρκή ισορροπία και μέσω της ύπαρξης ενός 'αγγειογενετικού διακόπτη' ρυθμίζεται η έναρξη ή ο τερματισμός της διαδικασίας<sup>174</sup> (**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση του αγγειογενετικού διακόπτη

Η διαδικασία της αγγειογένεσης περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα περικύτταρα και την βασική μεμβράνη, την διείσδυση και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά μήκος μιας νέας βασικής μεμβράνης, την ομαδοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την διαμόρφωση των τριχοειδών, τις αναστομώσεις μεταξύ των τριχοειδών, την επαναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τέλος το σχηματισμό του αυλού του νεοδημιουργηθέντος αγγείου<sup>175</sup> (Εικόνα 15).

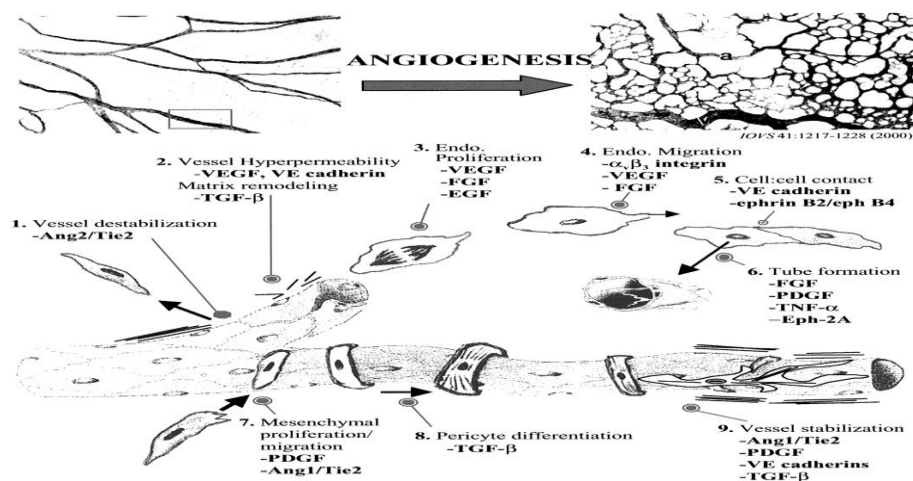


Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση της αγγειογενετικής διαδικασίας

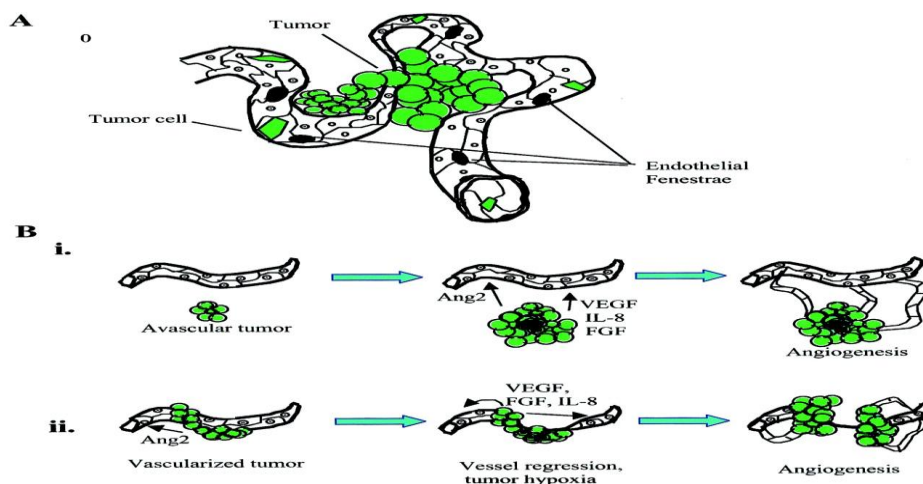
Η έναρξη της αγγειογένεσης υποκινείται από συγκεκριμένους παράγοντες οι οποίοι ανακαλύφθηκαν μόλις την τελευταία δεκαετία<sup>165</sup>. Στην κατηγορία αυτοί ανήκουν ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), οι

αγγειοποιητίνες, ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας (TGF), ο TNF- $\alpha$ , ο PDGF, μέλη της οικογένειας του FGF και οι ιντερλευκίνες<sup>176</sup>. Επιπρόσθετα η διαδικασία επάγεται από μηχανισμούς όπως η αλληλεπίδραση των κυττάρων μεταξύ τους καθώς και με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες<sup>177</sup> (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Ο ρόλος των αγγειογενετικών παραγόντων στη φυσιολογική αγγειογένεση. (Pappeti et al, 2002)

Είναι γεγονός ότι πολλοί συμπαγείς όγκοι περιλαμβάνουν μια κεντρική περιοχή νέκρωσης η οποία συνήθως είναι το αποτέλεσμα υποξίας. Θεωρείται ότι η υποξία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της αγγειογένεσης μέσω κυρίως της δράσης του VEGF<sup>178</sup> (Εικόνα 17). Επιπλέον η υποξία προκαλεί τη μετάλλαξη συγκεκριμένων γονιδίων όπως το p53 και έτσι διεγείρεται η έκκριση VEGF από τα καρκινικά κύτταρα<sup>179</sup>. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν την ύπαρξη VEGF mRNA σε κακοήθη νευρικά κύτταρα ενώ νεοαγγεία παρατηρήθηκαν εγγύς των κυττάρων αυτών<sup>180</sup>.



Εικόνα 17. Η διαδικασία της καρκινικής αγγειογένεσης

Ο FGF ήταν ο πρώτος αγγειογενετικός παράγοντας που ανακαλύφθηκε από τον Folkman το 1970<sup>181</sup>. Επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση τους και τελικά το σχηματισμό διαφοροποιημένων νεοαγγείων<sup>182</sup>. Επίσης ο FGF διεγείρει τη δράση των ηπαρινασών οι οποίες με τη σειρά τους επάγουν την αγγειογένεση<sup>183</sup>. Συνοπτικά οι επαγωγείς της αγγειογένεσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2.** Αγγειογενετικοί παράγοντες

Παράγοντας	MW (kDa)
Acidic fibroblast growth factor (aFGF, FGF1)	17.5
Angiogenin	16.6
Angiopoietin-1	57.5
Angiopoietin-2	56.9
Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF2)	17.3
Ephrin-A1	23.8
Ephrin-B1	38.0
Ephrin-B2	36.9

Epidermal growth factor(EGF)	134
Granulocyte colony-stimulating factor(GCSF)	16.3
Macrophage-granulocyte colony-stimulating factor(GM-CSF)	16.3
Hepatic growth factor (HGF, scatter factor)	83.1
Interleukin-8 (Il-8, CXCL8)	11.1
Leptin	18.6
Placental growth factor(PlGF)	24.8
Platelet-derived endothelial growth factor (PD-EGF)	50.0
Platelet-derived growth factor-A (PDGF-A)	24.0
Platelet-derived growth factor-B (PDGF-B)	27.3
Transforming growth factor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )	17.0
Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	44.3
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )	25.6
Vascular endothelial growth factor (VEGF-A)	46.0
VEGF-B	21.6
VEGF-C	46.9
VEGF-D	40.4

---

### 4.3. Αναστολείς της αγγειογένεσης

Στους αναστολείς της αγγειογένεσης συμπεριλαμβάνονται τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς παράγοντες<sup>184</sup>. Υπάρχουν 4 μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν οι αναστολείς<sup>185</sup>:

- Παρεμπόδιση της απελευθέρωσης ουσιών που δρουν ως ενεργοποιητές της αγγειογένεσης. Με τον τρόπο αυτό δρουν οι ιντερφερόνες  $\alpha$  και  $\beta$  οι οποίες αναστέλλουν την παραγωγή του bFGF

- Εξουδετέρωση αγγειογενετικών παραγόντων . Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει το αντίσωμα κατά του VEGF.
- Παρεμπόδιση της δράσης παραγόντων όπως η θρομβοσπονδίνη και η αγγειοστατίνη, μέσω της πρόσδεσης σε υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Αναστολή των ιδιοτήτων των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας. Με τον μηχανισμό αυτό δρα ο αναστολέας BB-94.

Έρευνες τόσο in vitro όσο και in vivo έχουν αποδείξει ότι ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση έχουν οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες βλεομυκίνη, βινκριστίνη, μεθοτρεξάτη, ταμοξιφένη και κλομιφένη, κυρίως μέσω της αναστολής της δράσης των bFGF και VEGF<sup>186,187,188</sup>. Η δράση του αντιβιοτικού λινομίδη έγκειται στο γεγονός ότι αναστέλλει τον σχηματισμό των νέων αγγείων αφήνοντας ανέπαφα τα ήδη σχηματισμένα αγγεία<sup>189</sup>. Στον καρκίνο του προστάτη μελέτες έδειξαν ότι η λινομίδη μειώνει την μικροαγγειακή πυκνότητα του όγκου, ενώ αναστέλλει και την απελευθέρωση των TNFα και VEGF από τα προστατικά καρκινικά κύτταρα<sup>190,191</sup>.

Η φουμαγιλίνη είναι ένας αναστολέας του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus fumigates* Fresenius<sup>192</sup>. Ωστόσο η χρησιμοποίησή της σε κλινικές δοκιμές στον καρκίνο του προστάτη έχει μέχρι τώρα αντιφατικά αποτελέσματα<sup>193</sup>.

Η μινουκυκλίνη παρεμβαίνει στην αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας ενώ η σουραμίνη αναστέλλει τη σύνδεση πολλών αγγειογενών παραγόντων, όπως ο bFGF, με τον υποδοχέα τους<sup>194,195</sup>. Η αγγειοστατίνη είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αγγειογένεσης μέσω της αναστολής της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>196</sup>. Η χρησιμοποίησή της σε



πειραματικές μελέτες απέδειξε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των προστατικών καρκινικών κυττάρων<sup>197</sup>. Παρόμοιο μηχανισμό δράσης έχει και η ενδοστατίνη, αναστέλλοντας επιπλέον και την δράση του VEGF<sup>198</sup>.

Ουσίες με ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση είναι και οι ιντερφερόνες α και β<sup>199</sup>. Μελέτες στο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη απέδειξαν ότι οι ουσίες αυτές καταστέλλουν την παραγωγή του bFGF ελαττώνοντας ταυτόχρονα το μεταστατικό δυναμικό των όγκων<sup>200</sup>. Με παρόμοιο μηχανισμό δρα και η θρομβοσπονδίνη η οποία αναστέλλει την αγγειογένεση in vivo και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων in vitro<sup>201</sup>.

Οι αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών (TMP-1, TMP-2) αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση προστατικών καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής της δυνατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων να εισέρχονται στην εξωκυττάρια ουσία<sup>202</sup>. Η θαλιδομίδη έχει γνωστές αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες οι οποίες ήταν υπεύθυνες και για την τερατογόνο της δράση όταν χορηγούνταν παλαιότερα κατά την εγκυμοσύνη<sup>203</sup>. Μελέτες χρησιμοποίησης της στον ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη είναι σε εξέλιξη με τα πρώτα αποτελέσματα να είναι ενθαρρυντικά<sup>204</sup>.

Τέλος, οι αναστολείς των τυροσινικών κινασών όπως η σοραφενίμπη και η σουνιτινίμπη έχουν αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες αναστέλλοντας τη δράση του VEGF<sup>205</sup>. Συνοπτικά οι αναστολείς της αγγειογένεσης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

**Πίνακας 3.** Αναστολείς της αγγειογένεσης

Inhibitor	Description	MW (kDa)
<b>(A) Derived from the extracellular matrix</b>		
Anastellin	Fragment of fibronectin	263
Arresten	Fragment of type IV collagen $\alpha$ 1 chain	161
Canstatin	Fragment of type IV collagen $\alpha$ 2 chain	168
Chondromodulin-1	Secreted cartilage glycoprotein	37.1
EFC-XV	Endostatin-like fragment from type XV collagen	142
Endorepellin	Fragment of perlecan, a basement membrane-specific heparan-sulfate-proteoglycan core protein	469
Endostatin	Fragment of collagen type XVIII (residues 1334–1516)	154
Fibulin fragments	Fibulins 1–5 are secreted extracellular matrix and basement membrane proteins	$\approx$ 77
Thrombospondin-1 and -2	Extracellular matrix glycoproteins that are proteolyzed to produce anti-angiogenic proteins; Tsp-1 was the first recognized naturally occurring angiogenesis inhibitor	129
Tumstatin	Fragment of type IV collagen $\alpha$ 3 chain	162
<b>(B) Non-matrix derived factors</b>		
Angiostatin	Fragment of plasminogen (residues 98–465)	90.6
Antithrombin III (cleaved)	Fragment of antithrombin III	52.6
Hemopexin-like domain (PEX)	Fragment of MMP-2	73.9
Interferon- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$	Cytokines	$\approx$ 22
Interleukin-1, -4, -12, -18	Cytokines	$\approx$ 17
2-Methoxyestradiol	Endogenous estrogen metabolite	
Pigment epithelium-derived factor (PEDF)	Growth factor	46.3
Plasminogen kringle-5	Fragment of angiostatin/plasminogen	90.6
Platelet factor-4	Released by platelets	10.8
Prolactin fragments	8- and 16-kDa fragments of prolactin	25.9
Prothrombin kringle-2	Fragment of prothrombin	70.0

#### 4.4. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

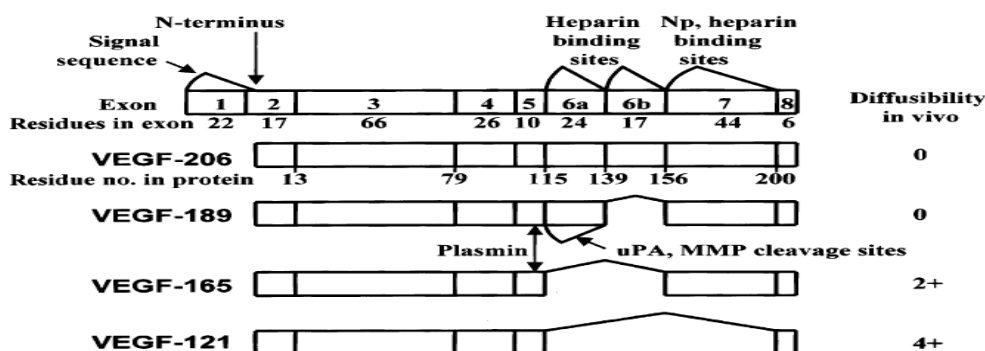
Ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF-Vascular Endothelial Growth Factor) γνωστός και ως παράγοντας « αγγειακής διαπερατότητας» (vascular permeability factor –VPF) είναι μια κυτοκίνη με ισχυρή αγγειογενετική δράση<sup>206</sup>. Θεωρείται ως ο κύριος ρυθμιστής της φυσιολογικής και της παθολογικής αγγειογένεσης.

Ο VEGF ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που αποτελείται από επτά μέλη. Πρόκειται για τους VEGF-A (ή VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F και τον πλακουντιακό αυξητικό παράγοντα (Placental growth factor-PIGF)<sup>207</sup>. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μια ομόλογη περιοχή στη δομή τους με διαφορετική ωστόσο βιολογική δράση<sup>208</sup>. Το 1983 οι Senger et al. ήταν οι πρώτοι οι οποίοι απομόνωσαν μια πρωτεΐνη από το ασκитικό υγρό ενός πειραματόζωου με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η οποία είχε την ιδιότητα να αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα. Ονόμασαν την πρωτεΐνη αυτή παράγοντα αγγειακής διαπερατότητας (VPF)<sup>209</sup>. Το 1989 οι Ferrara et al. απομόνωσαν μια πρωτεΐνη που παράγονταν από τα υποφυσιακά κύτταρα και η οποία ασκούσε μιτωγόνο δράση σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>210</sup>. Η ακολουθία στο αμινοτελικό άκρο ήταν Ala-Pro-Met-Ala-Glu και ονομάστηκε αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Οι Gospodarowicz et al. επίσης απομόνωσαν τον ίδιο παράγοντα με τις ίδιες βιολογικές ιδιότητες<sup>211</sup>. Επιπλέον, οι Conolly et al. απομόνωσαν τον VPF από καλλιέργειες καρκινικών ηπατοκυττάρων και απέδειξαν ότι ο παράγοντας αυτός προκαλούσε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>212</sup>. Η ακολουθία στο αμινοτελικό άκρο ήταν ίδια με τον παράγοντα που περιέγραψαν οι Ferrara και Gospodarowicz και έτσι αποδείχθηκε ότι οι VEGF και VPF ήταν η ίδια πρωτεΐνη. Οι ισχυρές αγγειογενετικές ιδιότητές του συγκεκριμένου παράγοντα αποδείχθηκαν και από πειράματα σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων ποντικού που έγιναν την ίδια χρονιά<sup>213,214</sup>.

#### 4.4.1. Γονίδιο-Πρωτεϊνική δομή

Ήδη από τις αρχικές αυτές μελέτες αποδείχθηκε ότι ο VEGF (VEGF-A) είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 46 kDa. Το γονίδιο του VEGF

εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6p21.3 και αποτελείται από οκτώ εξόνια και επτά εντρόνια<sup>215</sup>. Με εναλλακτικό μάτισμα του mRNA προκύπτουν οι εννέα διαφορετικές ισομορφές του VEGF ( VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165b</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) οι οποίες έχουν 121, 145, 148, 162, 165, 165, 183, 189, 206 αμινοξέα αντίστοιχα<sup>216</sup> (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Οι κυριότερες ισομορφές του VEGF

Η επικρατέστερη ισομορφή είναι ο VEGF<sub>165</sub> ακολουθούμενη από τον VEGF<sub>189</sub> και VEGF<sub>121</sub>. Οι Muller et al. χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφικές μεθόδους έδειξαν ότι ο VEGF σχηματίζει ένα διμερές αποτελούμενο από δύο δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των Cys51 και Cys60<sup>217,218</sup>.

Ο VEGF-B αποτελείται από 2 ισομορφές (VEGF-B<sub>167</sub> και VEGF-B<sub>186</sub>) οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα του mRNA ενός γονιδίου που αποτελείται από 7 εξόνια<sup>219</sup>. Επικρατέστερη ισομορφή είναι η VEGF-B<sub>167</sub>. Η τρισδιάστατη μορφή του VEGF-B είναι σχεδόν ίδια με του VEGF σχηματίζοντας ένα διμερές ενωμένο με δισουλφιδικός δεσμούς<sup>220</sup>.

Ο VEGF-C είναι και ένα επίσης διμερές και αποτελείται από 388 αμινοξέα που προκύπτουν από μια πρόδρομη πρωτεΐνη μετά από μια πρωτεολυτική διαδικασία<sup>221</sup>. Η διαφορά με τα 2 προηγούμενα μόρια είναι ότι στερείται

δισουλφιδικών δεσμών<sup>222</sup>.

Ο VEGF-D είναι ένα διμερές που προκύπτει και αυτό από μια πρωτεολυτική διαδικασία από το πρόδρομο μόριο<sup>223</sup>. Το γονίδιο βρίσκεται στο X χρωμόσωμα και αποτελείται από 7 εξόνια<sup>224</sup>.

Ο PlGF είναι μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από τα ίδια αμινοξέα με τον VEGF σε ποσοστό 45%<sup>225</sup>. Η τρισδιάστατη δομή του είναι παρόμοια με τον VEGF σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς<sup>226</sup>. Υπάρχουν 4 ισομορφές (PlGF<sub>131, 152, 203, 224</sub>) με κυριότερες τις PlGF<sub>152</sub> και PlGF<sub>224</sub><sup>227</sup>.

Οι VEGF-E και VEGF-F και απαντώνται στα κύτταρα του ιού της ευλογιάς και στα δηλητήρια των φιδιών αντίστοιχα, ενώ δεν υπάρχουν στα ανθρώπινα κύτταρα<sup>228,229</sup>. Μελέτες κατέδειξαν ότι ο VEGF-E ενισχύει την αγγειογένεση στα σημεία που εντοπίζονται οι αλλοιώσεις από την δράση του ιού ενώ ο VEGF-F έχει 5 φορές ισχυρότερη αγγειογενετική δράση από τον VEGF<sup>230</sup>.

#### 4.4.2 Βιολογικές δράσεις-Ρύθμιση παραγωγής

Στην διαδικασία τόσο της φυσιολογικής όσο και της παθολογικής αγγειογένεσης εμπλέκονται πολλοί παράγοντες. Όπως προαναφέρθηκε, κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία αυτή κατέχει η οικογένεια του VEGF. Μελέτες σε πειραματόζωα στα οποία απουσίαζε ο VEGF έδειξαν ότι παρατηρείται αναστολή της αγγειογένεσης ενώ πεθαίνουν κατά τις 8 πρώτες ημέρες της κύησης<sup>231</sup>. Φαίνεται λοιπόν ότι ο VEGF επάγει την διαφοροποίηση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων προς ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα<sup>232</sup>. Επιπλέον ενισχύει την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μονοκυττάρων ενώ υπεισέρχεται και στην διαδικασία της διείσδυσης των ενδοθηλιακών κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια

ουσία μέσω της απελευθέρωσης ενζύμων όπως ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, ο υποδοχέας της ουροκινάσης, καθώς επίσης και κολλαγενάσες και μεταλλο-πρωτεΐνάσες<sup>233,234,235</sup>.

Ο μηχανισμός δράσης του VEGF (VEGF-A) δεν είναι καλά ξεκαθαρισμένος ωστόσο φαίνεται ότι η σύνδεση του VEGF με τους υποδοχείς του οδηγεί σε υδρόλυση της ινοσιτόλης, η οποία επάγει τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων με αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>236</sup>. Ο VEGF επίσης διεγείρει την διαδικασία της αγγειοδιαστολής μέσω της επαγωγής του σχηματισμού της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου-ENOS (endothelial nitric oxide synthase) και της επακόλουθης αύξησης της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου<sup>237</sup>. Επίσης προωθεί την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κυρίως μέσω της έκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Bcl-2 και η A1 και της ενεργοποίησης της φωσφατιδοϊνοσιτόλης-3-κινάσης (PI3kinase/Akt)<sup>238</sup>. Επιπλέον ο VEGF ασκεί μιτωγόνο δράση στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, στα κύτταρα του Schwann ενώ έχει και νευροπροστατευτική δράση στα κινητικά νευρικά κύτταρα<sup>239</sup>. Έχει επίσης αιμοποιητική δράση επάγοντας το σχηματισμό αποικιών από μακροφάγα και κοκκιοκύτταρα ενώ ρυθμίζει την επιβίωση των αρχεγόνων αιμοποιητικών κυττάρων και προκαλεί χημειοτξία των μονοκυττάρων<sup>240</sup>. Τέλος φαίνεται να εμπλέκεται και στον πηκτικό μηχανισμό μέσω της ιδιότητας του να επάγει την παραγωγή του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου<sup>241</sup>.

Ποσοτικές μετρήσεις έδειξαν ότι η έκφραση του VEGF είναι αυξημένη στα περισσότερα νεοπλάσματα και κυρίως στα νεοπλάσματα του μαστού, του εντέρου, του πνεύμονα και του προστάτη<sup>242</sup>. Στα νεοπλάσματα, ο VEGF παράγεται τόσο από τα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Φαίνεται επίσης ότι ο VEGF που παράγεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα έχει παρακρινική δράση

στα παρακείμενα ενδοθηλιακά κύτταρα<sup>243</sup>. Επιπλέον, οι Dvorak et al. ανακάλυψαν ότι αυξημένες συγκεντρώσεις VEGF εντοπίζονται μόνο στα αγγεία που είναι σε απόσταση < 0,5 mm από το νεόπλασμα<sup>244</sup>.

Ο VEGF-B έχει βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στην καρδιά, κεντρικό νευρικό σύστημα, στους νεφρούς, τους όρχεις καθώς και στον καρκίνο του θύμου, του μαστού, στο λέμφωμα και στο μελάνωμα<sup>245,246</sup>. Η έλλειψη του VEGF-B σε πειραματόζωα σχετίζεται με διαταραχές της καρδιακής λειτουργίας. Φαίνεται λοιπόν ότι ο VEGF-B είναι απαραίτητος για την φυσιολογική καρδιακή λειτουργία ωστόσο δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται στην διαδικασία της καρδιαγγειακής ανάπτυξης και της αγγειογένεσης<sup>247</sup>.

Ο VEGF-C έχει βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στους νεφρούς, στους πνεύμονες, στο πάγκρεας, στους όρχεις, στον σπλήνα και στον προστάτη<sup>248</sup>. Επιπλέον έχει ανακαλυφθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στα μεσεγχοματικά κύτταρα εμβρύων<sup>249</sup>. Εκφράζεται επίσης σε μια σειρά από νεοπλασμάτα όπως στον καρκίνο του μαστού, του τραχήλου, του εντέρου, του πνεύμονα του στομάχου και του προστάτη<sup>250</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο VEGF-C εμπλέκεται στην λεμφαγγειογένεση τόσο κατά την εμβρυική όσο και κατά την ενήλικη ζωή<sup>251</sup>. Η σημασία του VEGF-C φάνηκε και από μελέτες σε πειραματόζωα με έλλειψη του VEGF-C οι οποίες έδειξαν ότι όλα πέθαιναν ενδομήτρια ενώ ταυτόχρονα παρουσίαζαν και λεμφοίδημα<sup>252</sup>.

Ο VEGF-D έχει βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο έντερο, στην καρδιά, τους πνεύμονες και τους μυς ενώ σε χαμηλές ποσότητες εντοπίζεται στις ωθήκες, το πάγκρεας, τον προστάτη, τον σπλήνα και τους όρχεις<sup>253</sup>. Υπερέκφραση του VEGF-D απαντάται στον καρκίνο του μαστού, του εντέρου, του στομάχου, του θυρεοειδή όπως επίσης και στο μελάνωμα<sup>254,255,256</sup>. Η έλλειψη του VEGF-D έχει βρεθεί ότι είναι συμβατή με τη ζωή ενώ δεν φαίνεται να διαταράσσεται η λεμφαγγειογένεση<sup>257</sup>.

Τέλος μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές από τις δράσεις του VEGF-D υπερκαλύπτονται από τον VEGF-C.

Ο PlGF απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον πλακούντα όπως επίσης στην καρδιά, τους μύες, το δέρμα και τον αμφιβληστροειδή καθώς και στον καρκίνο του μαστού, του στόμαχου, του πνεύμονα και του προστάτη<sup>258</sup>. Η απουσία του PlGF είναι συμβατή με τη ζωή, ωστόσο παρουσιάζονται διαταραχές της αγγειογένεσης στον αμφιβληστροειδή<sup>259</sup>.

Πολλοί φυσικοί μηχανισμοί φαίνεται να ρυθμίζουν την παραγωγή του VEGF. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η υποξία, αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες καθώς και άλλες κυτοκίνες<sup>207</sup>. Αναμφισβήτητα όμως η υποξία παίζει τον σπουδαιότερο ρόλο στην επαγωγή της παραγωγής του VEGF. Είναι γνωστό ότι σε καταστάσεις υποξίας αυξάνεται η παραγωγή πολλών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων διαφόρων ενζύμων, της ερυθροποιητίνης και του VEGF<sup>260</sup>. Η οικογένεια του HIF (Hypoxia Inducible Factor) κατέχει κεντρικό ρόλο στην διαδικασία αυτή<sup>261</sup>. Ο HIF είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δύο υπομονάδες, τον HIF-1a και τον HIF-1b<sup>262</sup>. Η έκφραση του HIF-1b δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την συγκέντρωση του οξυγόνου σε αντίθεση με την έκφραση του HIF-1a του οποίου η έκφραση επάγεται από την υποξία. Σε νορμοξικές συνθήκες ο HIF-1a καταβολίζεται από το σύμπλεγμα της ουβικουΐτινης, στο οποίο ανήκει και το “προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του von Hippel-Lindau”(pVHL)<sup>263</sup>. Σε συνθήκες υποξίας όμως το pVHL δεν συνδέεται με τον HIF-1a με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η πρωτεολυτική διαδικασία και να αυξάνονται τα επίπεδα του HIF-1a<sup>264</sup>. Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο του VHL σχετίζονται με αυξημένη αγγειογένεση και τα νεοπλάσματα στα οποία εμφανίζονται οι παραπάνω μεταλλάξεις έχουν αυξημένη έκφραση του VEGF<sup>265</sup>. Επιπλέον η υποξία επάγει την σύνδεση του HIF-1a C-terminal



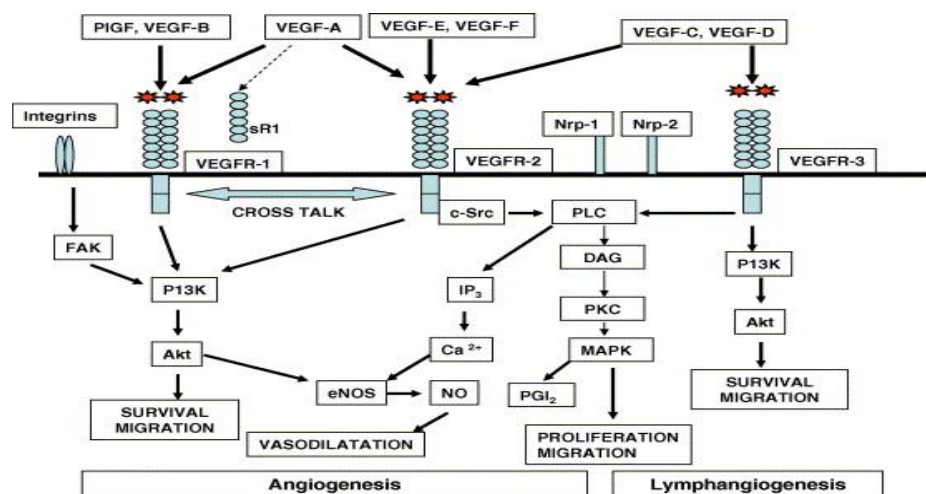
transactivation domain (C-TAD) με μεταγραφικούς ενεργοποιητές όπως ο p300 και ο CBP( CRE Binding Protein) με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα του HIF-1α και συνεπώς να επάγεται η αγγειογένεση<sup>266</sup>. Σε συνθήκες υποξίας τέλος επάγεται και η έκφραση των γονιδίων των VEGF, VEGF-C και PlGF<sup>267</sup>. Σημαντικό ρόλο στην έκφραση του VEGF έχουν επίσης και οι αυξητικοί παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο Heparin – binding epidermal growth factor-like growth factor ( HB-EGF ), ο PDGF, ο TGF-β, ο TNFα, ο IGF-1 καθώς και κυττοκίνες όπως οι IL-1, IL-2, IL-6 και INF-α<sup>268,269,270,271,272</sup>. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής του VEGF έχουν ορμόνες όπως η ινσουλίνη, η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH), η προγεστερόνη και η τεστοστερόνη<sup>273,274,275,276,277</sup>. Πολλά ογκογονίδια επίσης, με κυριότερα τα H-Ras και K-Ras έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην επαγωγή της αγγειογένεσης σε μια σειρά από νεοπλάσματα<sup>278,279,280</sup>.

Τέλος, σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος των προσταγλαδινών στην αγγειογενετική διαδικασία, η έκφραση των οποίων επάγεται από την κυκλοοξυγενάση -2 (COX-2)<sup>281</sup>. Η COX-2 ενεργοποιεί τον καταρράκτη της MAP κινάσης με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF<sup>282</sup>. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις παραπάνω διαδικασίες δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένοι ωστόσο φαίνεται ότι η ρύθμιση της παραγωγής του VEGF επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες στενά συνδεδεμένους μεταξύ τους.

#### 4.4.3. Υποδοχείς του VEGF

Ο VEGF εκδηλώνει τις βιολογικές του δράσεις συνδεδεμένος με 3 υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των τυροσινικών κινασών. Πρόκειται για τους VEGFR-1(Flt-1, fms-like tyrosyl kinase-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR, Fetal liver

kinase-1/Kinase Domain-containing Receptor) και VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4, Flt4). Την τελευταία δεκαετία έχει βρεθεί ότι ο VEGF αλληλεπιδρά και με μια οικογένεια μορίων που ονομάζονται νευροφιλίνες (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση των υποδοχέων του VEGF. (Roy H, FEBS Lett. 2006)

## VEGFR-1

Ο VEGFR-1 έχει μοριακό βάρος 210 kDa και το γονίδιο του βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13q12<sup>283</sup>. Εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του πλακούντα, τους οστεοβλάστες, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού και τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα<sup>284</sup>. Συνδέεται με τους VEGF-A, VEGF-B και PlGF ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι είναι ισχυρότερος υποδοχέας σε σχέση με τον VEGFR-2<sup>285</sup>. Ο σημαντικός του ρόλος στην εμβρυογένεση έχει φανεί από πειράματα σε ποντίκια με έλλειψη του VEGFR-1 τα οποία πέθαιναν πρόωρα κατά την ενδομήτρια ζωή<sup>286</sup>.

Η ενεργοποίηση του VEGFR-1 δεν έχει άμεση μιτωγόνο δράση ωστόσο έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου και τη χημειοταξία των μονοκυττάρων ενώ η σύνδεση του VEGF με

τον VEGFR-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν οδηγεί σε ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρά μόνο αν είναι παρών ο VEGFR-2 με τον οποίο σχηματίζει ένα ισχυρό διμερές μόριο<sup>287,288</sup>. Επιπλέον, με εναλλακτικό μάτισμα του VEGFR-1 pre-mRNA δημιουργείται μια διαλυτή μορφή του VEGFR-1 η οποία συνδέεται με τον VEGF και αναστέλλει τη δράση του<sup>289</sup>. Οι VEGF και PlGF ενεργοποιούν τον υποδοχέα με διαφορετικούς μηχανισμούς στους οποίους εμπλέκονται η φωσφορυλίωση και η αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα και οι οποίοι, μέχρι σήμερα, δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένοι<sup>290</sup>. Τέλος σε αντίθεση με τον VEGFR-2 η έκφραση του VEGFR-1 επάγεται από την υποξία<sup>291</sup>.

## VEGFR-2

Ο VEGFR-2 συνδέεται με τον VEGF-A (ισομορφές 110-165 αμινοξέων) καθώς και με τους VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E<sup>292</sup>. Έχει μοριακό βάρος 210 kDa και αποτελεί τον κυρίαρχο διαμεσολαβητή για την επαγόμενη από τον VEGF διαδικασία μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>293</sup>. Εκφράζεται από τα αρχέγονα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα παγκρεατικά κύτταρα των πόρων, τα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς καθώς και τα μεγακαρυοκύτταρα<sup>294</sup>.

Η σύνδεση του VEGF με τον VEGFR-2 έχει σαν αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών όπως της φωσφολιπάσης-C και της PI3 κινάσης ενώ η επαγόμενη από το σύμπλεγμα VEGF/VEGFR-2 αγγειογένεση φαίνεται να οφείλεται στην σύνδεση του υποδοχέα με την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$ <sup>295,296</sup>. Τέλος ο ρόλος της διαλυτής μορφής του VEGFR-2 είναι ακόμη υπό διερεύνηση<sup>297</sup>.

### VEGFR-3

Ο VEGFR-3 συνδέεται με τους VEGF-C και VEGF-D και έχει μοριακό βάρος 170 kDa<sup>298</sup>. Απαντάται σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την εμβρυική ηλικία , ωστόσο στους ενήλικες η παρουσία η έκφραση του περιορίζεται στα λεμφαγγεία<sup>299</sup>.

Ο ρόλος του στην λεμφαγγειογένεση φάνηκε από μελέτες μεταλλάξεων του υποδοχέα , οι οποίες απέδειξαν ότι επί απουσίας του VEGFR-3 αναπτύσσεται λεμφοίδημα ( Milroy's disease). Εξάλλου είναι ο μοναδικός υποδοχέας του VEGF στον οποίο απαντώνται φυσικές μεταλλάξεις<sup>300</sup>. Σε καλλιέργειες εμβρυικών κυττάρων η υποξία επάγει την παραγωγή του VEGFR-3 ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι οι VEGFR-2 και VEGFR-3 σχηματίζουν ετεροδιμερή μόρια με ισχυρή αγγειογενετική δράση<sup>301,302,303</sup>.

### Νευροφιλίνες

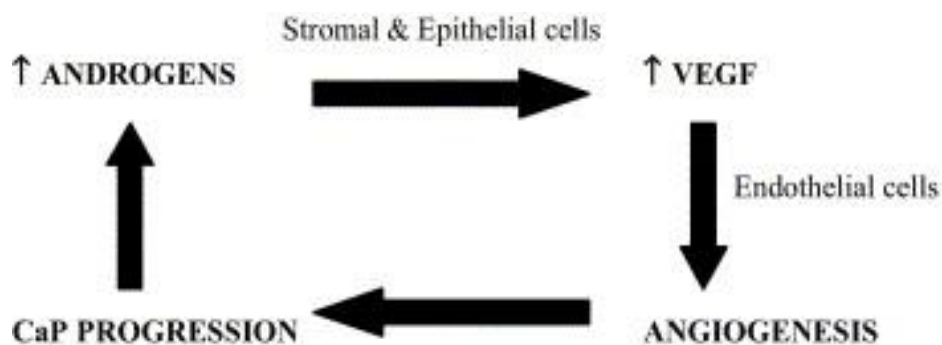
Οι νευροφιλίνες Nrp-1 και Nrp-2 παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ τελευταία βρέθηκε ότι εμπλέκονται και στους μηχανισμούς της αγγειογένεσης<sup>304</sup>. Πιο συγκεκριμένα η Nrp-1 συνδέεται με τους VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-B και τον PlGF ενώ η Nrp-2 συνδέεται με τους VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-C και PlGF. Η Nrp-1 δρά ως συνυποδοχέας επάγοντας την αλληλεπίδραση των VEGF/VEGFR-2 και σχηματίζει σύμπλεγμα με τον VEGFR-1<sup>305</sup>. Μελέτες απέδειξαν ότι η υπερέκφραση της Nrp-1 οδηγεί σε σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων και τριχοειδών και θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος μέσω της ρύθμισης της έκφρασης του VEGF-A<sup>306</sup>. Η Nrp-2 απαντάται κυρίως στις φλέβες και τα λεμφαγγεία ενώ μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις της Nrp-2 οδηγούν σε ανωμαλίες σχηματισμού των τελευταίων<sup>307</sup>.

Υπάρχουν επίσης ισχυρές ενδείξεις ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των νεοπλασμάτων ωστόσο ο ρόλος τους είναι ακόμη υπό διερεύνηση<sup>308</sup>.

#### 4.4.4. Ο VEGF στην υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη

Με βάση τα αποτελέσματα πολλών μελετών φαίνεται ότι ο VEGF και οι υποδοχείς υπεισέρχονται στη διαδικασία της υπερπλασίας και του καρκινώματος του προστάτη<sup>309,310</sup>. Πιο συγκεκριμένα, ο VEGF και οι υποδοχείς του εκφράζονται σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό στο καρκίνωμα από ότι στην υπερπλασία, ενώ και στις δύο καταστάσεις τα ποσοστά έκφρασης είναι σημαντικά υψηλότερα από τον φυσιολογικό προστάτη<sup>311</sup>. Στο καρκίνωμα η έκφραση του VEGF έχει συσχετιστεί με το στάδιο της νόσου, το Gleason score και την επιβίωση<sup>312</sup>. Με βάση αυτά τα δεδομένα αρκετοί ερευνητές έχουν διατυπώσει τη θεωρία ότι η εξαρτώμενη από τον VEGF αγγειογένεση ξεκινάει στην υπερπλασία και συνεχίζει να εξελίσσεται σταδιακά και στο καρκίνωμα του προστάτη<sup>313</sup>. Επιπλέον έχει προταθεί ότι ο VEGF έχει και μιτωγόνο δράση προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στρώματος στην καλοήγη υπερπλασία ενώ στο καρκίνωμα επάγεται ο πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων των αδενίων<sup>314</sup>. Ωστόσο η ακριβής διαδικασία δεν είναι ακόμη ξεκαθαρισμένη ενώ αρκετές μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα<sup>315</sup>.

Παράγοντες που επάγουν την έκφραση του VEGF στο καρκίνωμα του προστάτη είναι η υποξία, αυξητικοί παράγοντες-κυτοκίνες (FGF-2, PDGF, TNF, TGF- $\beta$ , IGF-1, IL-6), μεταλλάξεις συγκεκριμένων ογκογονιδίων ( p53, Ras, Pten) καθώς και τα ανδρογόνα (**Εικόνα 20**). Σε πειραματικές μελέτες, η στέρηση των ανδρογόνων έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έκφρασης του VEGF καθώς και πολλών άλλων αγγειογενετικών παραγόντων<sup>316</sup>.



Εικόνα 20. Ο ρόλος του VEGF στον καρκίνο του προστάτη. (Delongchamps NB, et al. Urology,2006)

Στις περισσότερες μελέτες αγγειογένεσης που αφορούν το καρκίνωμα του προστάτη έχουν χρησιμοποιηθεί οι δείκτες CD31, CD33, von Willebrand Factor καθώς και ο VEGF και οι υποδοχείς του<sup>317</sup>. Ωστόσο οι παραπάνω δείκτες φαίνεται ότι έχουν χαμηλή ειδικότητα και οι έρευνες για τον ιδανικό δείκτη συνεχίζονται<sup>318</sup>.

Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες οι οποίες προσπαθούν να συσχετίσουν τα επίπεδα του VEGF στην κυκλοφορία με παραμέτρους του προστατικού καρκίνου και φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων του VEGF και μεταστατικής νόσου-μειωμένης επιβίωσης<sup>319</sup>. Ωστόσο και σε αυτήν την περίπτωση τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα γεγονός που καθιστά δύσκολη την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη.

#### 4.4.5. Θεραπευτικές προοπτικές

Η κατανόηση του κεντρικού ρόλου του VEGF στη νεοπλασματική αγγειογένεση οδήγησε στη παραγωγή φαρμάκων με στόχο της αναστολή της δράσης του στα πλαίσια της προσπάθειας για αύξηση της επιβίωσης. Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι μονοκλωνικά αντισώματα που στρέφονται κατά του VEGF και του VEGFR-1 αναστέλλουν την ανάπτυξη του νεοπλάσματος και καθυστερούν την εμφάνιση μεταστάσεων. Αρχικά, μελέτες φάσης I χρησιμοποιώντας το SU5416, ένα μόριο που αναστέλλει τον VEGFR-2, σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη σε ασθενείς με

ορμονοάντοχο καρκίνο του προστάτη έδειξαν βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης.

Ωστόσο τα καλύτερα αποτελέσματα φάνηκαν από τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος κατά του VEGF, με την ονομασία bevacizumab (Avastin<sup>TM</sup> Genetech, Inc, San Francisco, CA) . Σε μελέτη φάσης II, η συγκεκριμένη ουσία είχε σημαντική αποτελεσματικότητα σε συνδυασμό με χορήγηση δοσιταξέλης στο 53-65% των ασθενών με ευνουχοάντοχο καρκίνο του προστάτη<sup>320</sup>. Οι πιο συχνές παρενέργειες που εμφανίζονται είναι η ουδετεροπενία και η ναυτία<sup>321</sup>. Υπάρχουν πολλές μελέτες σε εξέλιξη με σκοπό να εξετάσουν τον ρόλο του bevacizumab σε συνδυασμό με διάφορους κυτταροτοξικούς παράγοντες στην αντιμετώπιση του εντοπισμένου αλλά και του μεταστατικού καρκίνου του προστάτη<sup>322</sup>. Το 2012 παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα μελέτης φάσης III στην οποία φάνηκε ότι η χορήγηση bevacizumab, δοσιταξέλης και πρεδνισόνης μείωσε κατά 21% την πιθανότητα θανάτου από καρκίνο του προστάτη<sup>323</sup>. Επίσης σε εξέλιξη βρίσκεται μελέτη φάσης III στην οποία διερευνάται ο ρόλος του VEGF-trap , μιας πρωτεΐνης η οποία εμποδίζει τη σύνδεση του VEGF-A και του PlGF με τον υποδοχέα τους<sup>324</sup>.

Άλλες ουσίες με αντιαγγειογενετική δράση είναι οι αναστολείς των τυροσινικών κινασών με κυριότερους εκπροσώπους τις sorafenib, sunitinib και cediranib. Η sorafenib δρα αναστέλλοντας τους RAF kinase, VEGFR-2 και PDGFR-β. Έχει ήδη έγκριση στον καρκίνο του νεφρού και του ήπατος ενώ υπάρχουν μελέτες φάσης II στον καρκίνο του προστάτη οι οποίες δείχνουν βελτίωση της επιβίωσης σε ασθενείς με μεταστατική νόσο<sup>325,326</sup>.

Η sunitinib έχει δράση ενάντια στους VEGFR-2 και PDGFR-β και χρησιμοποιείται ήδη στον καρκίνο του νεφρού και στους όγκους του γαστρεντερικού συστήματος. Υπάρχουν σε εξέλιξη μελέτες φάσης III, ενώ σε μελέτες φάσης II φάνηκε ότι η sunitinib καθυστέρησε σημαντικά την εξέλιξη του μεταστατικού

καρκίνου του προστάτη<sup>327,328</sup>. Η cediranib μπλοκάρει τους υποδοχείς VEGFR-1 και VEGFR-2 ενώ μελέτες φάσης II έδειξαν ότι μειώνει σημαντικά το μέγεθος των μεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη<sup>329</sup>.

Η θαλιδομίδη έχει διπλό ρόλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του προστάτη αναστέλλοντας την έκκριση του VEGF και του FGF ενώ ταυτόχρονα διεγείρει τη έκκριση των T-λεμφοκυττάρων και των NK κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα. Μελέτες φάσης II στον καρκίνο του προστάτη έδειξαν ότι ο συνδυασμός της θαλιδομίδης με δοσιταξέλη ή LHRH ανάλογα προκάλεσε τη σημαντική μείωση του PSA και την υποστροφή των μεταστάσεων<sup>330,331</sup>.

Η λεναλιδομίδη έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με την θαλιδομίδη ωστόσο έχει λιγότερες παρενέργειες ενώ μελέτες φάσης II έδειξαν σημαντική αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη, όταν συνδυάζεται με bevacizumab, docetaxel και πρεδνισόνη<sup>332</sup>. Φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες ανταγωνίζονται τον υποδοχέα A της ενδοθηλίνης όπως οι Atrasentan και Zibotenan, έχουν δοκιμαστεί σε μελέτες καρκίνου του προστάτη ωστόσο τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα ενώ βρίσκονται σε εξέλιξη μελέτες φάσης III με σκοπό να αξιολογήσουν καλύτερα την αποτελεσματικότητά τους στην αντιμετώπιση της νόσου<sup>333,334</sup>.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι η στοχευμένη αντιαγγειογενετική θεραπεία αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου του προστάτη. Σίγουρα όμως χρειάζονται περισσότερες μελέτες που να αφορούν τόσο κάθε παράγοντα χωριστά όσο και συνδυαστικές θεραπείες. Ο στόχος θα πρέπει να είναι η εξατομικευμένη αντιμετώπιση της νόσου συνυπολογίζοντας και την πιθανή τοξικότητα των νέων φαρμακευτικών ουσιών.



#### 4.5. Μικροαγγειακή πυκνότητα (Microvessel Density-MVD)

Η μικροαγγειακή πυκνότητα θεωρείται ένας ποσοτικός δείκτης της αγγειογένεσης, εκφράζοντας τη μέση τιμή του αριθμού των αγγείων εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής όπως αυτή υπολογίζεται από μετρήσεις με τη χρήση μικροσκοπίου. Θεωρείται η μέθοδος εκλογής για την αξιολόγηση της αγγειογένεσης και έχει συσχετιστεί με αρκετές κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους σε διάφορα νεοπλάσματα<sup>335</sup>.

Πρώτοι οι Brem et al. το 1972 πρότειναν ένα σύστημα ποσοτικοποίησης της αγγειογένεσης των νεοπλασμάτων του εγκεφάλου καταγράφοντας τον αριθμό των πυρήνων των ενδοθηλιακών κυττάρων εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής<sup>336</sup>. Το 1988 οι Srivastava et al. μελέτησαν τον αριθμό των αγγείων σε μελανώματα και διαπίστωσαν θετική συσχέτιση του συγκεκριμένου αριθμού με την εμφάνιση μεταστάσεων<sup>337</sup>. Το 1991 οι Weidner et al περιέγραψαν μια νέα μέθοδο αξιολόγησης της μικροαγγειακής πυκνότητας. Αρχικά οι ερευνητές προσδιόριζαν τις περιοχές όπου με το οπτικό μικροσκόπιο εντοπιζόταν η μεγαλύτερη αγγειακή πυκνότητα και ονόμασαν αυτές τις περιοχές hot spot areas («θερμές περιοχές»). Ο εντοπισμός των παραπάνω περιοχών γινόταν χρησιμοποιώντας μικρή μεγέθυνση και ακολούθως γινόταν η καταμέτρηση σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (x200) και ανά οπτικό πεδίο (0,74 mm<sup>2</sup>)<sup>338</sup>. Βρέθηκε τότε ότι σε ιστολογικές τομές παραφίνης από νεοπλάσματα μαστού και προστάτη η μικροαγγειακή πυκνότητα ήταν ισχυρός προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση αυτών των ασθενών<sup>339</sup>. Μετά τις αρχικές αυτές μελέτες ακολούθησε μεγάλος αριθμός μελετών που αφορούσαν ένα μεγάλο αριθμό νεοπλασμάτων όπως το αδenoκαρκίνωμα του μαστού, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, το καρκίνωμα του παχέος εντέρου, το αδenoκαρκίνωμα του προστάτη και το καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως<sup>340,341,342,343,344,345</sup>. Πρόσφατες μελέτες

έδειξαν ότι η MVD σχετίζεται με την υποτροπή και αιματολογικών καρκίνων<sup>346</sup>.

Παρόλα αυτά και πάρα τα πολύ ενθαρρυντικά αρχικά αποτελέσματα, υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες δείχνουν ότι η MVD δεν συσχετίζεται με μην πρόγνωση των νεοπλασμάτων και θέτουν υπό αμφισβήτηση την αξία της MVD ως προγνωστικού δείκτη<sup>347,348</sup>. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα πιθανά οφείλονται στη διαφορετική μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, παράμετροι οι οποίες πιθανά διαφοροποιούν τα αποτελέσματα των μελετών και κάνουν δύσκολη τη σύγκριση είναι οι παρακάτω: η επιλογή του δείγματος, η μέθοδος μονιμοποίησης και διατήρησης του δείγματος, το αντίσωμα που επιλέγεται, η μέθοδος καταμέτρησης των αγγείων και η στατιστική ανάλυση<sup>349</sup>.

#### 4.5.1. Επιλογή αντισώματος

Το καταλληλότερο αντίσωμα για την ανάδειξη των νεοαγγείων είναι ένα θέμα στο οποίο δεν υπάρχει ομοφωνία στη βιβλιογραφία<sup>350</sup>. Τα κυριότερα αντισώματα που χρησιμοποιούνται είναι το CD31, το CD34 και το αντίσωμα κατά του von Willebrand factor (vWF)<sup>351</sup>. Τελευταία έχει τεκμηριωθεί και ο ρόλος του CD105 ως πιο ειδικού δείκτη αγγειογένεσης<sup>352</sup>.

Ο vWf εκφράζεται από τα μεγάλα αγγεία ενώ η έκφρασή του ποικίλει στα τριχοειδή και τα νεοσχηματισμένα αγγεία<sup>353</sup>. Ωστόσο ο vWf δεν είναι ειδικός δείκτης για τα αιμοφόρα αγγεία καθώς εκφράζεται και από τα λεμφαγγεία<sup>354</sup>. Το CD31 αν και είναι ο πιο ευαίσθητος ενδοθηλιακός δείκτης, η ειδικότητά του περιορίζεται από το γεγονός ότι εκφράζεται τόσο από τα μεγάλα όσο και τα μικρότερα αγγεία με την ίδια ένταση. Επιπλέον εκφράζεται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και τα καρκινικά κύτταρα<sup>355</sup>. Αρκετές μελέτες ωστόσο έχουν δείξει ότι το CD31 μπορεί να μην εκφράζεται κατά την ενδο-ογκική αγγειογένεση<sup>356</sup>. Το CD34

εκφράζεται από όλους τους τύπους των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>357</sup>. Ωστόσο η ειδικότητα του περιορίζεται από το γεγονός ότι εκφράζεται και από τα μεσεγχυματικά κύτταρα καθώς και από τα λεμφαγγεία<sup>358</sup>.

Η ενδογλίνη (CD105) είναι ένας υποδοχέας του TGFβ-1 και εκφράζεται έντονα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την ενδοογική αγγειογένεση<sup>359</sup>. Αντίθετα η έκφραση της από τα φυσιολογικά αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πολύ μικρή ή ανύπαρκτη. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδογλίνη είναι καλύτερος δείκτης από τους vWf, CD31, CD34 καθώς έχει μεγαλύτερη ειδικότητα στην σύνδεση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ δεν εκφράζεται από τα φλεγμονώδη και τα στρωματικά κύτταρα<sup>360,361,362,363,364,365</sup>. Φαίνεται λοιπόν ότι με τον τρόπο αυτό ελαττώνεται η ψευδώς θετική ανίχνευση νεοαγγείων που συχνά παρατηρείται με τους υπόλοιπους δείκτες.

Άλλοι δείκτες νεοαγγειογένεσης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα αντισώματα E-9, CD36, LM-609, Tie-2/Tek καθώς και ενδοθηλιακοί δείκτες όπως η α-ακτίνη<sup>366,367</sup>. Η χρήση τους δεν είναι τόσο διαδεδομένη και βρίσκονται σε εξέλιξη μελέτες με στόχο να καταδείξουν την χρησιμότητα τους ως δείκτες νεοαγγειογένεσης.

#### **4.5.2. Μέθοδοι καταμέτρησης των αγγείων**

Η συχνότερα εφαρμοζόμενη μέθοδος καταμέτρησης των αγγείων είναι αυτή που περιγράφηκε από τον Weidner το 1991. Όπως προαναφέρθηκε αρχικά επιλέγονται 1-5 περιοχές με την μεγαλύτερη συγκέντρωση αγγείων εντός του όγκου (hot-spots areas). Η επιλογή των περιοχών συνήθως γίνεται από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές σε μικρή μεγέθυνση (x40 ή x100) και ακολούθως γίνεται η καταμέτρηση των αγγείων σε μεγάλη μεγέθυνση (x400). Καταγράφεται τόσο ο αριθμός των μικροαγγείων όσο και των μεμονωμένων κυττάρων που εκφράζουν το αντίσωμα ακόμα και εάν δεν

υπάρχει ορατός αυλός. Τέλος υπολογίζεται ο μέσος όρος των αγγείων που παρατηρούνται στις hot-spot περιοχές . Θα πρέπει να αναφέρεται πάντα ο αριθμός καθώς και το εμβαδό ( $\text{mm}^2$ ) των περιοχών που αξιολογήθηκαν.

Ένας άλλος τρόπος για την αξιολόγηση της MVD είναι η εφαρμογή της μεθόδου Chalkley<sup>368</sup>. Χρησιμοποιείται ένα δικτυωτό πλέγμα (graticule) στον προσοφθάλμιο φακό το οποίο είναι ειδικά βαθμονομημένο. Επιλέγονται 3-4 hot spot περιοχές (μεγέθυνση x250) και με τη βοήθεια του πλέγματος καταμετρούνται τα αγγεία σε περιοχές που αντιστοιχούν σε εμβαδό  $0,196 \text{ mm}^2$  (grid area). Η τεχνική αυτή θεωρείται απλή και αξιόπιστη μέθοδος καταμέτρησης αγγείων στην καθημερινή πράξη<sup>369</sup>. Επιπλέον η μικροαγγειακή πυκνότητα που υπολογίζεται με την Chalkley μέθοδο έχει συσχετιστεί με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους σε μια σειρά από νεοπλάσματα, όπως στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού και του προστάτη<sup>370</sup>.

Το μειονέκτημα και των δύο μεθόδων είναι η έλλειψη αντικειμενικότητας καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει σημαντική διακύμανση των αποτελεσμάτων μεταξύ των παρατηρητών (inter-observer variability)<sup>371</sup>. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι οι οποίες στηρίζονται σε ανάλυση εικόνων από ηλεκτρονικούς υπολογιστές<sup>372</sup>. Η συνολική μικροαγγειακή περιοχή (Total microvascular area-TVA) υπολογίζεται από τον αριθμό των μικροαγγείων ανά περιοχή του όγκου βάση 3-4 hot-spot περιοχών<sup>373</sup>. Ωστόσο μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόστος καθώς και η υποκειμενικότητα που υπάρχει στην επιλογή των περιοχών που πρόκειται να αναλυθούν από τον υπολογιστή.

#### **4.5.3 Η μικροαγγειακή πυκνότητα στην υπερπλασία και το καρκίνωμα του προστάτη**

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα είναι

μεγαλύτερη στην υπερπλασία και το καρκίνωμα σε σχέση με το φυσιολογικό προστάτη ενώ είναι σημαντικά μεγαλύτερη στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία<sup>374</sup>. Ωστόσο μελέτες αξιολόγησης της σχέσης της μικροαγγειακής πυκνότητας με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του καρκίνου του προστάτη έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα.

Πρώτος ο Weidner διαπίστωσε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση της MVD με την εμφάνιση μεταστάσεων ενώ ο Brauer ανέφερε ότι η MVD σχετίζεται και με το στάδιο της νόσου<sup>339,375</sup>. Ο Offersen διαπίστωσε ότι η MVD είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας του καρκίνου του προστάτη ενώ ο Silverman εξετάζοντας παρασκευάσματα ριζικής προστατεκτομής με Gleason 5-7 διαπίστωσε θετική συσχέτιση της MVD με το PSA<sup>376,377</sup>. Ωστόσο ο Rubin δεν βρήκε κάποια συσχέτιση της MVD με το Gleason score, το στάδιο του όγκου, τα χειρουργικά όρια εκτομής ή τη διήθηση των σπερματοδόχων κύστεων όπως και ο Barth ο οποίος διαπίστωσε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της MVD και του σταδίου της νόσου<sup>378,379</sup>. Αντίθετα οι μελέτες του Bettencourt έδειξαν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της MVD και των Gleason score-σταδίου της νόσου<sup>380</sup>. Αντίστοιχα ο Lissbran έδειξε ότι η MVD αποτελεί προγνωστικό δείκτη όσον αφορά την ειδική της νόσου επιβίωση, ενώ αντίθετα ο Gettman ανέφερε την απουσία αυξημένης MVD σε ασθενείς με νόσο σταδίου T2<sup>381,382</sup>.

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα πιθανότατα οφείλονται στις διαφορετικές κατηγορίες ασθενών που επιλέγονται στις μελέτες καθώς και στα διαφορετικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται. Για παράδειγμα, ο Silverman συμπεριέλαβε μόνο ασθενείς με Gleason 5-7, ενώ ο Gettman εστίασε τη μελέτη στους ασθενείς σταδίου T2. Επιπλέον τα αντισώματα CD31, CD34 και vWf που κατεξοχήν χρησιμοποιήθηκαν στις περισσότερες μελέτες υστερούν σε ειδικότητα ενώ πιθανόν

να υστερούν και σε ευαισθησία καθώς οι παραπάνω δείκτες μπορεί να μην εκφράζονται από τα ενδο-ογκικά νεοαγγεία. Η ενδογλίμη (CD105) φαίνεται να συσχετίζεται καλύτερα με την MVD, ενώ μελέτες έχουν καταδείξει την αξία της ως προγνωστικού δείκτη του καρκίνου του προστάτη<sup>354,383</sup>. Υπάρχουν όμως και πάλι αντικρουόμενα αποτελέσματα όπως αυτά μιας σχετικά πρόσφατης μελέτης η οποία έδειξε ότι η MVD όπως αυτή υπολογίζεται από τον vWf έχει καλύτερη προγνωστική αξία συγκριτικά με την αντίστοιχη μέτρηση με βάση το CD 105, ειδικά σε ασθενείς με Gleason 6<sup>384</sup>. Τέλος, την τελευταία πενταετία γίνονται προσπάθειες να διαπιστωθεί ο ρόλος των παραπάνω αγγειογενετικών δεικτών όπως αυτοί ανιχνεύονται στο αίμα και τα ούρα των ασθενών με καρκίνο του προστάτη και μελέτες έχουν δείξει την πιθανή αξία των μετρήσεων αυτών ως προγνωστικών δεικτών της νόσου<sup>385,386</sup>.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη και σύγκριση της αγγειογένεσης σε δείγματα υπερπλασίας, υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας και καρκινώματος του προστάτη, με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Επιπλέον διερευνήθηκε η πιθανή ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ συγκεκριμένων δεικτών αγγειογένεσης και κλινικο-παθολογοανατομικών παραμέτρων του καρκινώματος του προστάτη. Αναλυτικότερα, μελετήθηκαν:

1. Η ποσοτική έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του (VEGFR-1, VEGFR-2) σε κάθε μία από τις 3 διαγνώσεις. Καταγράφηκε επίσης η ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των παραπάνω δεικτών.
2. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των 3 παθήσεων καθώς και η πιθανή ύπαρξη συσχετίσεων μεταξύ των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 σε κάθε διάγνωση, χωριστά.
3. Η μικροαγγειακή πυκνότητα σε κάθε μία από τις 3 παθήσεις με τη χρήση του αγγειακού ενδοθηλιακού δείκτη CD105. Έγινε σύγκριση μεταξύ των παθήσεων ενώ καταγράφηκε και η συσχέτιση του CD105 με τους VEGF, VEGFR-1 και VEGFR-2 ανά πάθηση.
4. Η πιθανή ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της αυξημένης έκφρασης των 4 αγγειογενετικών δεικτών και δυσμενών παθολογοανατομικών παραμέτρων του προστατικού καρκίνου όπως το προχωρημένο κλινικό στάδιο, η κακή διαφοροποίηση και η ύπαρξη περινευρικής διήθησης. Διερευνήθηκε επίσης εάν σχετίζονται και με τη εφαρμογή ή μη συμπληρωματικής ακτινοθεραπείας.
5. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά των ήδη δημοσιευμένων μελετών

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 1.1. Επιλογή δείγματος

Η παρούσα μελέτη ήταν αναδρομική. Από το αρχείο δειγμάτων ασθενών του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (ΠΠΓΝΙ) αναζητήθηκαν μονιμοποιημένα δείγματα υπερπλασίας, υψηλόβαθμης ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (HGPN) και καρκινώματος του προστάτη. Η αναζήτηση κάλυψε τη χρονική περίοδο 2007-2009. Τα δείγματα είχαν μονιμοποιηθεί με διάλυμα φορμόλης 10% και είχαν εγκλειστεί σε κύβους παραφίνης. Έγινε προσεκτική αξιολόγηση όλων των τομών αιματοξυλίνης-ηωσίνης και επιλέχθηκαν 39,12 και 51 δείγματα υπερπλασίας, HGPN και καρκινώματος αντίστοιχα.

Τα παρασκευάσματα είχαν προέλθει από χειρουργικές επεμβάσεις διουρηθρικής ή διακυστικής προστατεκτομής για τις περιπτώσεις της υπερπλασίας και HGPN και από ριζικές προστατεκτομές για τις περιπτώσεις καρκινώματος. Επιλέχθηκαν οι κύβοι οι οποίοι αντιστοιχούσαν σε τομές στις οποίες ήταν καλά διακριτές τόσο η περιοχή του αδενώματος όσο και η περιοχή της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας ή του καρκινώματος. Κύβοι που αντιστοιχούσαν σε περιοχές νέκρωσης ή φλεγμονής απορρίφθηκαν. Με την βοήθεια του μικροτόμου κόπηκαν από τους επιλεγέντες κύβους, συνεχείς τομές πάχους 4 μm η καθεμία και τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλακάκια (Super-Frost Plus, Menzel-Glaser, Germany). Αρχικά έγινε η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και ακολούθησε ανοσοϊστοχημική χρώση με αντισώματα εναντίον των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 και CD105



## 1.2. Κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα

Οι κλινικές πληροφορίες των ασθενών που επιλέγηκαν καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας τα αρχεία του ΠΠΓΝΙ καθώς και από τηλεφωνική επικοινωνία με τους ίδιους ασθενείς. Καταγράφηκε η ηλικία όλων των ασθενών, ενώ στους ασθενείς με καρκίνωμα καταγράφηκε το παθολογοανατομικό στάδιο της νόσου, το Gleason score και η διαφοροποίηση με βάση το Gleason score, τυχόν παρουσία περινευρικής διήθησης καθώς και τυχόν συμπληρωματική ακτινοθεραπεία μετά την ριζική προστατεκτομή. Το follow-up καταγράφηκε με άμεση τηλεφωνική επικοινωνία με τους ασθενείς. Δεδομένα μετεγχειρητικής παρακολούθησης υπήρχαν για 42 από τους 51 ασθενείς με καρκίνωμα. Τα ονόματα των ασθενών κωδικοποιήθηκαν και οι πληροφορίες καταχωρήθηκαν σε αρχείο στατιστικής επεξεργασίας.

Αναλυτικά τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα για τους ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4.** Κλινικο-παθολογοανατομικά δεδομένα ασθενών.

Διάγνωση	Υπερπλασία: 39  HGPIN: 12  Καρκίνωμα: 51
Ηλικία	Υπερπλασία: 54-84 (διάμεσος: 71)  HGPIN: 60-83 (διάμεσος: 71)  Καρκίνωμα: 49-79 (διάμεσος: 67)

Ιστολογική Διαφοροποίηση	
Κακή	31 (61%)
Μέση	19 (37%)
Υψηλή	1 (2%)
Σταδιοποίηση (pT)	
T 2	37 (72%)
T 3	14 (28%)
Λεμφαδενικές μεταστάσεις (N status)	
Παρούσες (N+)	2 (4%)
Απούσες (N0, Nx)	49 (96%)
Περινευρική διήθηση	
Παρούσα	24 (47%)
Απούσα	27 (53%)
Συμπληρωματική ακτινοθεραπεία	
Ναι	12 (24%)
Όχι	39 (76%)

### 1.3. Περιγραφή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων.

Προκειμένου να απεικονιστεί ανοσοϊστοχημικά ένα αντιγόνο είναι απαραίτητο να προσδεθεί το αντίστοιχο αντίσωμα και σε αυτό να προσδεθεί ένας ιστοχημικά γνωστός δείκτης. Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος της υπεροξειδάσης με τη χρήση του HRP-En Vision kit της εταιρίας DAKO. Τα στάδια της τεχνικής ήταν τα παρακάτω:

- Αποξήρανση των τόνων παραφίνης με την τοποθέτηση τους σε ξηρό κλίβανο στους 60 °C για 24h.
- Αποπαραφίνωση των τομών με την εμβάπτιση τους σε ξυλόλη (2 φορές) για 20 min την κάθε φορά.
- Ενυδάτωση των τομών σε διαδοχικώς αραιούμενα διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης, κατιόντα (100<sup>0</sup>, 96<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup>).
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 min.
- Επεξεργασία και αποκάλυψη του αναζητούμενου αντιγονικού επιτόπου (antigen retrieval). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 3 μέθοδοι ανάλογα με το επιλεγέν αντίσωμα (Πίνακας 5). Στην πρώτη (citrate buffer) οι τομές εμβυθίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος και τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων στα 300 W για δύο κύκλους των 15 min. Στη δεύτερη (high ph buffer) οι τομές εμβυθίστηκαν σε διάλυμα υψηλού pH και τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων στα 800 W, για δύο κύκλους των 5 min έκαστος. Τέλος στην τρίτη μέθοδο (Proteinase-K) οι τομές καλύφθηκαν με διάλυμα πρωτεϊνάσης-K και επώαστηκαν για 25 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης με την τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε μεθανόλη για 30 min.
- Έκπλυση των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Επικάλυψη της κάθε τομής με το αντίστοιχο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση και την επώαση του για τον απαιτούμενο χρόνο.
- Έκπλυση των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Επικάλυψη των τομών με το δευτερογενές αντίσωμα (EnVision/HRP) και επωασή τους για 30 min σε θάλαμο υγρασίας, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Εφαρμογή χρωμογόνου (διαμινοβενζιδινετραϋδροχλωρίδιο-DAB). Έλεγχος των πλακιδίων με τις τομές σε κοινό μικροσκόπιο μέχρι να εμφανιστεί η επιθυμητή ειδική καφέ χρώση των κυττάρων.
- Έκπλυση με απιονισμένο νερό
- Χρώση των τομών (counterstaining) με αιματοξυλίνη Harris για 3 min.
- Έκπλυση με απιονισμένο νερό
- Αφυδάτωση των τομών σε διαδοχικώς αυξανόμενης συγκέντρωσης διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης (ανιόντα). (70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 96<sup>0</sup>, 100<sup>0</sup>) για 3 min.
- Έκπλυση των τομών σε ξυλόλη
- Επικάλυψη των τομών

**VEGF**

Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (VEGF, Ab-3 – JH121) ήταν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού (mouse monoclonal antibody) της εταιρίας NeoMarkers, Labvision Corporation, USA μοριακού βάρους 19-22 kDa ειδικό για τον ανθρώπινο VEGF<sub>121</sub>. Η επώαση έγινε με το ειδικό αντίσωμα αραιωμένο 1:30 ολονύκτια στους 4 °C.

**VEFR-1**

Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (VEGFR-1, RP 077) ήταν ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού της εταιρίας Diagnostic Biosystems, USA ειδικό για τον ανθρώπινο VEGFR-1. Η επώαση έγινε με το ειδικό αντίσωμα αραιωμένο 1:30 ολονύκτια στους 4 °C.

**VEFR-2**

Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (VEGFR-2, RP 076) ήταν ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού της εταιρίας Diagnostic Biosystems, USA ειδικό για τον ανθρώπινο VEGFR-2. Η επώαση έγινε με το ειδικό αντίσωμα αραιωμένο 1:30 ολονύκτια στους 4 °C.

**CD105**

Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (CD105, Clone SN6h) ήταν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού της εταιρίας Dako, Denmark ειδικό για τον ανθρώπινο CD105. Η επώαση έγινε με το ειδικό αντίσωμα αραιωμένο 1:5 ολονύκτια στους 4 °C .

**Πίνακας 5.** Αντισώματα και μέθοδοι επεξεργασίας

Αντίσωμα	Προέλευση	Antigen Retrieval	Αραίωση	Επώαση
VEGF	Ab-3, JH121, Neomarkers, USA	Citrate buffer	1:30	Ολονύκτια στους 4 °C
VEGFR-1	RP 077, Diagnostic Biosystems, USA	High ph	1:30	Ολονύκτια στους 4 °C
VEGFR-2	RP 076, Diagnostic Biosystems, USA	High ph	1:30	Ολονύκτια στους 4 °C
CD105	Clone SN6h, Dako, Denmark	Proteinase- K	1:5	Ολονύκτια στους 4 °C

#### 1.4. Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης για τους VEGF, VEGFR-1 και VEGFR-2

Οι τομές μελετήθηκαν από δύο ερευνητές με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου. Τυχόν διαφωνίες στην αξιολόγηση συζητήθηκαν και τα πλακίδια

επανεκτιμήθηκαν. Καταγράφηκε το ποσοστό των επιθηλιακών κυττάρων που παρουσίαζαν κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF, αφού πρώτα καταμετρήθηκαν 500 κύτταρα σε κάθε τομή. Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης καταγράφηκε ως εξής: απουσία έκφρασης (-), χαμηλή (+), μέση (++) και υψηλή (+++). Τομές με πολύ έντονη μη ειδική χρώση (background) απορρίφθηκαν.

### **1.5. Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του CD105-Υπολογισμός MVD**

Η μελέτη της μικροαγγειακής πυκνότητας έγινε με τη χρήση του αγγειακού ενδοθηλιακού δείκτη CD105. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Weidner κατά την οποία σε κάθε τομή αναγνωρίστηκαν σε μικρή μεγέθυνση 3 περιοχές με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αγγείων και ακολούθως τα αγγεία μετρήθηκαν σε μεγάλη μεγέθυνση (x400) και ο αριθμός τους διαιρέθηκε δια του 3. Το αποτέλεσμα αντιστοιχεί στη μικροαγγειακή πυκνότητα ανά οπτικό πεδίο (εμβαδόν 0,7386 mm<sup>2</sup>). Η παρουσία αυλού δεν ήταν απαραίτητη κατά την καταμέτρηση των αγγείων.

### **1.6. Στατιστική αξιολόγηση**

Τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών καταγράφηκαν σε μια φόρμα στατιστικής ανάλυσης και ακολούθησε η αξιολογησή τους. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Η συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 και CD105 με τη διάγνωση (Υπερπλασία- PIN-Καρκίνωμα) έγινε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal Willis και τις πολλαπλές συγκρίσεις με το κριτήριο Tahmane T2 ενώ η συσχέτιση της έντασης ανάλογα με τη διάγνωση έγινε με Fisher's Exact Test και μοντέλα πολλαπλής λογιστικής παλινδρόμησης. Όσον αφορά κάθε διάγνωση χωριστά, η συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης μεταξύ όλων των πρωτεϊνών καθώς και των βαθμών έντασης για κάθε πρωτεΐνη χωριστά αλλά και

μεταξύ τους, έγινε με τις στατιστικές δοκιμασίες Fisher's Exact Test και Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ). Η συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης και της μικροαγγειακής πυκνότητας με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους στα καρκινώματα έγινε με τη δοκιμασία t-test (Independent samples Student's t-test). Οι συγκρίσεις μεταξύ των υποομάδων των βαθμών διαφοροποίησης και των σταδίων έγινε με τη χρήση του κριτηρίου Tahmane T2. Όλες οι στατιστικές δοκιμασίες με τιμές  $p < 0,05$  θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές, ενώ όλες οι τιμές ήταν αμφίπλευρες (two-tailed).

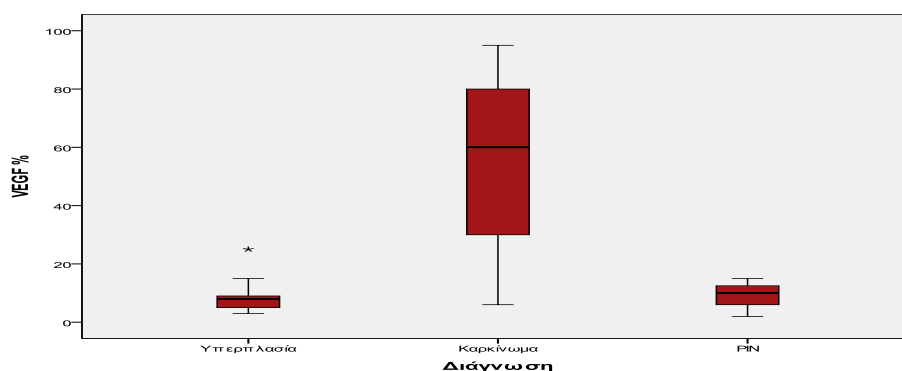


## 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.1. VEGF: Υπερπλασία-καρκίνωμα-PIN

Η πρώτη αξιολόγηση αφορούσε την ποσοτική έκφραση του VEGF σε κάθε μια από τις 3 διαγνώσεις ξεχωριστά καθώς και η αναζήτηση της ύπαρξης τυχόν σημαντικής διαφοράς μεταξύ των διαγνώσεων. Παρόμοια μελέτη έγινε και όσον αφορά την ένταση της έκφρασης του συγκεκριμένου δείκτη.

Η ποσοτική έκφραση του VEGF ήταν σημαντικά υψηλότερη στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία ( $p=0,00$ ) και την υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ( $p=0,00$ )(**Εικόνα 21**).



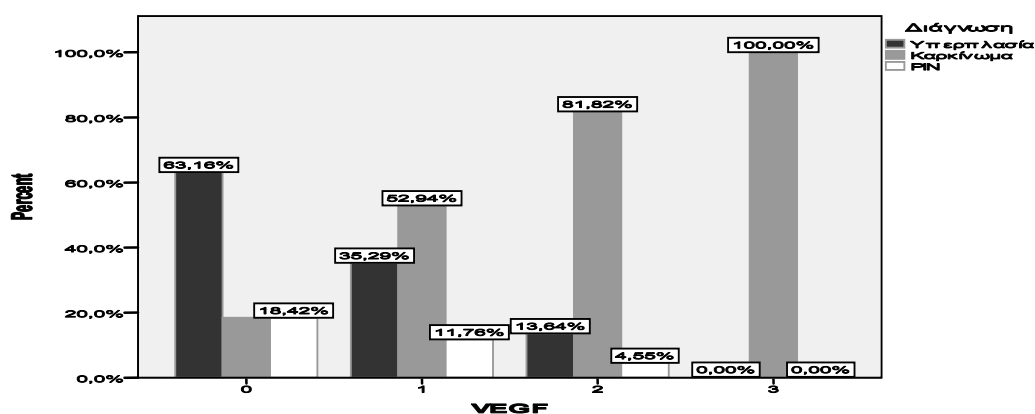
Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής έκφρασης του VEGF ανάλογα με τη διάγνωση

Πιο συγκεκριμένα πάνω από το 50% των κυττάρων βρέθηκε να υπερεκφράζει τον VEGF στο καρκίνωμα ενώ στις άλλες 2 κατηγορίες το ποσοστό δεν ξεπέρασε το 10% (Πίνακας 6). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της υπερπλασίας και της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας ( $p=1,00$ ).

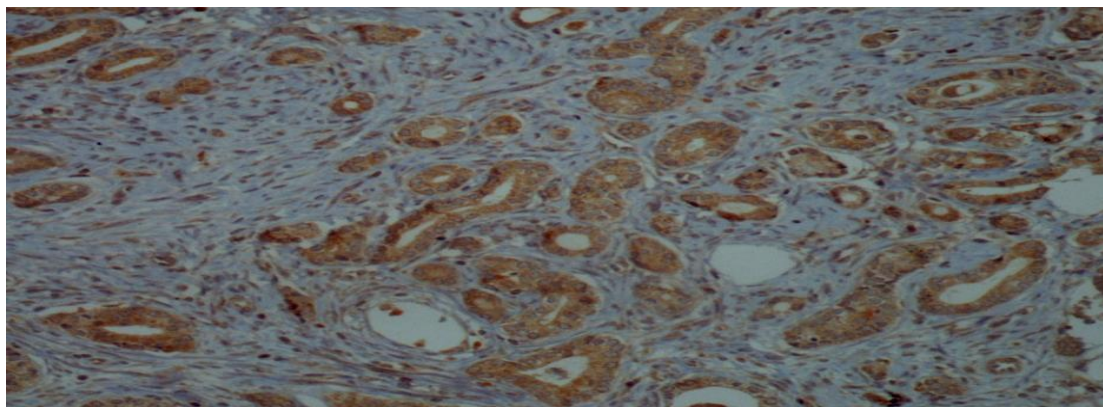
Πίνακας 6. Ποσοτική έκφραση του VEGF ανάλογα με τη διάγνωση

Διάγνωση	Mean VEGF (%)	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Υπερπλασία	8,80	5,685	1,468	5,65	11,95
Καρκίνωμα	56,27	27,959	4,215	47,77	64,77
PIN	9,00	6,557	3,786	7,29	25,29

Αναφορικά με την ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ένταση στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία και την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ( $p=0,000$  και  $p=0,013$ , αντίστοιχα) ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ υπερπλασίας-PIN ( $p=0,853$ ) (Εικόνες 22-23).



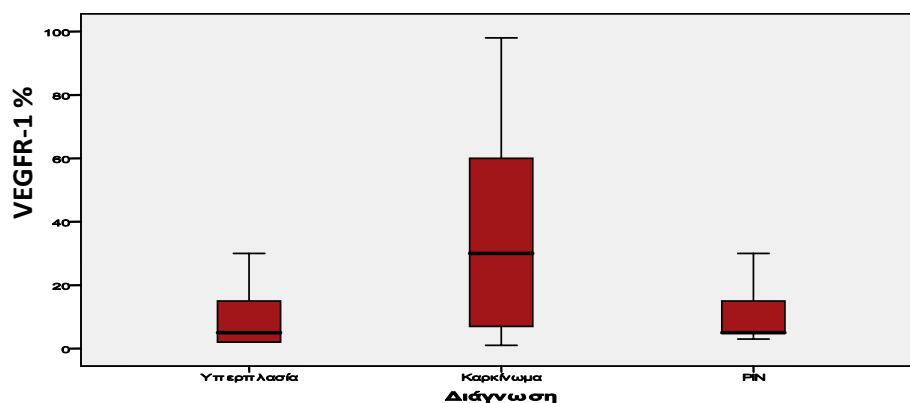
Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση της έντασης έκφρασης του VEGF ανάλογα με τη διάγνωση [0(-), 1(+), 2(++), 3(+++)]



Εικόνα 23. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF στο καρκίνωμα του προστάτη (x 100).

## 2.2. VEGFR-1, VEGFR-2: Υπερπλασία-καρκίνωμα-PIN

Η ποσοτική έκφραση του VEGFR-1 ήταν σημαντικά υψηλότερη στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία ( $p=0,00$ ) και με την HGPIN ( $p=0,00$ ) ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της υπερπλασίας και της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας ( $p=0,981$ ) (Εικόνα 24).



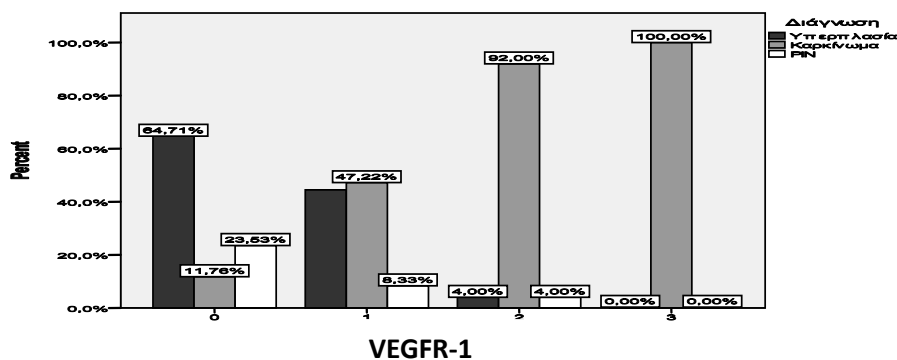
Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής έκφρασης του VEGFR-1 ανάλογα με τη διάγνωση.

Πιο συγκεκριμένα το 37% των επιθηλιακών κυττάρων βρέθηκε να υπερεκφράζει τον VEGFR-1 στο καρκίνωμα ενώ στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία το ποσοστό έφτασε το 10,38 % και στην υπερπλασία δεν ξεπέρασε το 10% (Πίνακας 7).

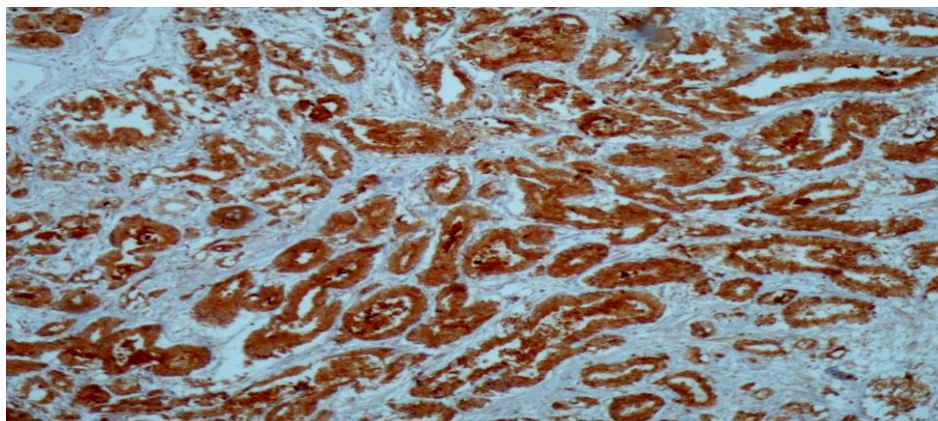
Πίνακας 7. Ποσοστά της έκφρασης του VEGFR-1 ανάλογα με τη διάγνωση.

Διάγνωση	Mean VEGFR-1 (%)	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Υπερπλασία	8,93	9,579	2,560	3,40	14,46
Καρκίνωμα	37,46	31,979	5,257	26,80	48,12
PIN	10,38	9,242	3,267	2,65	18,10

Αναφορικά με την ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ένταση στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία και την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ( $\rho=0,000$ ,  $\rho=0,006$ ) ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο τελευταίων κατηγοριών ( $\rho=0,379$ ) (Εικόνες 25-26).

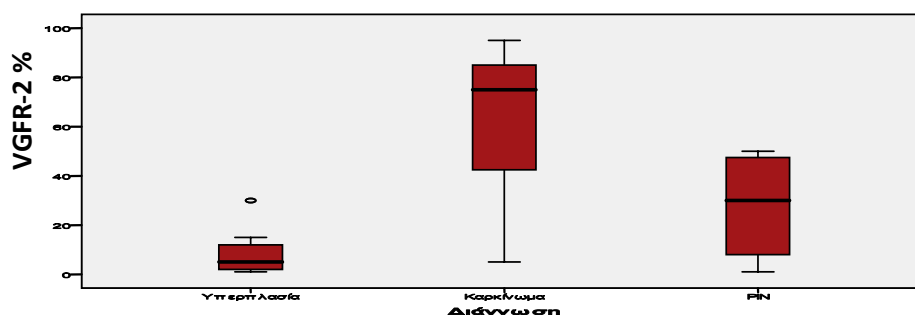


Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση της έντασης έκφρασης του VEGFR-1 ανάλογα με τη διάγνωση [0(-), 1(+), 2(++), 3(+++)].



Εικόνα 26. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGFR-1 στο καρκίνωμα του προστάτη ( x 100).

Η ποσοτική έκφραση του VEGFR-2 ήταν σημαντικά υψηλότερη στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία ( $p=0,00$ ) και με την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ( $p=0,04$ ) (Εικόνα 27).



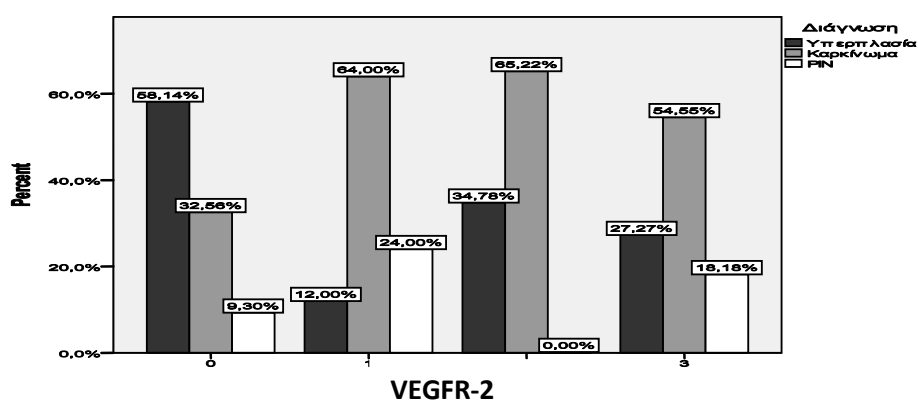
Εικόνα 27. Σχηματική απεικόνιση της έκφρασης του VEGFR-2 ανάλογα με τη διάγνωση.

Πιο συγκεκριμένα πάνω από το 60% των επιθηλιακών κυττάρων βρέθηκε να υπερεκφράζει τον VEGFR-2 στο καρκίνωμα ενώ στην HGPIN και στην υπερπλασία έφτασε το 28% και 8%, αντίστοιχα (Πίνακας 8). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της υπερπλασίας και της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας ( $p=0,492$ ).

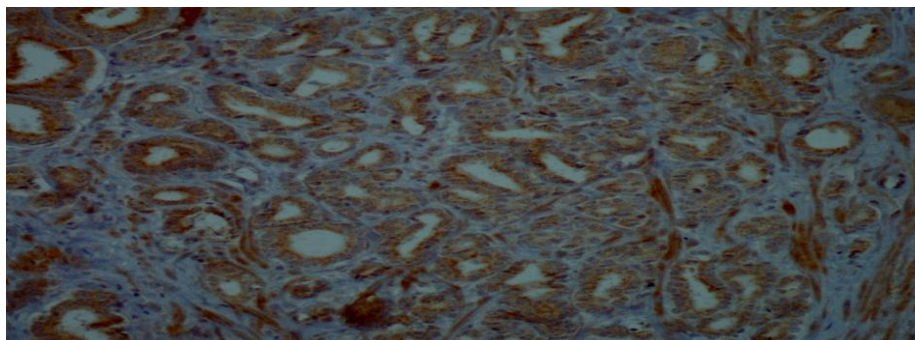
**Πίνακας 8.** Ποσοστά της έκφρασης του VEGFR-2 ανάλογα με τη διάγνωση.

Διάγνωση	Mean VEGFR-2 (%)	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Υπερπλασία	8,56	8,900	2,098	4,13	12,98
Καρκίνωμα	62,15	28,772	4,197	53,70	70,60
PIN	27,75	23,599	11,800	-9,80	65,30

Αναφορικά με την ένταση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ένταση στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία ( $p=0,003$ ) όχι όμως και με την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ( $p=0,134$ ) ενώ παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ένταση στην ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία συγκριτικά με την υπερπλασία ( $p=0,004$ ) (Εικόνες 28-29).



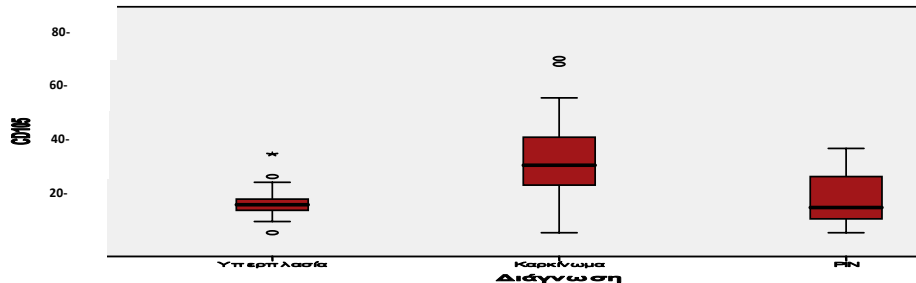
Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση της έντασης έκφρασης του VEGFR-2 ανάλογα με τη διάγνωση



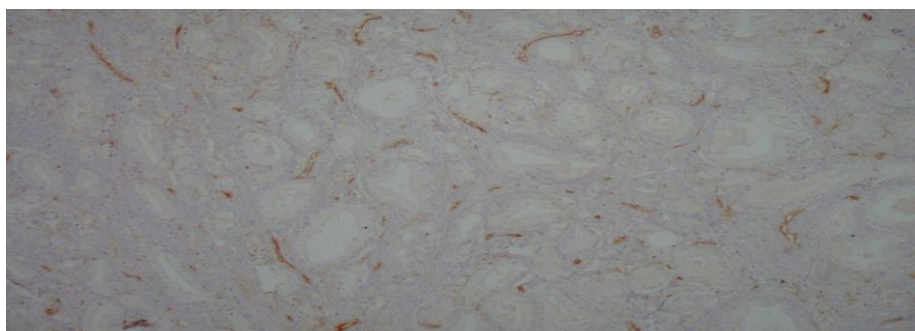
Εικόνα 29. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGFR-2 στο καρκίνωμα του προστάτη (x 100).

### 2.3. CD105: Υπερπλασία-καρκίνωμα-PIN

Η ποσοτική έκφραση του CD105 καθόρισε την μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD). Παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη MVD στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία ( $p=0,000$ ) και με την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ( $p=0,002$ ) ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ υπερπλασίας και PIN ( $p=0,952$ ) (Εικόνες 30-31).



Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής έκφρασης του CD105 ανάλογα με τη διάγνωση.



Εικόνα 31. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CD105 στο καρκίνωμα του προστάτη (x 100).

Πιο συγκεκριμένα η μέση MVD στο καρκίνωμα ήταν 29,1 ενώ στη υπερπλασία και την ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ήταν 14,46 και 15,84, αντίστοιχα (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9.** Μικροαγγειακή πυκνότητα ανάλογα με τη διάγνωση

CD 105	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
				Lower Bound	Upper Bound
Υπερπλασία	14,46	2,476	,396	12,86	16,06
Καρκίνωμα	29,1	6,777	,949	25,28	32,92
PIN	15,84	4,719	1,362	9,84	21,82

#### 2.4. Υπερπλασία: Συσχέτιση έκφρασης των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, CD105

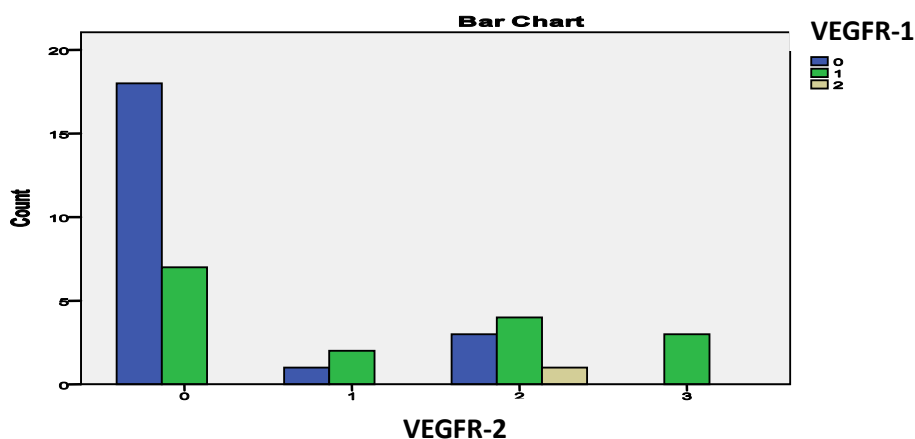
Στις περιπτώσεις υπερπλασίας, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών έκφρασης των 4 δεικτών όταν αυτοί τοποθετήθηκαν σε πίνακες 2\*2 και συγκρίθηκαν ανά ζεύγη (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης των VEGFR-1, VEGFR-2, VEGF, CD105 στην υπερπλασία του προστάτη (p values).

	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGF	CD105
VEGFR-1		0,742	0,753	0,254
VEGFR-2	0,742		0,895	0,879
VEGF	0,753	0,895		0,067
CD105	0,254	0,879	0,067	



Αναφορικά με την ένταση φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0.032$ ) μεταξύ των VEGFR-1/VEGFR-2. Η σχέση μεταξύ των δύο δεικτών αποδίδεται στο επόμενο γράφημα (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Μικρότερη ένταση έκφρασης του VEGFR-1 αντιστοιχεί και σε μικρότερη ένταση του VEGFR-2. [0(-), 1(+), 2(++), 3(+++)].

Επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έντασης έκφρασης των VEGF/VEGFR-1 ( $p=0,062$ ) και των VEGF/VEGFR-2 ( $p=0,928$ ).

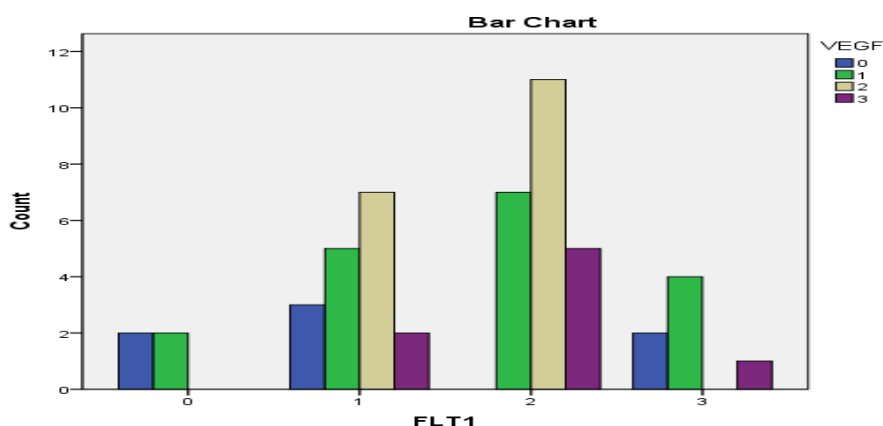
## 2.5. Καρκίνωμα: Συσχέτιση έκφρασης των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, CD105

Στο καρκίνωμα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ποσοστών έκφρασης των VEGFR-2/VEGFR-1 ( $p=0,015$ ), VEGFR2/VEGF ( $p=0,032$ ) και οριακή συσχέτιση των VEGF/CD105 ( $p=0,052$ ) (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Συσχέτιση της ποσοτικής έκφρασης των VEGFR-1, VEGFR-2, VEGF, CD105 στο καρκίνωμα του προστάτη (p values).

	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGF	CD105
VEGFR-1		0,015	0,254	0,170
VEGFR-2	0,015		0,032	0,880
VEGF	0,254	0,032		0,092
CD105	0,170	0,880	0,052	

Αναφορικά με την ένταση φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p=0.021$ ) μόνο μεταξύ των VEGFR-1/VEGF. Η σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών αποδίδεται στο επόμενο γράφημα (Εικόνα 33).



Εικόνα 33. Υψηλότερη ένταση VEGFR-1 αντιστοιχεί σε υψηλότερη ένταση VEGF. [0(-), 1(+), 2(++), 3(+++)].

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση όσον αφορά την ένταση έκφρασης των VEGF/VEGFR-2 ( $p=0.090$ ) και των VEGFR-1/VEGFR-2 ( $p=0,191$ ).

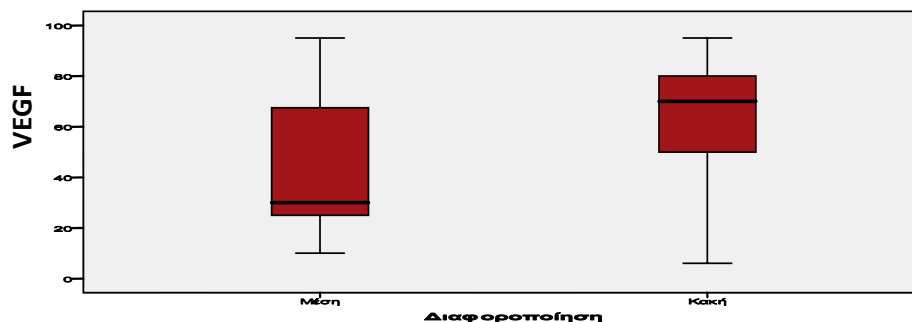
## 2.6. Συσχέτιση των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, CD105 με παθολογοανατομικές παραμέτρους στον καρκίνο του προστάτη

Καταγράφηκε η ποσοτική έκφραση των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 και CD105 ανά στάδιο καρκίνου και εξετάστηκε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάλογα με το παθολογοανατομικό στάδιο. Εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ υψηλότερων ποσοστών έκφρασης του VEGF και σταδίου T3, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση με τους άλλους 3 δείκτες (Πίνακας 12).

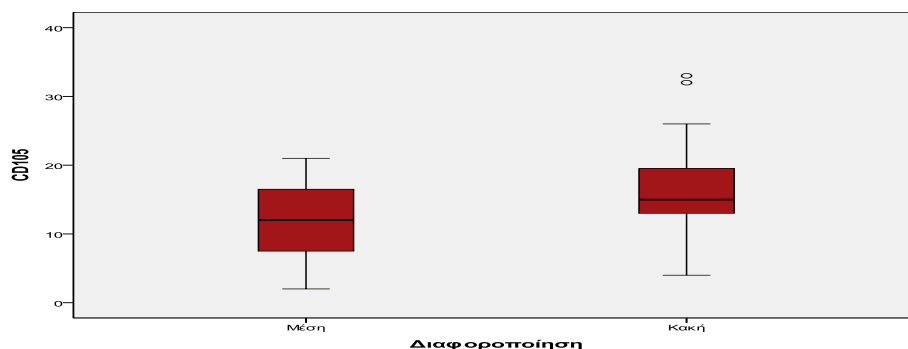
<b>Πίνακας 12.</b> Συσχέτιση μεταξύ της ποσοτικής έκφρασης των VEGFR-1, VEGFR-2, VEGF, CD105 και του παθολογοανατομικού σταδίου.	
	P
VEGR-1	0,482
VEGFR-2	0,861
VEGF	0,047
CD105	0,298

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της παρατηρούμενης έντασης των VEGFR-1, VEGFR-2, VEGF και του παθολογοανατομικού σταδίου ( $p=0,548$  και  $p=1,000$ ,  $p=0,352$ , αντίστοιχα).

Όσον αφορά την ποσοτική έκφραση των 4 δεικτών ανά κατηγορία διαφοροποίησης παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά έκφρασης των VEGF ( $p=0,044$ ) και CD 105 ( $p=0,038$ ) σε ασθενείς με κακή διαφοροποίηση ενώ αντίθετα δεν καταγράφηκε σημαντική συσχέτιση για τους VEGFR-1( $p=0,237$ ) και VEGFR-2 ( $p=0,127$ ) (Εικόνες 34-35).



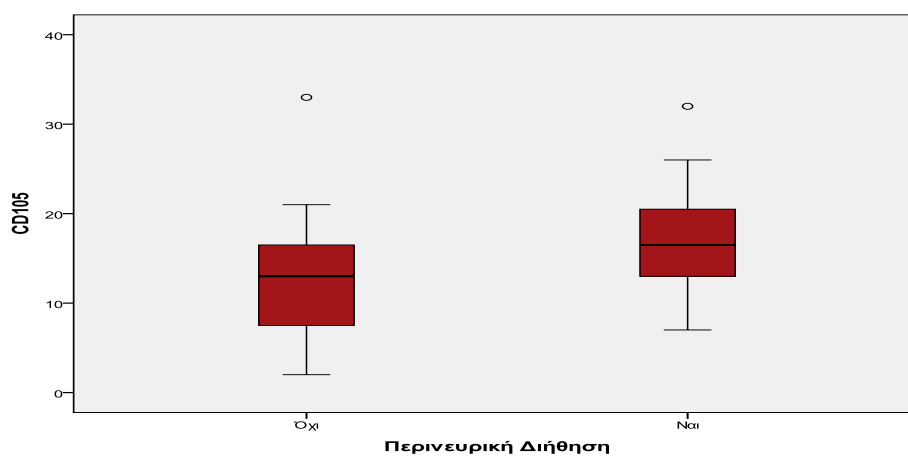
Εικόνα 34. Ασθενείς με κακή διαφοροποίηση έχουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά έκφρασης του VEGF.



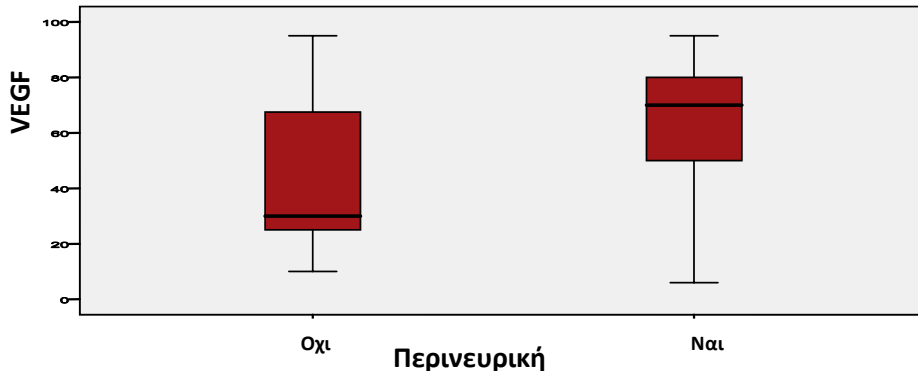
Εικόνα 35. Ασθενείς με κακή διαφοροποίηση έχουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά έκφρασης του CD105.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έντασης έκφρασης των VEGFR-1, VEGFR-2, VEGF και της διαφοροποίησης της νόσου ( $p=0,108$ ,  $p=0,160$  και  $p=0,125$ , αντίστοιχα).

Όταν συσχετίστηκε η ποσοτική έκφραση των 4 δεικτών με την ύπαρξη ή απουσία περινευρικής διήθησης, καταγράφηκε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ( $p=0,019$ ) έκφραση της ενδογλίνης και του VEGF ( $p=0,044$ ) όταν παρατηρούνταν περινευρική διήθηση (Εικόνες 36-37). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση με τους VEGFR-1 και VEGFR-2, ( $p=0,707$ ,  $p=0,258$ , αντίστοιχα).



Εικόνα 36. Αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα συσχετίζεται με την ύπαρξη περινευρικής διήθησης.



Εικόνα 37. Αυξημένα έκφραση του VEGF σχετίζεται με ύπαρξη περινευρικής διήθησης.

Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της έντασης έκφρασης των VEGFR-1 ( $p=0,203$ ), VEGFR-2 ( $p=0,712$ ), VEGF ( $p=0,319$ ) και της παρουσίας ή όχι περινευρικής διήθησης.

Τέλος καταγράφηκε η ποσοτική έκφραση των 4 δεικτών σε σχέση με την εφαρμογή ή μη συμπληρωματικής ακτινοθεραπείας. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση για κανέναν από τους VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 και CD105 ( $p=0,652$ ,  $p=0,233$ ,  $p=0,807$  και  $p=0,422$ , αντίστοιχα). Αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της παρατηρούμενης έντασης των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 και της συμπληρωματικής ακτινοθεραπείας ( $p=0,490$ ,  $p=0,681$ ,  $p=0,891$ ).

## ΣΧΟΛΙΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι παρατηρήσεις μας επιβεβαιώνουν προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι ο VEGF και οι υποδοχείς του εκφράζονται στο καρκίνωμα του προστάτη σε σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστά από την υπερπλασία και την HGPIV, ενώ ο VEGFR-2 είναι ο υποδοχέας που εκφράζεται περισσότερο. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του VEGFR-2 είναι ισχυρότερη στην HGPIV σε σχέση με την υπερπλασία. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ υπερπλασίας και HGPIV όσον αφορά την έκφραση των VEGF και VEGFR-1. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του VEGF στην HGPIV είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα φυσιολογικά προστάτη, χωρίς όμως ποτέ να έχει συγκριθεί με τα υπερπλασία<sup>387,388</sup>.

Επίσης σημαντική παρατήρηση είναι το γεγονός ότι η υπερέκφραση του VEGF συμβαδίζει με υπερέκφραση του VEGFR-2 ενώ συμβαδίζει επίσης και η έκφραση των VEGFR-1/VEGFR-2 από τα νεοπλασματικά νεοαγγεία. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι το σύμπλεγμα VEGF/VEGFR-2 επάγει και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ασκώντας αυτοκρινή δράση τόσο σε συμπαγείς όγκους όπως το αδενοκαρκίνωμα του προστάτη όσο και σε αιματολογικές κακοήθειες όπως η λευχαιμία<sup>389,390</sup>. Οι έρευνες αυτές επιπλέον έδειξαν ότι ο φαρμακευτικός αποκλεισμός του VEGF/VEGFR-2 οδηγεί σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε επίσης η αξία του VEGF ως προγνωστικού δείκτη του καρκίνου του προστάτη. Πιο συγκεκριμένα η υψηλή έκφραση του VEGF συσχετίστηκε με κακή διαφοροποίηση, προχωρημένο στάδιο και περινευρική διήθηση του καρκινώματος ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των παραπάνω με την έκφραση των υποδοχέων του VEGF. Διάφορες μελέτες έχουν

δείξει επίσης αυξημένη έκφραση του VEGF σε ασθενείς με Gleason score > 6 ενώ έχει συσχετιστεί και με αυξημένο κίνδυνο μεταστάσεων<sup>391</sup>. Τα αποτελέσματα μας ενισχύουν την άποψη ότι η αξιολόγηση της έκφρασης του VEGF μπορεί να έχει προγνωστική αξία σε ασθενείς με καρκίνωμα του προστάτη. Παρόλα αυτά διάφορες μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα και απαιτείται επιβεβαίωση των παρατηρήσεων με προοπτικές μελέτες και μεγάλο αριθμό ασθενών.

Ως προς τη μικροαγγειακή πυκνότητα η ανάλυση των αποτελεσμάτων μας έδειξε ότι υπάρχει αυξημένη αγγειογένεση στο καρκίνωμα του προστάτη σε σχέση με την υπερπλασία και την HGPIN. Οι Bigler και Weidner παρουσίασαν επίσης αντίστοιχα αποτελέσματα<sup>392,393</sup>. Αντίθετα, οι Montironi et al. παρατήρησαν αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα στην HGPIN συγκρινόμενη με το καρκίνωμα<sup>394</sup>. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι οι όγκοι διαφέρουν ως προς την ‘αγγειογενετική δυνατότητα’ των καρκινικών κυττάρων. Η MVD συνεπώς ποικίλει μεταξύ των διαφόρων νεοπλασμάτων όπως επίσης και μεταξύ των διαφόρων περιοχών εντός του ίδιου νεοπλάσματος.

Επιπλέον η MVD με τη χρήση του CD105 συσχετίστηκε σημαντικά με την έκφραση του VEGF από τα καρκινικά κύτταρα και επιβεβαιώνεται η αξία της ενδογλίνης ως αγγειακού ενδοθηλιακού δείκτη. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλες μελέτες<sup>395,396</sup>. Επιπλέον το αντίσωμα φάνηκε να αντιδρά ιδιαίτερα έντονα με τα αγγεία εντός του όγκου, ενώ τα φυσιολογικά αγγεία εξέφραζαν σπάνια το CD105 και η ένταση της χρώσης ήταν ασθενής. Τα μεσεγχυματικά, τα φλεγμονώδη και τα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν πάντα αρνητικά ως προς το CD105.

Στο καρκίνωμα του προστάτη, υψηλή MVD συσχετίστηκε με κακή διαφοροποίηση και αυξημένη πιθανότητα περινευρικής διήθησης ενώ δεν

παρατηρήθηκε συσχέτιση της MVD με το στάδιο της νόσου. Οι Weidner et al. παρατήρησαν αυξημένη MVD σε ασθενείς με φτωχή διαφοροποίηση ενώ όγκοι με καλή διαφοροποίηση είχαν χαμηλή MVD και αρχιτεκτονική των νεοαγγείων παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην υπερπλασία<sup>339</sup>. Όπως όμως έχει προαναφερθεί βιβλιογραφικά δεν φαίνεται να είναι ξεκάθαρη η αξία της MVD ως προγνωστικού δείκτη του καρκίνου του προστάτη<sup>397</sup>. Επιπλέον αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η MVD δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη για την απόφαση εφαρμογής αντιαγγειογενετικής θεραπείας<sup>398,399</sup>.

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται και από πειραματικές κυρίως μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει καλή ανταπόκριση του προστατικού καρκίνου στους αντί-αγγειογενετικούς παράγοντες ανεξάρτητα από το αγγειογενετικό status όπως αυτό εκφράζεται από την MVD<sup>400</sup>. Ωστόσο, με την εφαρμογή αντί-αγγειογενετικής θεραπείας μπορεί να παρατηρηθεί μείωση της MVD και συνεπώς η MVD μπορεί να αποτελέσει δείκτη της αποτελεσματικότητας της εφαρμοζόμενης αγωγής, χωρίς όμως να μπορεί να προβλέψει και την κλινική ανταπόκριση<sup>401</sup>.

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα όπως έχει ήδη προαναφερθεί οφείλονται στην χρησιμοποίηση διαφορετικών δεικτών σε κάθε μελέτη (CD105, CD34, CD31, vWf), διαφορετικών ανοσοϊστοχημικών μεθόδων και στην υποκειμενική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Για να είναι τα αποτελέσματα των μελετών αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα απαιτούνται συγκεκριμένα πρωτόκολλα και αξιολογικές διαδικασίες. Παρόλα αυτά, η ενδογλίνη θεωρείται ο ιδανικότερος δείκτης αξιολόγησης της MVD ωστόσο χρειάζονται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων και μεγαλύτερο follow-up ώστε να αποδειχθεί η αξία της τόσο ως προς την αξιολόγηση της αγγειογένεσης όσο και ως προγνωστικού δείκτη της συνολικής επιβίωσης των ασθενών και της ανταπόκρισης στις νέες θεραπείες.



Πιθανόν η αγγειογένεση να αποτελέσει βασικό μέρος ενός νέου συστήματος σταδιοποίησης και πρόγνωσης των νεοπλασμάτων. Ασθενείς με αυξημένη MVD όπως αυτή εκφράζεται από την αξιολόγηση της έκφρασης του CD105 πιθανό να είναι υποψήφιοι για νέες στοχευμένες φαρμακευτικές θεραπείες.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ**

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μας οδηγούν στα κάτωθι συμπεράσματα και παράλληλα σε νέα ερωτήματα και προοπτικές:

1. Η αγγειογένεση όπως αυτή αξιολογείται με βάση την ανοσοϊστοχημική έκφραση των VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 και CD105 είναι σημαντική υψηλότερη στο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη υπερπλασία.
2. Χαμηλότερη έκφραση και των 4 δεικτών σε σχέση με το καρκίνωμα παρατηρήθηκε στην υψηλόβαθμη προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (HGPIIN).
3. Η έκφραση των αγγειογενετικών δεικτών στην HGPIIN ήταν γενικά υψηλότερη σε σχέση με την υπερπλασία, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους με την εξαίρεση μόνο την εντονότερη έκφραση του VEGFR-2 στην HGPIIN.
4. Στο καρκίνωμα του προστάτη, ο VEGFR-2 είναι ο υποδοχέας που εκφράζεται περισσότερο και επιπλέον η έκφραση του VEGFR-2 συνοδεύεται από υπερέκφραση του VEGF καθώς και του VEGFR-1.
5. Όσον αφορά την υπερπλασία του προστάτη η έκφραση του VEGFR-1 συνοδεύεται και από υπερέκφραση του VEGFR-2, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των υπολοίπων δεικτών.
6. Η ενδογλίνη (CD105) φαίνεται να αποτελεί ισχυρό και αξιόπιστο δείκτη αξιολόγησης της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD). Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον VEGF και εκφράστηκε κατά βάση από τα νεοπλασματικά νεοαγγεία ενώ τα μεσεγχυματικά, τα φλεγμονώδη και τα φυσιολογικά αγγεία ήταν

πάντα αρνητικά ως προς το CD105. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του CD105 με του υποδοχείς του VEGF.

7. Η αυξημένη αγγειογένεση στο καρκίνωμα συσχετίζεται με δυσμενείς παθολογοανατομικές παραμέτρους όπως κακή διαφοροποίηση και περινευρική διήθηση του νεοπλασματος καθώς παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση των παραπάνω παραμέτρων με την αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα καθώς και την αυξημένη έκφραση του VEGF.
8. Η υπερέκφραση του VEGF σχετίζεται επίσης με προχωρημένο στάδιο νεοπλασματικής νόσου.
9. Η αγγειογένεση φαίνεται να αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για τον καρκίνο του προστάτη, ενώ μελλοντικά πιθανόν να ενσωματωθεί στη σταδιοποίηση της νόσου.
10. Η αξιολόγηση της αγγειογένεσης στους ασθενείς με καρκίνο του προστάτη θα βοηθήσει στην ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου. Βρίσκονται σε στάδια προχωρημένων κλινικών δοκιμών αντί-αγγειογενετικά φάρμακα με στόχο μια επιπλέον θεραπευτική επιλογή στην προσπάθεια αντιμετώπισης της νόσου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγγειογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που φυσιολογικά εμφανίζεται ήδη κατά τη εμβρυική περίοδο και συνεχίζεται και στον ενήλικα. Αναμφισβήτητα όμως η αγγειογένεση ρυθμίζει την επιβίωση, την ανάπτυξη και το μεταστατικό δυναμικό των νεοπλασματικών κυττάρων. Στην διαδικασία αυτή ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF) έχει κεντρικό ρόλο, ενώ η μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) όπως αυτή αξιολογείται με τη βοήθεια της ενδογλίνης (CD105) θεωρείται ότι έχει σπουδαία προγνωστική αξία. Υπάρχει διχογνωμία όσον αφορά την ύπαρξη εντονότερης αγγειογένεσης στο καρκίνωμα σε σχέση με την υπερπλασία του προστάτη ενώ και ο ρόλος της μικροαγγειακής πυκνότητας στην πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη, αποτελεί επίσης αντικείμενο συζητήσεων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η αξιολόγηση της αγγειογένεσης στην υπερπλασία, την υψηλόβαθμη (high grade) προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία (HGPIIN) και το καρκίνωμα του προστάτη και η αναζήτηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των δεικτών αγγειογένεσης και συγκεκριμένων κλινικών και παθολογοανατομικών παραμέτρων του καρκίνου του προστάτη. Η παρούσα μελέτη ήταν αναδρομική. Επιλέχθηκαν 39, 12 και 51 δείγματα υπερπλασίας, HGPIIN και καρκινώματος, αντίστοιχα. Με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικών μεθόδων αξιολογήθηκε η έκφραση του VEGF και των υποδοχέων του (VEGFR-1, VEGFR-2). Επιπλέον προσδιορίστηκε η μικροαγγειακή πυκνότητα, χρησιμοποιώντας ως δείκτη την ενδογλίνη (CD105). Καταγράφηκαν τυχόν διαφορές στην έκφραση των 4 παραπάνω δεικτών ανάλογα με τη διάγνωση καθώς και τις τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των 4 δεικτών ανά πάθηση ξεχωριστά. Επιπλέον στα καρκινώματα μελετήθηκε η ύπαρξη

πιθανής συσχέτισης μεταξύ των αγγειογενετικών δεικτών και παραμέτρων όπως το παθολογοανατομικό στάδιο, η διαφοροποίηση της νόσου, η παρουσία περινευρικής διήθησης και η εφαρμογή συμπληρωματικής ακτινοθεραπείας.

Παρατηρήθηκε ότι η αγγειογένεση είναι σημαντική υψηλότερη στο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη σε σχέση με την καλοήγη υπερπλασία και την υψηλόβαθμη προστατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της υπερπλασίας και της HGPIN, με εξαίρεση την εντονότερη έκφραση του VEGFR-2 στην HGPIN. Στο καρκίνωμα ο υποδοχέας VEGFR-2 είναι αυτός που εκφράστηκε περισσότερο, ενώ η έκφραση του VEGFR-2 συνδέθηκε με υπερέκφραση τόσο του VEGF όσο και του VEGFR-1. Στην υπερπλασία η έκφραση του VEGFR-1 συνοδεύτηκε και από υπερέκφραση του VEGFR-2.

Η αξία της ενδογλίνης ως δείκτη αξιολόγησης της μικροαγγειακής πυκνότητας τεκμηριώθηκε και στη μελέτη μας. Ο εν λόγω δείκτης βρέθηκε να εκφράζεται έντονα κυρίως στα νεοπλασματικά νεοαγγεία ενώ τα μεσεγχυματικά, τα φλεγμονώδη και τα φυσιολογικά αγγεία ήταν πάντα αρνητικά ως προς το CD105. Επιπλέον καταγράφηκε συσχέτιση της υπερέκφρασης του VEGF και της υψηλής MVD.

Τεκμηριώθηκε επίσης η αξία των VEGF και CD105 ως προγνωστικοί δείκτες του προστατικού καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση των παραπάνω δεικτών με δυσμενείς παθολογοανατομικές παραμέτρους όπως η κακή διαφοροποίηση και η ύπαρξη περινευρικής διήθησης ενώ η υπερέκφραση του VEGF σχετίστηκε και με προχωρημένο στάδιο νεοπλασματικής νόσου.

Συμπερασματικά η αγγειογένεση είναι σημαντικά υψηλότερη στο καρκίνωμα συγκριτικά με την υπερπλασία και την HGPIN, ενώ δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ

των δύο τελευταίων. Πιθανόν η αγγειογένεση να αποτελέσει βασικό μέρος ενός νέου συστήματος σταδιοποίησης και πρόγνωσης του καρκίνου του προστάτη ενώ το μέλλον θα δείξει εάν η φαρμακευτική αναστολή της διαδικασίας αυτής θα μπορέσει να προστεθεί και να συνδυασθεί με τις ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές επιλογές.

UNIVERSITY OF IOANNINA  
SCHOOL OF MEDICINE  
DEPARTMENT OF PATHOLOGY

Immunohistochemical study of angiogenesis in benign prostatic hyperplasia, prostatic  
intraepithelial neoplasia and prostate cancer.

Nikolaos K. Grivas, M.D

IOANNINA 2013



**ABSTRACT**

Angiogenesis is a complex process, which normally begins during the embryonic period and continues occasionally in the adult life. Additionally, it is well defined, that angiogenesis regulates the survival, growth and metastatic potential of tumor cells. This process is tightly controlled by numerous positive and negative angiogenic factors. Vascular endothelial factor (VEGF) and its receptors play a critical role in angiogenesis. Microvascular density (MVD) contributes to the quantification of angiogenesis. MVD is better evaluated with the newly proposed marker endoglin (CD105), a protein considered to have important prognostic value. There is great controversy regarding the presumed greater angiogenic potential of prostate cancer (PCa) compared to benign prostatic hyperplasia (BPH), while a matter of debate is the role of microvascular density in the prognosis of prostate cancer. Finally the role of angiogenic process in prostatic intraepithelial neoplasia is not yet fully elucidated.

Purpose of this study was to evaluate and compare angiogenesis in BPH, high grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and PCa. Additionally, we investigated possible correlations between the expression of 4 angiogenic markers and specific pathological parameters of PCa. The study was retrospective and included 39, 12 and 51 samples of BPH, HGPIN and PCa, respectively. In each sample, immunohistochemical methods were applied in order to evaluate the expression of VEGF and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2). Additionally, microvascular density was assessed, using CD105 as angiogenic marker. We recorded possible differences in the expression of VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 and CD105 between BPH, HGPIN and PCa. Moreover, we assessed possible correlation between the expression of the above

markers in each diagnosis, separately. In Pca samples, we recorded stage, differentiation, perineural invasion and adjuvant radiotherapy and their correlation with VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 and CD105.

Evaluation of VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 expression led to the conclusion that angiogenesis is significantly higher in PCa compared to BPH ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$  and  $p=0,00$ , respectively) and HGPIN ( $p=0,00$ ,  $p=0,00$  and  $p=0,04$ , respectively), while there was no statistically significant difference between BPH and HGPIN ( $p=1,000$ ,  $p=0,981$  and  $p=0,492$ , respectively). VEGFR-2 was the receptor with the strongest expression, while the expression of VEGFR-2 was associated with overexpression of VEGF ( $p=0,032$ ) and VEGFR-1 ( $p=0,015$ ). In BPH, expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 was significantly correlated ( $p=0,032$ ).

Endoglin value as marker of microvascular density, was also documented in our study. MVD was significantly higher in PCa compared to BPH ( $p=0,000$ ) and HGPIN ( $p=0,002$ ), while there was no statistically significant difference between BPH and HGPIN ( $p=0,952$ ). CD105 was strongly expressed primarily in intratumoral blood vessels while mesenchymal-inflammatory cells and normal vessels were always negative for CD105. Additionally, positive correlation was observed between VEGF overexpression and high MVD ( $p=0,052$ ).

VEGF and CD105 were found to be significant prognostic markers of PCa. We observed correlation of these markers with adverse pathologic parameters such as poor differentiation ( $p=0,044$  and  $p=0,038$ , respectively) and perineural invasion ( $p=0,002$  and  $p=0,019$ , respectively) while overexpression of VEGF was associated with advanced pathological stage ( $p=0,047$ ).

In conclusion, angiogenesis was significantly higher in PCa compared to BPH and HGPIN, while there was no difference between BPH-HGPIN. Its role is crucial

regarding survival and metastasis of tumor cells and it could play significant role as prognostic indicator in these patients. Pharmaceutical inhibition of angiogenesis will presumably be a valuable therapeutic option for PCa patients in the near future.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Prins GS, Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 2008;76 :641-59.
2. Shen MM, Wang X, Economides KD, et al. Progenitor cells for the prostate epithelium: roles in development, regeneration, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008;73: 529–538.
3. Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer* 2006;42: 1213–1218.
4. Sugimura Y, Cunha GR, Bigsby RM. Androgenic induction of DNA synthesis in prostatic glands induced in the urothelium of testicular feminized (Tfm/Y) mice. *Prostate* 1986;9: 217 –225.
5. Timms BG, Mohs TJ, Didio LJ. Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J Urol.* 1994;151: 1427–1432.
6. Norris JD, Chang CY, Wittmann BM, et al. The homeodomain protein HOXB13 regulates the cellular response to androgens. *Mol Cell* 2009;36: 405 –416.
7. Zhang Y, Ali TZ, Zhou H, et al. ErbB3 binding protein 1 represses metastasis-promoting gene anterior gradient protein 2 in prostate cancer. *Cancer Res* 2010;70: 240 –248.
8. Berman DM, Desai N, Wang X, et al. Roles for hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. *Dev Biol* 2004;267: 387 –398.
9. Kundra V, Silverman PM, Matin SF, et al. Imaging in oncology from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center: diagnosis, staging, and surveillance of prostate cancer. *Am J Roentgenol* 2007;189: 830-44.

10. Wheeler TM. Anatomy of the prostate and the pathology of prostate cancer. In: Vogelzang NJ, Shipley WU, Scardino PT, Coffey DS, eds. Comprehensive textbook of genitourinary oncology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:587–604.
11. Lawson DA, Xin L, Lukacs R, et al. Prostate stem cells and prostate cancer. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2005;70: 187-96.
12. McNeal JE. Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol 1988; 12: 619-33.
13. Lowsley OS, Perez VA Persistent anterior lobe of the prostate gland. J Urol 1954;71: 469-74.
14. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, et al. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma: correlation with histologic pattern and direction of spread. Am J Surg Pathol 1988;12: 897–906.
15. Clegg EJ. The arterial supply of the human prostate and seminal vesicles. J Anat 1955;89: 209–216.
16. Chung LW. The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. Cancer Surv 1995;23: 33-42.
17. Byrne RL, Leung H, Neal DE. Peptide growth factors in the prostate as mediators of stromal epithelial interaction. Br J Urol 1996;77: 627-33.
18. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, et al. The development of human prostatic hyperplasia with age. J Urol 1984;132: 474–479.
19. Roehrborn CG, McConnell JD. Etiology, pathophysiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ, editors. Campbell's Urology. 8th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 2002. pp. 1297–1336.

20. McConnell JD. Prostatic growth: new insights into hormonal regulation. *Br J Urol* 1995; 76(suppl 1): 5–10.
21. Walsh PC, Madden JD, Harrod M. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2: decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias. *N Engl J Med* 1974;291: 944–949.
22. Wu JP, Gu FL. The prostate 41–65 years post castration: an analysis of 26 eunuchs. *Chin Med J* 1987; 100:271.
23. Russell PJ, Bennett S, Stricker P. Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* 1998;44: 705–723.
24. Parsons JK. Benign Prostatic Hyperplasia and Male Lower Urinary Tract Symptoms: Epidemiology and Risk Factors. *Curr Bladder Dysfunct Rep* 2010;5: 212-218.
25. De Nunzio C, Aronson W, Freedland SJ, et al. The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases. *Eur Urol* 2012;61: 560-70.
26. Kesarwani P, Mittal RD. Association of Pro/Anti-inflammatory Cytokine Gene Polymorphisms with Benign Prostate Hyperplasia Risk. *Indian J Clin Biochem* 2010;25: 342-8.
27. Roehrborn CG. Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH). *Med Clin North Am* 2011;95: 87-100.
28. Shapiro E, Becich MJ, Hartnato V, et al. The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia as related to the development of clinical BPH. *J Urol* 1992;147: 1293-1297.
29. Homma Y, Kawabe K, Tsukamoto T, et al. Estimate criteria for diagnosis and severity in benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol* 1996;3: 261-266.

30. Rhodes T, Girman CJ, Jacobsen SJ, et al. Longitudinal prostate growth rates during 5 years in randomly selected community men 40–79 years old. *J Urol* 1999;161: 1174–1179.
31. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. (2010). IARC, Lyon.
32. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46: 765–781.
33. Zullig LL, Jackson GL, Dorn RA, et al. Cancer incidence among patients of the U.S. Veterans Affairs Health Care System. *Mil Med* 2012;177: 693-701.
34. Major JM, Norman Oliver M, Doubeni CA, et al. Socioeconomic status, healthcare density, and risk of prostate cancer among African American and Caucasian men in a large prospective study. *Cancer Causes Control* 2012;23: 1185-91.
35. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries. *BJU Int* 2002;90: 174-84.
36. Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol* 1991;30: 133-40
37. Klotz L. Active surveillance for favorable-risk prostate cancer: background, patient selection, triggers for intervention, and outcomes. *Curr Urol Rep* 2012;13: 153-9.
38. Guileyardo JM, Johnson WD, Welsh RA, et al. Prevalence of latent prostate carcinoma in two U.S. populations. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:311–316.
39. Billis A. Latent carcinoma and atypical lesions of prostate. An autopsy study. *Urology* 1986;28: 324–329.
40. Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;49: 8–31.

41. Rowley KH, Mason MD. The aetiology and pathogenesis of prostate cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1997;9: 213-8.
42. Larranaga N, Galceran J, Ardanaz E, et al. Prostate cancer incidence trends in Spain before and during the prostate specific antigen era: impact on mortality. *Ann Oncol* 2010;21: 83-9.
43. Miller PE, Morey MC, Hartman TJ, et al. Dietary patterns differ between urban and rural older, long-term survivors of breast, prostate, and colorectal cancer and are associated with body mass index. *J Acad Nutr Diet* 2012; 112: 824-31.
44. Arcangeli S, Pinzi V, Arcangeli G, et al. Epidemiology of prostate cancer and treatment remarks. *World J Radiol* 2012;4: 241-6.
45. Wingo PA, Cardinez CJ, Landis SH, et al. Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930-1998. *Cancer* 2003;97(12 Suppl): 3133-275.
46. Page WF, Braun MM, Partin AW, et al. Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins. *Prostate*. 1997;33(4): 240-5.
47. Grönberg H, Damber L, Damber JE. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* 1994;152: 1484-7.
48. Powell IJ, Carpten J, Dunston G, et al. African-American heredity prostate cancer study: a model for genetic research. *J Natl Med Assoc* 2001;93(12 Suppl): 25S-28S.
49. Rökman A, Ikonen T, Mononen N, et al. ELAC2/HPC2 involvement in hereditary and sporadic prostate cancer. *Cancer Res*. 2001;61: 6038-41.
50. Lindmark F, Zheng SL, Wiklund F, et al. H6D polymorphism in macrophage-inhibitory cytokine-1 gene associated with prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;96: 1248-54.
51. Porter MP, Stanford JL. Obesity and the risk of prostate cancer. *Prostate* 2005;62: 316-21.



52. Aronson WJ, Tymchuk CN, Elashoff RM, et al. Decreased growth of human prostate LNCaP tumors in SCID mice fed a low-fat, soy protein diet with isoflavones. *Nutr Cancer* 1999;35: 130-6.
53. Bosetti C, Filomeno M, Riso P, et al. Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case-control studies. *Ann Oncol* 2012;23: 2198-203.
54. Männistö S, Pietinen P, Virtanen MJ, et al. Fatty acids and risk of prostate cancer in a nested case-control study in male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12: 1422-8.
55. Platz EA, Leitzmann MF, Rifai N, et al. Sex steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14: 1262-9.
56. Makridakis N, Akalu A, Reichardt JK, et al. Identification and characterization of somatic steroid 5alpha-reductase (SRD5A2) mutations in human prostate cancer tissue. *Oncogene* 2004;23: 7399-405.
57. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, et al. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology* 1993;42: 365-74.
58. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, et al. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/ml or less. *J Urol* 1999;161: 835-9.
59. Brawer MK. The diagnosis of prostatic carcinoma. *Cancer*. 1993;71(3 Suppl): 899-905.
60. Hamilton W, Sharp D, Peters T, et al. Clinical features of prostate cancer before diagnosis: a population-based, case-control study. *Br J Gen Pract*. 2006;56: 756-762.

61. Gibel LJ, Hartshorne MF, Tzamaloukas AH. Rapidly developing lower abdominal mass with pronounced azotemia: the importance of imaging. *South Med J* 2008;101:767-8.
62. McGee RS, Herr JC. Human seminal vesicle-specific antigen is a substrate for prostate-specific antigen (or P-30). *Biol Reprod* 1988;39: 499-510.
63. Myrtle JF. *Clin Chem*. More on "hook effects" in immunometric assays for prostate-specific antigen. 1989;35: 2154-5.
64. Oesterling JE, Chan DW, Epstein JI, et al. Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 1988 ;139: 766-72.
65. Monne M, Croce CM, Yu H, Diamandis EP. Molecular characterization of prostate-specific antigen messenger RNA expressed in breast tumors. *Cancer Res* 1994;54: 6344-7.
66. Levesque MA, Clark GM, Yu H, Diamandis EP. Immunofluorometric analysis of p53 protein and prostate-specific antigen in breast tumours and their association with other prognostic indicators. *Br J Cancer* 1995;72: 720-7.
67. Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem*. 1990;194: 755-63.
68. Carter HB. A PSA threshold of 4.0 ng/mL for early detection of prostate cancer: the only rational approach for men 50 years old and older. *Urology* 2000;55: 796-9.
69. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, et al. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res* 1991;51: 222-6.

70. Lilja H, Christensson A, Dahlén U, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991;37: 1618-25.
71. Stamey TA, Yang N, Hay AR. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987;317: 909-16.
72. Guess HA, Heyse JF, Gormley GJ, et al. Effect of finasteride on serum PSA concentration in men with benign prostatic hyperplasia. Results from the North American phase III clinical trial. *Urol Clin North Am.* 1993;20: 627-36.
73. Bazinet M, Meshref AW, Trudel C, et al. Prospective evaluation of prostate-specific antigen density and systematic biopsies for early detection of prostatic carcinoma. *Urology* 1994;43:44-51.
74. Cooner WH. Prostate cancer. *J Urol* 1994;151:103-4.
75. Prestigiacomo AF, Stamey TA. Physiological variation of serum prostate specific antigen in the 4.0 to 10.0 ng./ml. range in male volunteers. *J Urol* 1996;155: 1977-80.
76. Carter HB, Morrell CH, Pearson JD, et al. Estimation of prostatic growth using serial prostate-specific antigen measurements in men with and without prostate disease. *Cancer Res.* 1992;52: 3323-8.
77. Mikolajczyk SD, Grauer LS, Millar LS, et al. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of the free PSA in prostate cancer serum. *Urology* 1997;50: 710-4.
78. Van Der Crujisen-Koeter IW, Wildhagen MF, De Koning HJ, et al. The value of current diagnostic tests in prostate cancer screening. *BJU Int* 2001;88: 458-66.
79. Terris MK. Significant changes in transrectal ultrasonic measurements of the prostate in relation to the degree of rectal wall distention. *Ultrasound Med Biol.* 2000;26: 1057.

80. Grivas N, Hastazeris K, Kafarakis V, et al. Prostate cancer epidemiology in a rural area of North Western Greece. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13: 999-1002.
81. Ayala AG, Ro JY, Babaian R. The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1989;13: 21-7.
82. Ng JC, Koch MO, Daggy JK. Perineural invasion in radical prostatectomy specimens: lack of prognostic significance. *J Urol* 2004;172: 2249-51.
83. Ohori M, Scardino PT, Lapin SL. The mechanisms and prognostic significance of seminal vesicle involvement by prostate cancer. *Am J Surg Pathol.* 1993;17: 1252-61.
84. Fry DE, Amin M, Harbrecht PJ. Rectal obstruction secondary to carcinoma of the prostate. *Ann Surg.* 1979;189: 488-92.
85. Saitoh H, Hida M, Shimbo T, et al. Metastatic patterns of prostatic cancer. Correlation between sites and number of organs involved. *Cancer* 1984;54: 3078-84.
86. McLaughlin AP, Saltzstein SL, McCullough DL, et al. Prostatic carcinoma: incidence and location of unsuspected lymphatic metastases. *J Urol* 1976;115: 89-94.
87. Pound CR, Partin AW, Epstein JI, et al. Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control. *Urol Clin North Am* 1997;24: 395-406.
88. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C, et al.. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. Wiley-Blackwell 2009;7th edn: 243-248.
89. Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, et al. Contemporary update of the prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology* 2001;58: 843-8.

90. Smith JA, Scardino PT, Resnick MI, et al. Transrectal ultrasound versus digital rectal examination for the staging of carcinoma of the prostate: results of a prospective multi-institutional trial. *J Urol* 1997;157: 902-6.
91. Masterson TA, Touijer K. The role of endorectal coil MRI in preoperative staging and decision-making for the treatment of clinically localized prostate cancer. *MAGMA* 2008;21: 371-7.
92. Scheidler J, Hricak H, Vigneron DB, et al. Prostate cancer: localization with three-dimensional proton MR spectroscopic imaging - clinicopathologic study. *Radiology* 1999;213: 473-80.
93. Heidenreich A, Varga Z, Von Knobloch R. Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. *J Urol* 2002;167: 1681-6.
94. Weckermann D, Dorn R, Trefz M, et al. Sentinel lymph node dissection for prostate cancer: experience with more than 1,000 patients. *J Urol* 2007;177: 916-20.
95. McGregor B, Tulloch AG, Quinlan MF, et al. The role of bone scanning in the assessment of prostatic carcinoma. *Br J Urol* 1978;50: 178-81.
96. Bruwer G, Heyns CF, Allen FJ. Influence of local tumour stage and grade on reliability of serum prostate-specific antigen in predicting skeletal metastases in patients with adenocarcinoma of the prostate. *Eur Urol* 1999;35: 223-7.
97. Even-Sapir E, Metser U, Mishani E, et al. The detection of bone metastases in patients with high risk prostate cancer: 99mTc-MDP Planar bone scintigraphy, single- and multifold-of-view SPECT, 18F-fluoride PET/CT. *J Nucl Med* 2006;47: 287-97.
98. Bostwick DG, Mann RB. Malignant lymphomas involving the prostate. A study of 13 cases. *Cancer*. 1985;56: 2932-8.

99. Sawczuk I, Tannenbaum M, Olsson CA, et al. Primary transitional cell carcinoma of prostatic periurethral ducts. *Urology* 1985;25: 339-43.
100. Sexton WJ, Lance RE, Reyes AO, et al. Adult prostate sarcoma: the M. D. Anderson Cancer Center Experience. *J Urol* 200;166: 521-5.
101. Freedland SJ, Partin AW, Epstein JI, et al. Biochemical failure after radical prostatectomy in men with pathologic organ-confined disease: pT2a versus pT2b. *Cancer* 2004;100: 1646-9.
102. Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, et al. ISUP grading committee. The 2005 International Society of Urologic Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29: 1228-42.
103. Iczkowski KA. Current prostate biopsy interpretation: criteria for cancer, atypical small acinar proliferation, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, and use of immunostains. *Arch Pathol Lab Med*;130: 835-43.
104. Billis A, Guimaraes MS, Freitas LL, et al. The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. *J Urol* 2008;180: 548-52.
105. Harnden P, Shelley MD, Coles B, et al. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncology* 2007;8: 411-9.
106. Steinberg DM, Sauvageot J, Piantadosi S, et al. Correlation of prostate needle biopsy and radical prostatectomy Gleason grade in academic and community settings. *Am J Surg Pathol* 1997;21: 566-77
107. Lane RB Jr, Lane CG, Mangold KA, et al. Needle biopsies of the prostate: what constitutes adequate histologic sampling? *Jr. Arch Pathol Lab Med* 1998;122: 833-5.

108. McNeal JE, Bostwick DG. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum Pathol.* 1986;17: 64-71.
109. Häggman MJ, Macoska JA, Wojno KJ, et al. The relationship between prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: critical issues. *J Urol* 1997;158: 12-22.
110. Shepherd D, Keetch DW, Humphrey PA, et al. Repeat biopsy strategy in men with isolated prostatic intraepithelial neoplasia on prostate needle biopsy. *J Urol* 1996;156: 460-2.
111. Adolfsson J. Watchful waiting and active surveillance: the current position. *BJU Int* 2008;102: 10-4.
112. Chan TY, Partin AW, Walsh PC. Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy. *Urology* 2000;56: 823-7.
113. Sogani PC, Israel A, Lieberman PH, et al. Gleason grading of prostate cancer: a predictor of survival. *Urology* 1985;25: 223-7.
114. Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol.* 1994;152: 1831-6.
115. Middleton RG, Thompson IM, Austenfeld MS, et al. Prostate Cancer Clinical Guidelines Panel Summary report on the management of clinically localized prostate cancer. The American Urological Association. *J Urol* 1995;154: 2144-8.
116. Jonsson E, Sigbjarnarson HP, Tomasson J, et al. Adenocarcinoma of the prostate in Iceland: a population-based study of stage, Gleason grade, treatment and long-term survival in males diagnosed between 1983 and 1987. *Scand J Urol Nephrol* 2006;40: 265-71.

117. Griebing TL, Williams RD. Staging of incidentally detected prostate cancer: role of repeat resection, prostate-specific antigen, needle biopsy, and imaging. *Semin Urol Oncol* 1996;14: 156-64.
118. Weissbach L, Schäfer C, Heidenreich A. A paradigm shift. Defensive strategies for the treatment of localized prostate cancer in the new S3 guideline. *Der Urologe A* 2010;49: 199-200.
119. Bianco FJ Jr, Scardino PT, Eastham JA. Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function (“trifecta”). *Urology* 2005;66: 83-94.
120. Pound CR, Partin AW, Epstein JI, et al. Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control. *Urol Clin North Am* 1997;24: 395-406.
121. Hull GW, Rabbani F, Abbas F, et al. Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol* 2002;167: 528-34.
122. Engel J, Bastian PJ, Baur H, et al. Survival benefit of radical prostatectomy in lymph node-positive patients with prostate cancer. *Eur Urol*. 2010;57: 754-61.
123. Consensus statement: the management of clinically localized prostate cancer. National Institutes of Health Consensus Development Panel (no authors listed). *NCI Monogr* 1988;7: 3-6.
124. Nilsson S, Norlen BJ, Widmarks A. A systematic overview of radiation therapy effects in prostate cancer. *Acta Oncol* 2004;43: 316-8.
125. Pollack A, Zagars GK, Smith LG, et al. Preliminary results of a randomized radiotherapy dose-escalation study comparing 70 Gy with 78 Gy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 2000;18: 3904-11.



126. Holm HH, Juul N, Pedersen JF, et al. Transperineal seed implantation in prostatic cancer guided by transrectal ultrasonography. *J Urol* 1983;130: 283-6.
127. Kupelian PA, Potters L, Ciezki JP, et al. Radical prostatectomy, external beam radiotherapy < 72 Gy, external radiotherapy > or = 72 Gy, permanent seed implantation or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-2 prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58: 25-33.
128. Roach M, Bae K, Speight J, et al. Short-term neoadjuvant androgen deprivation therapy and external-beam radiotherapy for locally advanced prostate cancer: long term results of RTOG 8610. *J Clin Oncol* 2008;26: 585-91.
129. Shelley MD, Kumar S, Wilt T, et al. A systematic review and meta-analysis of randomised trials of neo-adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2009;35: 9-17.
130. McLeod DG, Iversen P, See WA, et al. Casodex Early Prostate Cancer Trialists' Group. Bicalutamide 150 mg plus standard care vs standard care alone for early prostate cancer. *BJU Int* 2006;97: 247-54.
131. Ward JF, Zincke H. Radical prostatectomy for the patient with locally advanced prostate cancer. *Curr Urol Rep* 2003;4: 196-204.
132. Johnstone PA, Ward KC, Goodman M, et al. Radical prostatectomy for clinical T4 prostate cancer. *Cancer* 2006;106: 2603-9.
133. Schulman CC, Debruyne FM, Forster G, et al. 4-Year follow-up results of a European prospective randomized study on neoadjuvant hormonal therapy prior to radical prostatectomy in T2-3N0M0 prostate cancer. European Study Group on Neoadjuvant Treatment of Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2000;38: 706-13.

134. Valicenti RK, Gomella LG, Ismail M, et al. The efficacy of early adjuvant radiation therapy for pT3N0 prostate cancer: a matched-pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45: 53-8.
135. Ghavamian R, Bergstralh EJ, Blute ML, et al. Radical retropubic prostatectomy plus orchiectomy versus orchiectomy alone for pTxN+ prostate cancer: a matched comparison. *J Urol* 1999;161: 1223-7.
136. Messing EM, Manola J, Yao J, et al. Eastern Cooperative Oncology Group study EST 3886. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol* 2006;7: 472-9.
137. Spaas PG, Bagshaw MA, Cox RS. The value of extended field irradiation in surgically staged carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15: 133.
138. Warde P. Intergroup (NCIC CTG, CUOG, ECOG, CALGB, SWOG). Phase III randomized trial comparing total androgen blockade versus total androgen blockade plus pelvic irradiation in clinical stage T3-4, N0, M0 adenocarcinoma of the prostate. National Cancer Institute of Canada, Clinical Trials Group, 1995.
139. Mason M, Warde P, Sydes M, et al. The National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group PR3/; Medical Research Council PR07 Trial Management Group. Defining the need for local therapy in locally advanced prostate cancer: an appraisal of the MRC PR07 study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005;17: 217-8.
140. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *J Urol* 2002;167: 948-51.

141. McLeod DG. Hormonal therapy: historical perspective to future directions. *Urology* 2003;61: 3-7.
142. Miyamoto H, Messing EM, Chang C. Does androgen deprivation improve treatment outcomes in patients with low-risk and intermediate-risk prostate cancer? *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2: 236-7.
143. Benaim EA, Pace CM, Roehrborn CG. Gleason score predicts androgen independent progression after androgen deprivation therapy. *Eur Urol* 2002;42: 12-7.
144. Miller JJ, Ahmann FR, Drach GW, et al. The clinical usefulness of serum prostate specific antigen after hormonal therapy of metastatic prostate cancer. *J Urol* 1992;147: 956-61.
145. Desmond AD, Arnold AJ, Hastie KJ. Subcapsular orchiectomy under local anaesthesia. Technique, results and implications. *Br J Urol* 1988;61: 143-5.
146. Kruus LK, Palmer S, Malkowicz S, et al; University of Pennsylvania Cancer Center, Philadelphia, PA. The influence of fatigue and hot flashes on the quality of life in prostate cancer patients. 2001 ASCO Meeting, 12-15 May, San Francisco, USA, p. 1594.
147. Oh WK. The evolving role of estrogen therapy in prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* 2002;1: 81-9.
148. Klotz L, McNeill I, Fleshner N. A phase 1-2 trial of diethylstilbestrol plus low dose warfarin in advanced prostate carcinoma. *J Urol* 1999;161: 169-72.
149. Agarwal DK, Costello AJ, Peters J, et al. Differential response of prostate specific antigen to testosterone surge after luteinizing hormone-releasing hormone analogue in prostate cancer and benign prostatic hypertrophy. *BJU Int* 2000;85: 690-5.

150. Limonta P, Montagnani MM, Moretti RM. LHRH analogues as anticancer agents: pituitary and extrapituitary sites of action. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10: 709-20.
151. Van Poppel H, Tombal B, de la Rosette JJ, et al. Degarelix: a novel gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor blocker—results from a 1-yr, multicentre, randomised, phase 2 dosage-finding study in the treatment of prostate cancer. *Eur Urol* 2008;54: 805-13.
152. Anderson J. The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int* 2003;91: 455-61.
153. Moul JW. Twenty years of controversy surrounding combined androgen blockade for advanced prostate cancer. *Cancer* 2009;115: 3376-8.
154. Mahler C, Verhelst J, Denis L. Ketoconazole and liarozole in the treatment of advanced prostatic cancer. *Cancer* 1993;71: 1068-73.
155. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *New Engl J Med* 2004 ;351: 1513-20.
156. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, et al. TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *New Engl J Med* 2004;351: 1502-12.
157. George DJ. Receptor tyrosine kinases as rational targets for prostate cancer treatment: platelet-derived growth factor receptor and imatinib mesylate. *Urology* 2002;60: 115-21
158. Sweeney P, Karashima T, Kim SJ, et al. Anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody reduces tumorigenicity and metastasis in orthotopic prostate cancer xenografts via induction of endothelial cell apoptosis and reduction of

- endothelial cell matrix metalloproteinase type 9 production. *Clin Cancer Res* 2002;8: 2714-24.
159. Fox WD, Higgins B, Maiese KM, et al. Antibody to vascular endothelial growth factor slows growth of an androgen-independent xenograft model of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8: 3226-31.
160. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175: 409-416.
161. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25: 581-611.
162. Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 1997;173: 206-210.
163. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988;102: 471-478.
164. Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 1997;173: 206-10.
165. Folkman. J, Shing. Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem* 1992;267: 10931–10934.
166. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1: 27-31.
167. Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst* 1990;82: 4-6.
168. Rafii S. J. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *Clin Invest* 2000;105: 17-9.
169. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85: 221-8.

170. M. Greenblatt, P. Shubi. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer Inst* 1968;41: 111–124.
171. Ehrmann RL, Knoth M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J. Natl. Cancer Inst* 1968;41: 1329–1341.
172. Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, et al. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806: 18-28.
173. Nakagawa K, Chen YX, Ishibashi H, et al. Angiogenesis and its regulation: roles of vascular endothelial cell growth factor. *Semin Thromb Hemost* 2000;26: 61-66.
174. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86: 353–364.
175. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med* 2000;6: 389–395.
176. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005;16: 159–178.
177. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol, Cell Physiol* 2002;282: 947-970.
178. Blumenson LE, Bross ID. A possible mechanism for enhancement of increased production of tumor angiogenic factor. *Growth* 1976;40: 205-9.
179. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379: 88–91.

180. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-5.
181. Folkman J, Merler E, Abernathy C, et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133: 275–288.
182. Abraham JA, Mergia A, Whang JL, et al. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 1986;233: 545-8.
183. Vlodaysky I, Elkin M, Pappo O, et al. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J* 2000;2: Suppl:37–45
184. Feldman AL, Libutti SK. Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* 2000;89: 1181–1194.
185. Campbell SC. Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. *J Urol* 1997;158: 1663-74.
186. Schirner M, Hoffmann J, Menrad A, et al. Antiangiogenic chemotherapeutic agents: characterization in comparison to their tumor growth inhibition in human renal cell carcinoma models. *Clin Cancer Res.* 1998;4: 1331-6.
187. Jousseaume AM, Kruse FE, Völcker HE. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237: 920-7.
188. Gagliardi A, Collins DC. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. *Cancer Res* 1993;53: 533-5.
189. Vukanovic J, Hartley-Asp B, Isaacs JT. Inhibition of tumor angiogenesis and the therapeutic ability of linomide against rat prostatic cancers. *Prostate* 1995;26: 235-46.

190. Hartley-Asp B, Vukanovic J, Joseph IB, et al. Anti-angiogenic treatment with linomide as adjuvant to surgical castration in experimental prostate cancer. *J Urol* 1997;158: 902-7
191. Joseph IB, Nelson JB, Denmeade SR, et al. Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue. *Clin Cancer Res* 1997;3: 2507-11.
192. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990;348:555-7.
193. Horti J, Dixon SC, Logothetis CJ, et al. Increased transcriptional activity of prostate-specific antigen in the presence of TNP-470, an angiogenesis inhibitor. *Br J Cancer* 1999;79: 1588-93.
194. Tamargo RJ, Bok RA, Brem H. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res* 1999;51: 672-5.
195. Stein CA. Suramin: a novel antineoplastic agent with multiple potential mechanisms of action. *Cancer Res.* 1993;53: 2239-48.
196. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79: 315-28.
197. Gately S, Twardowski P, Stack MS, et al. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* 1996;56: 4887-90.
198. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274: 11721-6.
199. Grandér D, Einhorn S. Interferon and malignant disease--how does it work and why doesn't it always? *Acta Oncol* 1998;37: 331-8.



200. Singh RK, Gutman M, Bucana CD. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 4562-6.
201. Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.* 2000;6: 41-8.
202. Moses MA. The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1997;15: 180-9.
203. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 26;91: 4082-5.
204. Figg WD, Raje S, Bauer KS, et al. Pharmacokinetics of thalidomide in an elderly prostate cancer population.. *J Pharm Sci* 1999;88: 121-5.
205. Aragon-Ching JB, Dahut WL. About tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in prostate cancer: where do we go from here? *Ann Oncol* 2010;21: 183-4.
206. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246: 1306-9.
207. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25: 581–611.
208. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56: 549–80.
209. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219: 983-5.

210. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161: 851–8.
211. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 7311–5.
212. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84: 1470–8.
213. Plou et J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1989;8: 3801–6.
214. Levy AP, Tamargo R, Brem H, et al. An endothelial cell growth factor from the mouse neuroblastoma cell line NB41. *Growth Factors* 1989;2: 9–19.
215. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93: 1493-5.
216. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266: 11947–54.
217. Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N, et al. The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett* 2006;231: 1–11.
218. Muller YA, Li B, Christinger HW, et al. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 7192–7.

219. Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, et al. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 1996;271: 19310–7.
220. Iyer S, Scotney PD, Nash AD, et al. Crystal structure of human vascular endothelial growth factor-B: identification of amino acids important for receptor binding. *J Mol Biol* 2006;359: 76–85.
221. Joukov V, Sorsa T, Kumar V, et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *EMBO J* 1997;16: 3898–911.
222. Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, et al. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003;111: 1723–32.
223. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J Biol Chem* 1999;274: 32127–36.
224. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, et al. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics* 1997;42: 483–8.
225. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 9267–71.
226. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, et al. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* 2001;276: 12153–61.
227. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993;8: 925–31.

228. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999;18: 363–74.
229. Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors *Mol. Divers* 2006;10: 515–527.
230. Matsunaga Y, Yamazaki Y, Suzuki H, Morita T. VEGF-A and VEGF-F evoke distinct changes in vascular ultrastructure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 20;379: 872-5.
231. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380: 439–42.
232. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172: 1535–45.
233. Bootle-Wilbraham C.A, Tazzyman S, Thompson W.D, et al. Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Angiogenesis* 2001;4: 269–275
234. Barleon B, Sozzani S, Zhou D et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87: 3336–43.
235. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, et al. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990;50: 1774–8.
236. Bates D.O, Harper S.J .Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul. Pharmacol* 2002;39: 225–237.

237. Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR), rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1999;265: 636–699.
238. Gerber H.P, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem* 273;1998: 13313–13316.
239. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci* 2005;109: 227–241.
240. Gerber H.P, Malik A, Solar G.P, et al. Vascular endothelial growth factor regulates hematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002;417: 954–958
241. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor, a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med* 1990;172: 1535–1545.
242. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56: 549–80.
243. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18: 4–25.
244. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, et al. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991;174: 1275–8.
245. Lagercrantz J, Farnebo F, Larsson C, et al. A comparative study of the expression patterns for vegf, vegf-b/vrf and vegf-c in the developing and adult mouse. *Biochim Biophys Acta* 1998;1398: 157–63.

246. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998;153: 103–8.
247. Aase K, von Euler G, Li X, et al. Vascular endothelial growth factor- B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 2001;104: 358–64.
248. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1996;15: 1751–8.
249. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122: 3829–37.
250. Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, et al. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003;111: 1723–32.
251. Lymboussaki A, Olofsson B, Eriksson U, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C show overlapping binding sites in embryonic endothelia and distinct sites in differentiated adult endothelia. *Circ Res* 1999;85: 992–9.
252. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5: 74–80.
253. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 548–53.

254. Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol* 2003;201: 544–54.
255. Debinski W, Slagle-Webb B, Achen MG, et al. VEGF-D is an Xlinked/ AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme. *Mol Med* 2001;7: 598–608.
256. Achen MG, Williams RA, Minekus MP, et al. Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J Pathol* 2001;193: 147–54.
257. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005;25: 2441–9.
258. Matsumoto K, Suzuki K, Koike H, et al. Placental growth factor gene expression in human prostate cancer and benign prostate hyperplasia. *Anticancer Res* 2003;23: 3767–73.
259. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7: 575–83.
260. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxiainducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;59: 15–26.
261. Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, et al. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* 2006;237: 10–21.
262. Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 2006;7: 41–5.

263. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399: 271–5.
264. Berra E, Richard DE, Gothie E, Pouyssegur J. HIF-1-dependent transcriptional activity is required for oxygen-mediated HIF-1 degradation. *FEBS Lett* 2001;491: 85–90.
265. Mole D.R, Maxwell P.H, Pugh C.W, et al. Regulation of HIF by the von Hippel–Lindau tumour suppressor, implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB Life*, 52;2001: 43–47.
266. Koivunen P, Hirsila M, Gunzler V, et al. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 2004;279: 9899–904.
267. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105: 659–69.
268. Sugano Y, Matsuzaki K, Tahashi Y, et al. Distortion of autocrine transforming growth factor  $\beta$  signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 2003;22: 2309–21.
269. Ryuto M, Ono M, Izumi H, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor  $\alpha$  in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem* 1996;271: 28220–8.
270. Kawaguchi M, Akagi M, Gray MJ, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1. *Surgery* 2004;136:686–92.



271. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996;271: 736–41.
272. Huang SP, Wu MS, Shun CT, et al. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 2004;11: 517–27.
273. Bermont L, Lamielle F, Lorchel F, et al. Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messengers in endometrial adenocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86: 363–8.
274. Wang J, Luo F, Lu JJ, et al. VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *Int J Cancer* 2002;97: 163–7.
275. Haggstrom S, Lissbrant IF, Bergh A, et al. Testosterone induces vascular endothelial growth factor synthesis in the ventral prostate in castrated rats. *J Urol* 1999;161: 1620–5.
276. Lissbrant IF, Hammarsten P, Lissbrant E, et al. Neutralizing VEGF bioactivity with a soluble chimeric VEGF-receptor protein flt(1–3) IgG inhibits testosterone-stimulated prostate growth in castrated mice. *Prostate* 2004;58: 57–65.
277. Hyder SM, Murthy L, Stancel GM. Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998;58: 392–5.
278. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55: 4575–80.
279. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14: 263–77.
280. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *J Cell Sci* 2005;118: 3569–72.

281. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002;62: 506-11.
282. Williams CS, Tsujii M, Reese J, et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105: 1589-94.
283. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255: 989–91.
284. Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res* 2001;49: 568–581.
285. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994;269: 26988–95.
286. Peters KG, De Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 8915–9.
287. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 11709–14.
288. Huang K, Andersson C, Roomans G.M, et al. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 2001;33: 315–324.

289. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 10705–9.
290. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9: 936–43.
291. Clark DE, Smith SK, He Y, et al. A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998;59: 1540–8.
292. Huang L, Huang Z, Bai Z, et al. Development and strategies of VEGFR-2/KDR inhibitors. *Future Med Chem* 2012;4: 1839–52.
293. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999;274: 31047–54.
294. Gille H, Kowalski J, Li B, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). *J Biol Chem* 2001;276: 3222–30.
295. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, et al. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem* 2004;279: 22267–75.
296. Hutchings H, Ortega N, Plouet J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration and survival through integrin ligation. *FASEB J* 2003;17: 1520–1522.

297. Ebos JM, Bocci G, Man S, et al. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* 2004;2: 315–26.
298. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 1992;52: 5738–43.
299. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 3566–70.
300. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling—in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7: 359–71.
301. Nilsson I, Rolny C, Wu Y, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in hypoxia-induced vascular development. *FASEB J* 2004;18: 1507–15.
302. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, et al. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003;278: 40973–9.
303. Alam A, Herault JP, Barron P, et al. Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is necessary for VEGFR-3 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324: 909–15.
304. Klagsbrun M, Takashima S, Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv. Exp. Med. Biol* 2002;515: 33–48.
305. Mamluk R, Gechtman Z, Kutcher ME, et al. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J Biol Chem* 2002;277: 24818–25.

306. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, et al. Over expression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995;121: 4309–4318.
307. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002;129: 4797–4806.
308. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5: 1099–107.
309. Hrouda D, Nicol DL and Gardiner RA: The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer. *Urol Res* 2003;30: 347-355.
310. Sugamoto T, Tonji N, Sato K, et al. The expression of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with neovascularization. *Anticancer Res* 2001;21: 77-88.
311. Kwak C, Jin RJ, Park MS and Lee SE: Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2002;89: 303-309.
312. Kollerman J, Helpap B. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flk-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissue. *Am J Clin Pathol* 2001;116: 115-121.
313. Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD. Vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1997;157: 2323-2328.
314. Walsh K, Sriprasad S, Hopster D, et al. Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) in prostate disease. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002;5: 119-22.

315. Ferrer FA, Miller LJ, Andawis RI, et al. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. *Urology* 1998;51: 161-167.
316. Rick FG, Schally AV, Block NL, et al. LHRH antagonist Cetrorelix reduces prostate size and gene expression of proinflammatory cytokines and growth factors in a rat model of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2011;71: 736-47.
317. Wakui S, Furusato M, Itoh T, et al. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol*. 1992;168: 257-262.
318. Fanelli M, Locopo N, Gattuso D, et al. Assessment of tumor vascularization: immunohistochemical and non-invasive methods. *Int J Biol Markers*. 1999;14: 218-231.
319. Peyromaure M, Goulvestre C, Fulla Y, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients undergoing prostate biopsies for suspicion of prostate cancer. *Urology* 2005;66: 687–691.
320. Lorenzo G. Di, Figg W.D, Fossa S.D, et al. Combination of bevacizumab and docetaxel in docetaxel-pretreated hormone-refractory prostate cancer: a phase 2 study. *Eur Urol* 2008;54: 1089–1094.
321. Picus J, Halabi S, Kelly WK, et al. A phase 2 study of estramustine, docetaxel, and bevacizumab in men with castrate-resistant prostate cancer *Cancer* 2011;117: 526–533.
322. Small AC, Oh WK. Bevacizumab treatment of prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12: 1241-9.
323. Kelly WK, Halabi S, Carducci M, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel, prednisone, and placebo with

- docetaxel, prednisone, and bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: survival results of CALGB 90401. *J Clin Oncol* 2012;30: 1534-40.
324. Merino M, Pinto A, González R, et al. Antiangiogenic agents and endothelin antagonists in advanced castration resistant prostate cancer. *Eur J Cancer* 2011;47: 1846-51.
325. Steinbild S, Mross K, Frost A, et al. A clinical phase II study with sorafenib in patients with progressive hormone-refractory prostate cancer: a study of the CESAR Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIVA. *Br J Cancer* 2007;97: 1480–1485.
326. Dahut WL, Scripture C, Posadas E, et al. A phase II trial of sorafenib in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14: 209–214.
327. Michaelson D.M., Regan M.M., Oh W.K, et al. Phase II study of sunitinib in advanced prostate cancer. *Ann Oncol* 2009;20: 913–920.
328. Sonpavde G, Periman PO, Bernold D, et al. Sunitinib malate for castration-resistant prostate cancer following docetaxel-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2010;21: 319–324.
329. Adelberg D, Karakunnel JJ, Gulley JL, et al. A phase II study of cediranib in post-docetaxel in castration resistant prostate cancer. 2010 ASCO Genitourinary Cancer Symposium 2010;abstr 63.
330. Figg W.D., Hussain M.H., Gulley J.L, et al. A double-blind randomized crossover study of oral thalidomide versus placebo for androgen dependent prostate cancer treated with intermittent androgen ablation. *J Urol*, 2009;181: 1104–1113
331. Ning Y.M., Gulley J.L., Arlen P.M, et al. Phase II trial of bevacizumab, thalidomide, docetaxel and prednisone in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010;28: 2070–2076.

332. Huang X., Ning Y.M., Gulley J.L, et al. Phase II trial of bevacizumab, lenalidomide, docetaxel and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Clin Oncol*, 2011;29: 2070-76.
333. Moore CN, Creel P, Petros W, et al. Phase I/II study of docetaxel and atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, vol. 24, No. 18S (suppl.); 2006. p. 14504
334. James N.D., Caty A., Payne H, et al. Final safety and efficacy analysis of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain-free or mildly symptomatic for pain: a double-blind, placebo controlled, randomized phase II trial. *BJU Int* 2010;106: 966–973.
335. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, et al. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008;23: 601-7.
336. Brem S, Cotran R, Folkman J, et al. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J. Natl. Cancer Inst* 1972;48: 347-356.
337. Srivastava A, Laidler P, Davies R, et al. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. *Am. J. Pathol* 1988;133: 419-423.
338. Weidner N, Sample JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med* 1991;324: 1-8.
339. Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am. J. Pathol* 1993;143: 401-409.



340. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, et al. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 2000;60: 1388-1393.
341. Cantu De Leon D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, et al. Significance of microvascular density (MDV) in cervical cancer recurrence. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2003;13: 856-862.
342. Cernea CR, Ferraz AR, de Castro I.V, et al. Angiogenesis and skin carcinomas with skull base invasion: a case-control study. *Head Neck* 2004;26: 396-400.
343. Chandrachud KM, Pendleton N, Chisholm DM, et al. Relationship between vascularity, age and survival in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 1997;76: 1367-1375.
344. Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, et al. Prognostic significance of the microvascularcount in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol* 1996;14: 461-466.
345. Lackner C, Jukic Z, Tsybrovskyy O, et al. Prognostic relevance of tumour-associated macrophages and von Willebrand factor-positive microvessels in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2004;445: 160-167.
346. Korkolopoulou P, Apostolidou E, Pavlopoulos PM, et al. Prognostic evaluation of the microvascular network in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2001;15: 1369-1376.
347. Marrogi AJ, Travis WD, Welsh JA, et al. Nitric Oxide synthase, cyclooxygenase 2, and vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2000;6: 4739-4744.
348. Hillen F, van de Winkel A, Creytens D, et al. Proliferating endothelial cells, but not microvessel density, are a prognostic parameter in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2006;16: 453-457.

349. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38: 1564-79.
350. Fanelli M, Locopo N, Gattuso D, et al. Assessment of tumor vascularization: immunohistochemical and non-invasive methods. *Int J Biol Markers* 1999;14: 218-231.
351. Barth PJ, Weingartner K, Kohler HH, et al. Assessment of vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol.* 1996;27: 1306-1310.
352. Sandlund J, Hedberg Y, Bergh A, et al. Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int* 200;697: 706-710.
353. Haggstrom S, Bergh A, Damber JE. Vascular endothelial growth factor content in metastasizing and nonmetastasizing. Dunning prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2000;45: 42-50.
354. Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate.* 2002;51: 268-275.
355. De la Taille A, Katz AE, Bagiella E, et al. Microvessel density as a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy: a comparison of CD34 and CD31. *Am J Clin Pathol* 2000;113: 555-562.
356. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, et al. Intratumoral angiogenesis: a new prognostic indicator for stage I endometrial adenocarcinoma? *Oncol Res* 1999;11: 205-212.
357. Lindenmayer AE, Miettinen M. Immunophenotypic features of uterine stromal cells: CD34 expression in endocervical stroma. *Virchows Arch.* 1995;426: 457-460.

358. Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86: 386-388.
359. Kumar P, Wang JM, Bernabeu C. CD105 and angiogenesis. *J Pathol* 1996;178: 363-366.
360. Kumar S, Ghellal A, Li C, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999;59: 856-861.
361. Saad RS, Jasnosz KM, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2003;22: 248-253
362. Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, et al. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. *Obstet Gynecol* 2000;96: 224-228.
363. Saad RS, Liu YL, Nathan G, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2004;17: 197-203.
364. Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* 2002;131(1 suppl): S109-S113.
365. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, et al. Over-expression of endoglin (CD 105): a marker of breast carcinoma-induced neovascularization. *Anticancer Res* 1998;18: 3621-3628.
366. Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumors and normal tissues. *Int. J. Cancer* 1993;54: 363-370.

367. Thorpe P.E, Derbyshire E.J, King S.W, et al. Targeting the vasculature of carcinoma and other solid tumors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res* 1994;35: 379.
368. Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J. Natl. Cancer Inst* 1943;4: 47-53.
369. Vermeulen P.B, Libura M, Libura J, et al. Influence of investigator experience and microscopic field size on microvessel density in node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat* 1997;42: 165-172.
370. Hansen S, Grabaud D.A, Sorensen F.B, et al. The prognostic value of angiogenesis by Chalkley counting in a confirmatory study design on 836 breast cancer patients. *Clin. Cancer Res* 2000;6: 139-146.
371. Simpson JF, Ahn C, Battifora H et al. Endothelial area as a prognostic indicator for invasive breast carcinoma. *Cancer* 1996;77: 2077-2085.
372. Lehr H.A, Mankoff D.A, Corwin D, et al. Application of Photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J. Histochem. Cytochem* 1997;45: 1559-1565.
373. Schoell W.M, Pieber D, Reich O, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: quantification of endothelial immunoreactivity regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 1997;17: 71-77.
374. Foley SJ, Bailey DM. Microvessel density in prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2000;85: 70-3.
375. Brawer MK, Deering RE, Marianne B, et al. Predictors of pathologic stage in prostate carcinoma: the role of neovascularity. *Cancer* 1994;73: 678-687.
376. Offersen BV, Borre M, Overgaard J, et al. Immunohistochemical detection of tumor angiogenesis measured by the maximal microvessel density in human prostate cancer. *APMIS* 1998;106: 463-469.

377. Silverman MA, Partin AW, Veltri RW, et al. Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1997;79: 771-779.
378. Rubin MA, Buyyounouski M, Bagiella E, et al. Microvessel density in prostate cancer: Lack of correlation with tumor grade, pathologic stage and clinical outcome. *Urology* 1999;53: 542-547.
379. Barth PJ, Weingartner K, Kohler HH, et al. Assessment of vascularization in prostatic carcinoma: a morphometric investigation. *Hum Pathol.* 1996;27: 1306-1310.
380. Bettencourt M-C, Bauer JJ, Sesterhenn IA, et al. CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 1998;160: 459-465.
381. Lissbrant IF, Stattin P, Damber LE, et al. Vascular density is a predictor of cancer-specific survival in prostatic carcinoma. *Prostate* 1997;33: 38-45.
382. Gettman M, Bergstrahl E, Blute M, et al. Prediction of patient outcome in pathologic stage T2 adenocarcinoma of the prostate:lack of significance for microvessel density analysis. *Urology* 1998;51: 79-85.
383. El-Gohary Y, Silverman J, Olson P, et al. Endoglin (CD105) and Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Markers in Prostatic Adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007;127: 572-579.
384. Josefsson A, Wikstrom P, Granfors T, et al. Tumor Size, Vascular Density and Proliferation as Prognostic Markers in GS 6 and GS 7 Prostate Tumors in Patients with Long Follow-Up and Non-Curative Treatment. *Eur Urol* 2005;48: 577–583.
385. Fujita K, Ewing C, Chan D, et al. Endoglin (CD105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *Int. J. Cancer* 2009;124: 664–669.

386. Srinivasan B, Li Y, Jing Y, et al. A Three-Layer Competition-Based Giant Magnetoresistive Assay for Direct Quantification of Endoglin from Human Urine. *Anal Chem* 2011;83: 2996–3002.
387. Mazzucchelli R, Montironi R, Santinelli A, et al. Vascular endothelial growth factor expression and capillary architecture in high-grade PIN and prostate cancer in untreated and androgen-ablated patients. *Prostate* 2000;45: 72-79.
388. Pallares J, Rojo F, Iriarte J, et al. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues.. *Histol Histopathol.* 2006;21: 857-65.
389. Jackson MW, Roberts JS, Heckford SE, et al. A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res.* 2002;62: 854-9.
390. Dias S, Hattori K, Heissig B, et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98: 10857-62.
391. Silberman MA, Partin AW, Veltri RW, et al. Tumour angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in Gleason sum 5 – 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1997;79: 772 – 779.
392. Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol.* 1993;24: 220-6
393. Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol.* 1993 Nov;10: 302-13.
394. Montironi R, Galluzzi CM, Diamanti L, et al. Prostatic intra-epithelial neoplasia. Qualitative and quantitative analyses of the blood capillary architecture on thin tissue sections. *Pathol Res Pract* 1993;189: 542-8.

395. Rubin MA, Buyyounouski M, Bagiella E, et al. Microvessel density in prostate cancer: Lack of correlation with tumor grade, pathologic stage and clinical outcome. *Urology* 1999;53: 542-547.
396. Giri D, Ropiquet F, Ittmann M. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF)-2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5: 1063- 1071.
397. Stefanou D, Batistatou A, Kamina S, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Association with Microvessel Density in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *In vivo* 2004;18: 155-160.
398. Zhong H, Bowen JP. Antiangiogenesis drug design: multiple pathways targeting tumor vasculature. *Curr. Med. Chem* 2006;13: 849-862.
399. Laquente B, Vinals F, Germa JR. Metronomic chemotherapy: an antiangiogenic scheduling. *Clin Transl Oncol* 2007;9: 93-98.
400. Rhee J, Hoff PM. Angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin. Pharmacother* 2005;6: 1701-1711.
401. Cooney MM, van Heeckeren W, Bhakta S, et al. Drug insight: vascular disrupting agents and angiogenesis novel approaches for drug delivery. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006;3: 682- 692.