

NÁDOROVÉ MARKERY KARCINOMU PROSTATY

přehledový článek

TUMOR MARKERS IN PROSTATE CANCER DIAGNOSIS

Jiří Klečka¹, Luboš Holubec³, Martin Pešta², Milan Hora¹, Ondřej Topolčan², Viktor Eret¹

¹Urologická klinika FN a LF UK, Plzeň

²Centrální radioizotopová laboratoř LF UK, Plzeň

³Radioterapeutické oddělení FN, Plzeň

Došlo: 15. 7. 2008.

Přijato: 20. 10. 2008.

Kontaktní adresa

MUDr. Jiří Klečka, Ph.D.

Urologická klinika LF UK a FN

E. Beneše 13, 305 99 Plzeň

e-mail: kleckaj@fnplzen.cz

Práce byla podpořena grantem IGA NR8918-3 a výzkumným záměrem MSM 0021620819. Náhrada a podpora funkce některých životně důležitých orgánů.

Souhrn

Klečka J, Holubec L, Pešta M, Hora M, Topolčan O, Eret V. Nádorové markery karcinomu prostaty

V minulosti bylo provedeno mnoho pokusů o zlepšení diagnostiky, léčby a predikce progresu onemocnění pacientů s karcinomem prostaty pomocí molekulárního stagingu. Důvodem je relativně nízká specifita, standardně stanoveného markeru – PSA (prostatického specifického antigenu). V současnosti neexistuje jediný rutinně stanovený molekulární parametr z prostatické tkáně. DNA analýza a proteomické metodiky dovolují virtuální systematickou

analýzu všech genů včetně genů typických pro karcinogenezi jak na DNA, či RNA úrovni včetně detekce proteinů. Výzvou budoucnosti bude validizace potenciálních nádorových markerů na dostatečné skupině pacientů. Jako velice slibný genový marker detekce karcinomu prostaty se v současnosti jeví průkaz mRNA genu DD3 (Differential Display Code 3 gen).

Klíčová slova:

karcinom prostaty, nádorové markery, geny, prognóza, predikce.

Summary

Klečka J, Holubec L, Pešta M, Hora M, Topolčan O, Eret V. Tumor markers in prostate cancer diagnosis

Numerous attempts towards improving diagnostic, management and prognosis of the patients with prostate cancer by molecular staging have been fruitless so far. The reason is relatively low specificity of standard used tumor marker – PSA (Prostatic Specific Antigen). No single molecular parameter is routinely analyzed in prostate cancer tissue. Powerful DNA array and proteomics methods allow the systematic analysis of virtually all genes of a cancer on the DNA, RNA, and protein level. In future, one of the major scientific challenges will be the validation of several potential biomarkers in large enough and clinically well characterized patient cohorts. As a promising gene based tumor marker seems to be detection of mRNA of prostate cancer specific DD3 gene (Differential Display Code 3 gene).

Key words:

prostate cancer, markers, genes, prognosis, prediction.

ÚVOD

Karcinom prostaty (CaP) patří mezi nejčastěji diagnostikovanou malignitu a zároveň je druhou nejčastější příčinou úmrtí mužů na nádorová onemocnění. Na základě dat Národního onkologického registru, zobrazených v rámci software SVOD (Systém pro vizualizaci onkologických dat, nyní ve verzi 6) je patrná narůstající incidence CaP ve všech věkových kategoriích. Například v kategorii mužů nad 70 let byla v roce 1977 incidence CaP 222,8 případů CaP/100 000 mužů a mortalita 72,3/100 000, v roce 2005 dosáhla incidence CaP v téže věkové kategorii 686 případů CaP/100 000 mužů a mortalita 306,5/100 000 (1) (tab. 1). Vlastní incidence CaP roste s věkem. Vzhledem k postupnému zvyšování průměrné délky života dochází k nárůstu CaP ve stárnoucí populaci. CaP je možno kurabilně léčit, je-li zachycen ve fázi na žlázu ohraničeného onemocnění. Možnostmi kurabilní léčby jsou radikální prostatektomie nebo aktinoterapie prostaty (2). V případě lokálně pokročilého nebo metastazujícího karcinomu prostaty dosud neexistuje žádná kurabilní metoda léčby. Tito pacienti mají v porovnání s pacienty s lokalizovaným onemocněním významně horší prognózu přežití.

V poslední době je diskutována otázka paliativní chemoterapie u metastazujícího karcinomu prostaty. Ani zde však není situace uspokojivá. Z používaných chemoterapeutik je pouze u docetaxelu zaznamenáno signifikantně delší přežití nemocných léčených touto chemoterapií oproti léčbě hormonální. U ostatních chemoterapeutik (mitoxantron, vinorelbin) dochází pouze ke zlepšení kvality života nemocných (3, 4). Vzhledem k tomu, že dodnes neexistuje efektivní léčba pokročilého a hormonálně refrakterního CaP, je nutné pátrat nejen po nových metodách léčby, ale i po nových markerech pro včasnou diagnostiku CaP.

SOUČASNÉ MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY KARCINOMU PROSTATY

Včasná diagnostika karcinomu prostaty a efektivní terapie může ve svém dlouhodobém důsledku vést k prodloužení přežívání pacientů s tímto onemocněním. V současné době je prostatický specifický antigen (PSA) vedle klasického per rectum vyšetření a transrektální sonografie nejpožívanějším konvenčním sérovým markerem. Jedná se o proteázu serinového typu příbuznou s kalikreinem. Je normální součástí seminální plazmy, ve které hraje důležitou roli při rozpouštění seminálního koagula, což je nezbytné pro úspěšné oplodnění. Vzhledem k této enzymatické aktivitě se se při uvolnění do krve poměrně rychle váže na antiproteázy, zejména na antichymotrypsin (ACT) a α_2 -makroglobulin (α_2 -M). Většina imunoreaktivních souprav detekuje imunoreaktivní molekuly PSA, volné i vázané na ACT. Mluvíme proto o celkovém PSA (total PSA, tPSA). Volné PSA (free PSA, fPSA) se stanovuje pomocí protilátky, která reaguje s touto oblastí molekuly PSA, která se váže na ACT (5). Jako velmi silný nezávislý prognostický prediktor je význam celkového PSA prokázán především u mladších pacientů mezi 50. a 60. rokem věku života (6). Přesto, že je PSA považován za velmi specifický marker pro karcinom prostaty, má jeho použití svá omezení. Je-li jako cut off (hraniční hodnota) PSA pro indikaci biopsie považována hladina 3,5 ng/ml, dosahuje míra negativních, tudíž zbytečných biopsií 70–80 %. Tato falešná pozitivita se příliš nemění ani při zvýšení hraničních hodnot v adjustaci na věk a sledováním volné frakce PSA (fPSA). Především u sledování poměru fPSA/tPSA vyjádřeného v procentech je nutné mít na paměti, že vyšetření per rectum, ejakulace, zhmoždění prostaty jízdou na kole apod. může zvýšit podíl nenavázané frakce a imitovat nor-

Tab. 1. Vývoj incidence a mortality na karcinom prostaty ve věkové kategorii mužů nad 70 let

C61 – ZN předstojné žlázy – prostaty, muži, 70+ let
(časový vývoj, ASR(W), zdroj dat: ÚZIS ČR)

Rok	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	
Incidence	222,83	240,18	217,72	237,37	231,94	296,29	278,24	258,81	272,83	303,36	331,01	350,8	343,68	333,67	
Mortalita	72,6	109,99	115,06	150,62	147,75	168,37	192,59	189,5	191,18	215,23	240,49	246,19	248,86	238	
Rok	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Incidence	356,22	419,04	419,75	459,75	479,6	545,66	534,72	558,1	539,75	514,95	553,83	604,56	635,84	648,89	686,07
Mortalita	247,14	254,83	268,4	292,54	301,79	313,84	314,14	338,95	319,82	315,27	330,57	314,19	308,34	312,78	306,56

mální nález i u karcinomu prostaty. Výše zmíněná fakta jsou jasným důkazem, že PSA, které je považováno za velmi specifický marker karcinomu prostaty, může být ovlivněn celou řadou procesů, kdy je jeho hodnota falešně pozitivní. Jako pomocná kritéria pro rozlišení benigní hyperplazie prostaty od karcinomu prostaty se při hraničním zvýšení PSA (4–10 ng/ml) používají vedle poměru fPSA/tPSA ještě další parametry. „Specificitu“ vyšetření mohou zlepšit: tzv. „doubling time“, což je čas, za který se hodnota PSA zdvojnásobí, PSA velocita, která vyjadřuje dynamiku změn hodnot PSA v čase, přičemž za hraniční hodnotu se považuje 0,75 ng/ml/rok, dalším pomocným parametrem může být PSA denzita, což je poměr mezi hladinou PSA a objemem prostaty. Ani tyto parametry však jednoznačně nerozliší benigní hyperplazii prostaty od karcinomu a pacienti jsou často vystaveni opakovaným biopsiím bez uspokojivého výsledku (7). Jedním z možných řešení zlepšení diagnostiky CaP a redukce zbytečných biopsií je identifikace specifických nových markerů pro detekci karcinomu prostaty.

V současnosti bylo objeveno relativně velké množství markerů typických pro prostatickou tkáň jako PSA. Vyjma prostatické kyselé fosfatázy, kterou stanovení PSA zcela nahradilo, se jedná například o lidský kalikrein 2 (hK2), prostatický specifický membránový antigen (PSMA), prostatickou specifickou transglutaminázu nebo antigen prostatických kmenových buněk. Identifikace těchto markerů může v budoucnu napomoci v časně detekci karcinomu prostaty (8, 9).

Přestože má CaP srovnatelnou frekvenci a klinickou důležitost jako například nádory kolorekta a prsu, pro karcinom prostaty nejsou dostupné klinicky relevantní molekulární markery (detekce na úrovni mutací, exprese genů) jako pro kolorektální karcinom a karcinom prsu. I když je známa řada onkogenů aktivovaných u CaP, žádný nebyl přesvědčivě identifikován jako iniciátor časně progresu. Onkogenní aktivace může být způsobena kvantitativními nebo kvalitativními změnami exprese protoonkogenů, genů podporujících růst. Většina protoonkogenů kóduje proteiny, které se podílejí na přenosu vnějších růstových a diferenciálních signálů z povrchu buňky do cytoplazmy a do jádra. Nádorově supresorové geny se od onkogenů odlišují tím, že kódují proteiny, které se podílejí na negativní kontrole buněčného růstu a procesu diferenciace. U nádorů prostaty není objasnění procesu karcinogeneze zdaleka na takovém stupni jako u kolorektálního karci-

nomu (Vogelsteinův model) nebo nádorů prsu. Předpokládá se změněná funkce onkogenů (viz níže), a to alespoň v některých prostatických nádorech. Přestože nebyl identifikován žádný gen jako iniciátor časně progresu, v současnosti se zdá být pro detekci časných stadií nádorů prostaty nejvhodnější gen DD3 (10–12).

PŘEHLED DIAGNOSTICKÝCH A PROGNOSTICKÝCH MARKERŮ U KARCINOMU PROSTATY

RAS onkogen

RAS geny byly často studovanými onkogeny u nádorů prostaty. RAS protoonkogen kóduje GTPázu účastnící se přenosu signálu do jádra buňky. RAS protoonkogen je nejčastěji aktivován bodovými mutacemi kodonů 12, 13 a 61 (kodon je část genu, která určuje (kóduje) zabudování určitého druhu aminokyseliny do polypeptidového řetězce), které způsobují permanentní stimulaci proliferace i bez přítomnosti vnějších signálů (13, 14).

Diagnostickým stanovením mutací RAS onkogenů však nebyla získána klinicky významná prognostická informace (15–17).

C-MYC onkogen

Rodina MYC protoonkogenů, zejména C-MYC, byla také zkoumána u prostatických nádorů. Tento transkripční faktor se účastní diferenciace, hladina mRNA C-MYC je vyšší u dělících se buněk (18). Předpokládá se genová amplifikace tohoto onkogenu. Studie ukázaly, že hladina mRNA C-MYC genu je zvýšená u prostatických nádorových buněk ve srovnání s BPH nebo normální prostatickou tkání. Také byl pozorován trend vyšší exprese u vyššího grade nádoru (19). Na druhé straně, studie s *in situ* hybridizací, které prováděly stanovení na definovaných místech, nenašly oproti tkáňovým homogenátům overexpresi C-MYC onkogenu (20). Navíc nebyla nalezena genová amplifikace tohoto genu u nádorů prostaty (15, 19), přestože u některých nádorových linií CaP se genová amplifikace C-MYC objevuje (21, 22). Také nebyla nalezena korelace exprese tohoto genu s celkovým přežitím (23).

C-ERB-B2 onkogen

C-ERB-B2 onkogen byl původně identifikován v roce 1981 v potkaních glioblastomech (24). Nejčastější mechanismus aktivace *C-ERB-B2* v neoplastické tkáni je amplifikace genu (amplifikace = zvýšení počtu kopií daného DNA fragmentu či příslušného onkogenu), jejímž výsledkem je nadprodukce mRNA *C-ERB-B2* (25). Amplifikace *C-ERB-B* byla nalezena statisticky signifikantně v buněčných liniích odvozených od prsních adenokarcinomů, ale vzácně i v jiných tkáních (26–28). Studium onkogenu *C-ERB-B2* jako nádorového markeru nebo terapeutického cíle u nádorů prostaty přineslo nejasné výsledky (23).

EZH2 polycomb onkogen

Skupina polycomb proteinů tzv „enhancer zeste homolog 2“ je aktivovaná ve vyšších stádiích karcinomů prostaty. Gen *EZH2* kóduje protein, který je represorem transkripce (29). Bylo zjištěno, že *EZH2* redukuje celkově transkripci u nádorů prostaty prostřednictvím zvýšení deacylace histonů cestou histon deacylázy-2. Varambally et al. (30) zjistil, že mRNA i protein *EZH2* jsou signifikantně zvýšeny v maligní tkáni prostaty ve srovnání s benigní tkání, navíc vyšší koncentrace mRNA i proteinu *EZH2* klinicky lokalizovaná v prostatických nádorech souvisí s horší prognózou. *EZH2* se zdá, že by mohl být zajímavým markerem proliferace a metastazování.

bcl-2

bcl-2 je protein inhibující apoptózu. Exprese tohoto proteinu byla identifikována u 1–69 % nádorů prostaty (31, 32). Na základě rozdílných výsledků mezi *bcl-2* pozitivními a *bcl-2* negativními pacienty při antiandrogenní terapii (13, 33, 34) či po radioterapii (35) lze předpokládat souvislost mezi *bcl-2* a klinickou odezvou na léčbu. Stejný princip se však nepotvrdil u pacientů po radikální prostatektomii, kde exprese *bcl-2* není spojena s lepší či horší prognózou pacientů (36–39). Výsledky výzkumu naznačují, že zvýšená exprese *bcl-2* je markerem horší prognózy onemocněním CaP nezávisle na zvolené strategii léčby. Moul J. W. popisuje ve své práci vztah *bcl-2* spolu s *Ki-67* a *p53* vůči pokročilému, hormonálně refrakternímu karcinomu prostaty. Závěry práce naznačují, že zvýšená exprese obou markerů *bcl-2* a *p53* je nezávislým prediktorem časně recidi-

vy CaP po radikální prostatektomii a taktéž exprese *bcl-2* je předpokladem chemorezistence takto postižených pacientů. Chemorezistence se projevuje v celém spektru cytostatik od cyklofosfamidů po mitoxantron (40).

HER2

HER 2 je transmembránový receptor pro tyrozin kinázu, který je například užíván v léčbě karcinomu prsu, kdy se na něj selektivně váže trastuzumab (Herceptin®). Terapeutické odpověď u *HER2* amplifikovaných karcinomů prsu je prakticky 100% a taktéž u metastatického onemocnění (41). Amplifikace *HER2* genu byla popsána i u karcinomu prostaty (42). Na základě tohoto faktu byl trastuzumab zkoušen na rozsáhlém souboru pacientů jako lék proti CaP, avšak s prakticky nulovým efektem. Následné studie s oficiálními reagenty povolenými FDA a standardizovanými postupy genové amplifikace poukázaly na virtuální absenci genové amplifikace *HER2* u CaP (25, 26, 43). I přes absenci genové amplifikace je exprese *HER2* spojena s horší prognózou pacientů s CaP (43).

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR)

Receptor pro epidermální růstový faktor je jedním z členů rodiny *HER2* genů a je terapeuticky ovlivnitelný jednotlivými protilátkami a malými inhibičními molekulami (27). Exprese *EGFR* se vyznačuje výraznou variabilitou a v závislosti na publikujících autorech dosahuje 1–100 % (28, 44, 45). Zvýšená exprese *EGFR* je spojená s horší prognózou onemocnění a stejně tak jako u *HER2* je použití specifické protinádorové terapie proti *EGFR* bez léčebného efektu (46, 47). Amplifikace *EGFR* genu se vyskytuje pouze u 1 % s CaP (45).

p53

Gen *p53* je tumor supresorový gen, který se účastní procesů udržení genomové integrity a kontroly apoptózy. K inaktivaci genu *p53* dochází nejčastěji mutacemi v obou alelách genu. Následkem mutace *p53* DNA je akumulace *p53* proteinu v jádře buňky se zvýšeným počtem degradace. Z tohoto důvodu jsou pacienti s inaktivací *p53* genu „*p53* pozitivní“ díky nahromadění *p53* proteinu, který je imunohistochemicky detekovatelný. V literatuře je

více jak 800 studií zabývajících se *p53* u karcinomu prostaty. Na základě těchto studií se procento pacientů s CaP s inaktivovaným *p53* genem pohybuje od 4 do 61 % (48, 49). Toto široké rozmezí přesně vyjadřuje nesourodost imunohistochemických metodik měřících koncentraci *p53* proteinu. Vzhledem k tomu, že protein *p53* se fyziologicky vyskytuje ve všech buňkách, může hypersenzitivita metodiky vést k falešně pozitivním výsledkům.

Závěry většiny studií se shodují na rozmezí 2,5–20 % pacientů s mutací *p53* genu a zároveň shodně konstatují horší prognózu těchto pacientů (50–55). Výsledky studií, které hodnotily sekvencování *p53* genu, naznačují, že správná pozitivita *p53* mutantních neoplazmat nepřekračuje 10 % (9–11). Role mutace genu *p53* s ohledem na radiorezistenci nebyla dosud potvrzena. Existují studie, které předpokládají radiorezistenci *p53* mutantních karcinomů (30, 56), ale taktéž jsou publikovány studie potvrzující opak (57–59). V poslední době jsou popisovány práce poukazující na špatnou prognózu nemocných s prostatickým karcinomem, u kterých se vyskytuje synchronně mutace genu *p53* společně s mutací genu pro tumor supresorový gen, který je specifický pro prostatický karcinom- *KAI1* (60).

P27^{Kip1}

P27^{Kip1} je inhibitor cyklin dependentní kinázy a negativní regulátor buněčné proliferace (61). Genetické aberace *P27^{Kip1}* genu jsou málo časté a jejich exprese je řízena především na posttranskripční úrovni (14, 62). V případě tkáně prostaty můžeme pozorovat expresi *P27^{Kip1}* ve všech sekrečních a části bazálních buněk (14, 63). U 20–84 % nemocných s CaP byla nalezena redukováná exprese *P27^{Kip1}*. Tento nález koreloval se stadiem onemocnění, diferenciací tumoru (pokročilejší stadia, vyšší Gleason skóre) a s horší prognózou (14, 63–67). Zajímavý je i fakt, že snížená exprese *P27^{Kip1}* byla pozorována u pacientů s BPH v tkáni prostaty pocházející z přechodné zóny (14, 68).

Proliferační markery

Buněčná proliferace je často používaný parametr prognózy nejen CaP, ale i ostatních malignit. Kvantifikace *Ki67* proteinu, který se vyskytuje ve všech jádrech buněk v G2, S a M fázi buněčného cyklu, se jeví jako nadějný marker buněčné proliferace. Procento

Ki67 pozitivních buněk (*Ki67* labeling index, *Ki67LI*) se pohybuje u CaP od 2 do 15 %. Tato hodnota je výrazně nižší než u jiných malignit, což reflektuje biologický charakter pomalu rostoucího CaP. Mnohé studie poukazují, že *Ki67 LI* má prognostický charakter a mimo jiné byla prokázána souvislost mezi *Ki67LI* a Gleason skóre (69–71). Dodnes však není zcela jasné, jakou klinicky signifikantní aditivní informaci nám může poskytnout analýza *Ki67LI*. U karcinomu prostaty byla z proliferčních markerů věnována pozornost i markeru PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Zde však byly výsledky rozporuplné. Například Carrol a kol. (72) prokázali pozitivní korelaci PCNA s klinickým stadiem a výskytem vzdálených metastáz, nebyla ale prokázána korelace s diferenciací tumoru (grading), stejně jako nebyl prokázán prognostický význam. Prognostický význam PCNA u karcinomu prostaty nebyl prokázán ani v dalších studiích (73).

Androgenní receptor a exprese PSA

Závěry některých studií poukazují na horší prognózu pacientů s CaP, kteří mají nižší hladinu PSA nebo redukovanou expresi androgenního receptoru (AR). Tento fakt pravděpodobně koreluje se všeobecnou dediferenciací tumoru. Žádná ze studií neprokázala klinickou prognostickou relevanci snížené exprese PSA. Status genu pro AR je důležitý zejména z prediktivního hlediska. Během vývoje a růstu je nádor prostaty silně dependentní na androgenech. Při amplifikaci AR genu je významně snížena farmakologická účinnost antiandrogenů, neboť nádorové buňky zvýšeně exprimují AR a jsou tak schopny „vychytávat“ i reziduální androgeny. Tyto nádory jsou pak hormonálně independentní a při progresi či generalizaci nádorového onemocnění po primární terapii je u těchto nemocných indikována chemoterapie (74).

E-Cadherin a α/β -catenin

E-Cadherin a α/β -catenin jsou proteiny patřící mezi intracelulární adhezivní molekuly. Role E-Cadherinu byla prokázána v morfogenezi karcinomu prsu a u karcinomu žaludku z buněk podobných „pečetnímu prstenu“ a zdá se, že E-Cadherin bude mít svoji úlohu i u CaP. Snížená exprese tohoto markeru je pozorová-

na především u karcinomů s vyšším Gleason skóre, které vykazují vyšší biologickou aktivitu s rychlejším růstem a menší intercelulární adhezivitou (75, 76).

Snížení exprese E-Cadherinu lze pozorovat i u tumorů léčených androgenní deprivací (77). Prognostická hodnota α/β -catenin u lokalizovaného i pokročilého CaP je v současnosti hodnocena na souboru 215 pacientů s předpokládaným sledováním v průběhu 13 let (78).

Neuroendokrinní diferenciaci

Neuroendokrinní diferenciaci je typicky detekovatelná pomocí protilátek proti neuron specifické enoláze (NSE) a chromograninu A. Vyskytuje se u 24–98,5 % pacientů s CaP (79, 80). Neuroendokrinní diferenciaci patří k nejvíce diskutovaným potenciálně prognostickým markerům CaP (18) a její přítomnost zvyšuje riziko selhání radiační a hormonální léčby (19–21). Z tohoto důvodu zavedla některá světová centra stanovení neuroendokrinní diferenciaci jako rutinní metodiku vyšetřování tkáně prostaty. Naproti tomu pouze 7 ze 16 na toto téma provedených studií prokázalo prognostický význam neuroendokrinní diferenciaci v souvislosti se špatnou prognózou onemocnění (79). Podobně jako v případě *bcl-2* nelze neuroendokrinní diferenciaci použít jako prognostického faktoru odpovědi na antiandrogenní terapii, radiační terapii a chemoterapii. Jedním z nejdůležitějších důvodů je do současnosti nestandardizovaná metodika stanovení neuroendokrinní diferenciaci (81).

Prostatický specifický membránový antigen (PSMA)

PSMA, resp. glutamát karboxypeptidáza II (GCPII), je enzym, který se v lidském těle vyskytuje především v centrálním nervovém systému, prostatě a tenkém střevě. PSMA je silně exprimován ve většině případů karcinomů prostaty, a to více jak o 90 % ve srovnání s normální benigní tkání prostaty. Zvýšená exprese PSMA (6, 7, 9, 22, 24) je považována za prediktivní faktor horší prognózy onemocnění. V současné době probíhá výzkum využití PSMA jako antigenu, který by sloužil pro vazební proteiny nesoucí terapeutika v rámci cílené léčby CaP.

CD 44 a CD 44v6

CD44 adhezivní molekuly (CD 44 a CD 44 v6) jsou dlouhodobě dávány do souvislosti s buněčnou transformací. V současnosti je standardní forma CD 44 považována za jeden z primárních znaků nádorových kmenových buněk u karcinomu tlustého střeva, prsu a také karcinomu prostaty. Možný přínos CD 44 pro diagnostiku CaP je v současnosti zdrojem výzkumu (82).

DD3 (PCA3)-Differential Display Code 3

DD3 je v současné době jeden z nejspecifičtějších genů pro detekci karcinomu prostaty. Zvýšená exprese DD3 se vyskytuje u více jak 95 % případů primárního karcinomu prostaty včetně prostatických metastáz (83, 84). Dalším velice důležitým faktem je, že přítomnost DD3 je vázána pouze na tkáň prostaty, tj., DD3 nebyl izolován z jiných normálních lidských tkání. Gen kódující DD3 je lokalizován na chromozomu *9q21.1*, pro mRNA DD3, což je vlastní detekovatelný transkript. Je pro něj typická vysoká denzita stop-codonů s následnou přítomností nekódující RNA. To znamená, že nevzniká vlastní protein. K vlastnímu zhodnocení potenciálního využití DD3 byla vyvinuta a popsána „real time“ fluorescenční PCR (polymerase chain reaction) metoda (85).

V nádorové tkáni prostaty byla oproti normální tkáni z okolí vlastního tumoru prokázána šesti- až tisícipětisetnásobně zvýšená exprese DD3. Průměrná hodnota zvýšené exprese DD3 se pohybuje kolem 66 násobku v porovnání s normální tkání. Tyto hodnoty jsou v souladu s deseti- až stonásobnou zvýšenou expresí DD3 v maligní tkáni oproti přilehlé normální tkáni hodnoceno Northern blotovou analýzou (83).

DD3 je vyjádřen na epiteliálních buňkách prostaty. Počet epiteliálních buněk na mikrogram tkáňové RNA závisí na druhu stanovené tkáně. Při srovnání normální prostatické tkáně a tkáně obsahující maximálně 10 % nádorových buněk docházíme k závěru, že oba druhy tkání obsahují zhruba stejný počet epiteliálních buněk. I přes tento fakt je pozorována ve srovnání se zdravou tkání 11× zvýšená exprese DD3 v tkáni obsahující tumor malého objemu. Tato skutečnost napovídá o vskutku významně zvýšené expresi DD3 i u malého počtu tumorem postižených epiteliálních buněk prostaty. To nám umožní detekci i mini-

málního množství maligních buněk na pozadí velkého množství nádorem nepostížených buněk, a to bez nutnosti buněčné mikrodisekce. Toto konstatování je v souladu s daty dosaženými použitím real time kvantitativní RT-PCR metody (84). Síla možného diagnostického potenciálu DD3 je umocněna i tím, že DD3 není přítomen v lidských leukocytech, často přítomných v lidských tekutinách, a neposkytuje tak falešně pozitivní hodnoty při reakci s těmito buňkami. RT PCR dovoluje diagnostikovat maligní prostatické buňky jak z krve, tak ejakulátu, ale nejčastěji se používá moč pacientů s podezřením na CaP.

Podkladem pro takto vyhodnocovaný materiál je hypotéza kvantitativní determinace DD3 z moče pacientů získané po masáži prostaty. Vlastní masáž prostaty facilituje přestup epiteliálních prostatických buněk do ductů a z těch následně do prostatické uretry a moči. První porce moči po masáži prostaty je typická zvýšenou koncentrací uretrálních a prostatických sekretů (40). Clements et al. (29) srovnával výsledky dosažené hodnocením ejakulátu a výplachu z uretry a došel ke srovnatelným výsledkům. Právě z důvodu praktičnosti odběru byla moč vybrána jako nejvhodnější materiál pro hodnocení.

Jak již bylo uvedeno, močový sediment neobsahuje jen buňky nádorové, ale především nemaligní prostatické buňky a odloučené uroteliální buňky. Vzhledem k normalizaci testu s ohledem na reálný počet prostatických buněk bylo třeba stanovit tzv. „housekeeping“ gen. Tímto byl určen kódující PSA. PSA mRNA vykazuje relativně konstantní expresi v normálních prostatických buňkách a pouze slabě sníženou expresi (cca 1,5×) v buňkách karcinomu prostaty (66). Vzhledem k této konstantně mírně snížené expresi PSA a naopak výrazné expresi DD3 umožňuje stanovení poměru DD3m RNA/PSA mRNA, tzv. DD3 ratio, zlepšení senzitivity vyšetření DD3. Stanovení poměru DD3/PSA mRNA se zdá být vhodným diagnostickým nástrojem přesné identifikace prostatických nádorových buněk získaných z moči po masáži prostaty.

Pozitivní hodnota DD3/PSA mRNA je ve většině případů shodná s pozitivní diagnostikou CaP v punkční biopsii prostaty. V případě

negativní biopsie a pozitivního poměru může následné follow-up s opožděnou diagnostikou CaP dále zlepšit křivku ROC.

Negativní prediktivní hodnota DD3 je kolem 90 %. To naznačuje, že benigní onemocnění prostaty nevede k výrazným změnám DD3 mRNA/PSA mRNA poměru. Toto konstatování je taktéž v souladu s výše uvedeným faktem, že DD3 není přítomen v leukocytech lidských tkání a tekutin. Meid a kol. (35) předpokládá, že malé a dobře diferencované karcinomy prostaty mají horší schopnost uvolňování maligních buněk do prostatického exprimátu a následně do moči s následnou detekcí. V současné době je vyvíjen algoritmus standardního DRV (digitálního rektálního vyšetření) za účelem získání validního počtu maligních buněk z moči.

Dle současně publikovaných prací DD3 RT PCR test dosahuje senzitivity okolo 70 % a specificity okolo 83 %. DD3 test vykazuje vysokou inter- i intraesejovou variabilitu, což posiluje jeho potenciálně vysoký význam v detekci CaP a redukci invazivních vyšetření ve smyslu TRUS-P a biopsií prostat v mužské populaci.

ZÁVĚR

V současné době není odbornými společnostmi kromě stanovení PSA doporučen žádný jiný nádorový marker pro diagnostiku a follow-up karcinomu prostaty. Význam některých slibných nádorových markerů, jako je stanovení DD3 v moči, je nutno prospektivně ověřit v klinických studiích na rozsáhlém souboru pacientů. Budoucnost laboratorní detekce nových diagnostických, prognostických a prediktivních markerů směřuje k extenzivním technikám ve smyslu TMA (tissue microarray) hodnotící najednou širokou škálu genů či metody tzv. „powerful DNA array“ či proteomové metody, které nám umožní vyhodnocení celého spektra nádorových genů DNA a RNA a hodnocení specifických nádorových proteinů.

Tyto techniky mají ale svá úskalí v náročnosti interpretace výsledků pro rutinní klinickou praxi, která se neobejde bez dokonalé interpersonální spolupráce.

LITERATURA

1. <http://www.svod.cz/graph>, software SVOD (Systém pro Vizualizaci Onkologických Dat, nyní ve verzi 6).
2. **Paulson DF, Moul JW, Walther PJ.** Radical prostatectomy for clinical stage T1-2N0M0 prostatic adenocarcinoma: long term results. *J Urol* 1990; 144(5): 1180–1184.
3. **Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA.** TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(15): 1502–1512.
4. **Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF.** Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol* 2008; 26(2): 242–245.
5. **Klener P, Malbohan MI, Zima T.** Náborové markery. In Zima T, et al. *Laboratorní diagnostika*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007; 379–390.
6. **Ulmert H, Cronin AM, Bjork T, et al.** Prostate specific antigen at or before age 50 as a predictor of advanced prostate cancer diagnosed up to 25 years later: A case-control study. *BMC Medicine* 2008; 6: 1–8.
7. **Loeb S, Catalona WJ.** What to do with an abnormal PSA test. *The Oncologist* 2008; 13: 299–305.
8. **Margreiter M, Stangelberger A, Valimberti E, Herwig R, Djavan B.** Biomarkers for early prostate cancer detection. *Minerva Urol Nefrol* 2008; 60(1): 51–60.
9. **Vik V, Šácha P, Koukolík F, Konvalinka J, Pacík D, Zachoval R.** Co nového víme o PSMA (prostatický specifický membránový antigen): z pohledu urologa. *Urol List* 2007; 5(4): 10–13.
10. **Lijovic M, Fabiani ME, Bader J, Frauman AG.** Prostate cancer: are new prognostic markers on the horizon? *Prostate cancer and Prostatic Disease* 2000; 3: 62–65.
11. **Yoshida BA, Chekmareva MA, Wharam JE, et al.** Prostate cancer metastasis-suppressor genes: a current perspective. *In Vivo* 1998; 12: 49–58.
12. **Tinzi M, Marberger M, Horvath S, Chypre C.** DD3PCA3 RNA analysis in urine—a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol* 2004; 46(2): 182–186.
13. **McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML.** Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 6940–6944.
14. **Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodiceci P, Osman I, Miliard SS, Gaudin PB, Fazzari M, Zhang ZF, Massague J, Scher HI.** Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1998; 90: 1284–1291.
15. **Chevillat JC, Lloyd RV, Sebo TJ, Cheng L, Erickson I, Bostwick DG, Lohse CM, Wollan P.** Expression of p27kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11: 324–328.
16. **Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM.** Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 542–548.
17. **Vis AN, van Rhijn BW, Noordzij MA, Schroder FH, van der Kwast TH.** Value of tissue markers p27(kip1), MIB-1, and CD44s for the preoperative

- prediction of tumour features in screen detected prostate cancer. *J Pathol* 2002; 197: 148–154.
18. **Shariff AH, Ather MH.** Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Urology* 2002; 68: 2–8.
 19. **Casella R, Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC.** Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. *J Urol* 1998; 160: 406–410.
 20. **Bonkhoff H.** Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 2001; Suppl 2: 141–144.
 21. **Bonkhoff H, Fixemer T.** Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: an unrecognized and therapy resistant phenotype. *Pathologe* 2005; 26: 453–460.
 22. **Wright GL Jr, Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Konchuba A, Schellhammer PF, Moriarty R.** Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology* 1996; 48: 326–334.
 23. **Karayi MK, Markham AF.** Molecular biology of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2004; 7(1): 6–20.
 24. **Marchal C, Redondo M, Padilla M, Caballero J, Rodrigo I, Garcia J, Quian J, Boswick DG.** Expression of prostate specific membrane antigen (PSMA) in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *Histol Histopathol* 2004; 19: 715–718.
 25. **Reese DM, Smáli EJ, Magrane G, Waldman FM, Chew K, Sudilovsky D.** HER2 protein expression and gene amplification in androgen-independent prostate cancer. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 234–239.
 26. **Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP.** Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999; 59: 803–806.
 27. **Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tañ EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L.** Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 123–132.
 28. **Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, De Rosa G, Staibano S, Autorino R, D'Armiento M, De Laurentiis M, De Placido S, Catalano G, Bianco AR, Ciardiello F.** Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3438–3444.
 29. **Clements JA, Rohde P, Alien V, Hyland VJ, Samaratunga ML, Tilley WD, et al.** Molecular detection of prostate cells in ejaculate and urethral washings in men with suspected prostate cancer. *J Urol* 1999; 161(4): 1337–1343.
 30. **Ritter MA, Gilchrist KW, Voytovich M, Chappell RJ, Verhoven BM.** The role of p53 in radiation therapy outcomes for favorable to intermediate risk prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 53: 574–580.
 31. **Zellweger T, Ninck C, Bloch M, Mirlacher M, Koivisto PA, Helin HJ, Mihatsch MJ, Gasser TC, Bubendorf L.** Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer* 2005; 113: 619–628.
 32. **Kaur P, Kallakury BS, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS.** Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 33–39.

33. **Apakama I, Robinson MC, Walter NM, Charlton RG, Royds JA Fuller CE, Neal DE, Hamdy FC.** Bcl-2 overexpression combined with p53 protein accumulation correlates with hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 1258–1262.
34. **Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S, Buttyan R.** Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 1993; 143: 390–399.
35. **Szostak MJ, Kaur P, Amin P, Jacobs SC.** Kyprianou N. Apoptosis and bcl-2 expression in prostate cancer: significance in clinical outcome after brachytherapy. *J Urol* 2003; 165: 2126–2130.
36. **Masuda M, Takano Y, Iki M, Asakura T, Hashiba T, Noguchi S, Hosaka M.** Prognostic significance of Ki-67, p53, and Bcl-2 expression in prostate cancer patients with lymph node metastases: a retrospective immunohistochemical analysis. *Pathol Int* 1998; 48: 41–46.
37. **Stattin P, Daraber JE, Karlberg L, Nordgren H, Bergh A.** Bcl-2 immunoreactivity in prostate tumorigenesis in relation to prostatic intraepithelial neoplasia, grade, hormonal status, metastatic growth and survival. *Urol Res* 1996; 24: 257–264.
38. **Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Jordán P, Blochlinger A, Gasser TC, Mihatsch MJ.** Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol* 1996; 148: 1557–1565.
39. **Amirghofran Z, Monabati A, Gholijani N.** Apoptosis in prostate cancer: bax correlation with stage. *Int J Urol* 2005; 12: 340–345.
40. **Iwakiri J, Granbois K, Wehner N, Graves HC, Stamey T.** An analysis of urinary prostate specific antigen before and after radical prostatectomy: evidence for secretion of prostate specific antigen by the periurethral glands. *J Urol* 1993; 149(4): 783–786.
41. **André F, Pusztai L.** Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3: 621–632.
42. **Liu HL, Gandour-Edwards R, Lara PN Jr, White R, LaSalle JM.** Detection of low level HER2/neu gene amplification in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Cancer J* 2001; 7: 395–403.
43. **Montironi R, Mazzucchelli R, Barbisan F, Stramazzotti D, Santinelli A, Scarpelli M, Lopez Beltran A.** HER2 expression and gene amplification in pT2a Gleason score 6 prostate cancer incidentally detected in cystoprostatectomies: comparison with clinically detected androgen-dependent and androgen-independent cancer. *Hum Pathol* 2006; 37: 1137–1144.
44. **Visakorpi T, Kallioniemi OP, Koivula T, Harvey J, Isola J.** Expression of epidermal growth factor receptor and ERBB2 (HER-2/Neu) oncoprotein in prostatic carcinomas. *Mod Pathol* 1996; 5: 643–648.
45. **Schlomm T, Simon R, Huland H, Graefen M, Sauter G, Erbersdobler A.** High EGFR expression is associated with poor prognosis in radically operated prostate cancer (submitted 2007).
46. **Edwards J, Traynor P, Munro AF, Pirret CF, Dunne B, Bartlett JM.** The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 123–130.
47. **Wilding G, Soulie P, Trump D, Das-Gupta A, Smali E.** Results from a pilot phase I trial of gefitinib combined with docetaxel and estramustine in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 2006; 106: 1917–1924.
48. **Bauer JJ, Sesterhenn IA, Mostofi KE, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW.** P53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1295–1300.

49. **Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL.** Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 2005; 41(6): 858–887.
50. **Kuczyk MA, Serth J, Bokemeyer C, Machtens S, Minssen A, Bathke W, Hartmann J, Jonas U.** The prognostic value of p53 for long-term and recurrence-free survival following radical prostatectomy. *Eur J Cancer* 1998; 34: 679–686.
51. **Visakorpi T, Kallioniemi OP, Heikkinen A, Koivula T, Isola J.** Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. *J Nat Cancer Inst* 1998; 84: 883–887.
52. **Henke RP, Kruger E, Ayhan N, Hubner D, Hammerer P, Huland H.** Immunohistochemical detection of p53 protein in human prostatic cancer. *J Urol* 1994; 152: 1297–1301.
53. **Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Köllermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A.** Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 2008; in press.
54. **Joly F, Henry-Amar M.** Prognostic factors of localised, locally advanced or metastatic prostate cancer. *Bull Cancer* 2007; 94(Suppl 7): 35–43.
55. **Augustin H, Freibauer C, Bayer L, Lunglmayr G, Tschurlovich F, Kubler W, Pummer K.** Molecular markers and their prognostic impact in patients with advanced prostate cancer undergoing intermittent androgen suppression. *Eur Urol* 2005; 150: 259–235.
56. **Scherr DS, Vaughan ED Jr, Wei J, Chung M, Felsen D, All-bright R, Knudsen BS.** BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol* 1999; 162: 12–16.
57. **Incognito LS, Cazares LH, Schellhammer PF, Kuban DA, Van Dyk EO, Moriarty RP, Wright GL Jr, Somers KD.** Overexpression of p53 in prostate carcinoma is associated with improved overall survival but not predictive of response to radiotherapy. *Int J Oncol* 2002; 17: 761–769.
58. **Rakozy C, Grignon DJ, Li Y, Gheiler E, Gururajanna B, Pontes JE, Sakr W, Wood DP Jr, Sarkar FH.** P53 gene alterations in prostate cancer after radiation failure and their association with clinical outcome: a molecular and immuno-histochemical analysis. *Pathol Res Pract* 1999; 195: 129–135.
59. **Rakozy C, Grignon DJ, Sarkar FH, Sakr WA, Littrup P, Forman J.** Expression of bcl-2, p53, and p21 in benign and malignant prostatic tissue before and after radiation therapy. *Mod Pathol* 1998; 11: 892–899.
60. **Marreiros A, Dudgeon K, Dao V, Grimm MO, Czolij R, Crossley M, Jackson P.** KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells. *Oncogene* 2005; 24(4): 637–649.
61. **Cordon-Cardo C.** Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147: 545–560.
62. **Macri E, Loda M.** Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 337–344.
63. **Fernandez PL, Arce Y, Farre X, Martinez A, Nadal A, Rey MJ, Peiro N, Campo E, Cardesa A.** Expression of p27/ Kipl is down-regulated in human prostate carcinoma progression. *J Pathol* 1999; 187: 563–566.
64. **Cheville JC, Lloyd RV, Sebo TJ, Cheng L, Erickson L, Bostwick DG, Lohse CM, Wollan P.** Expression of p27kipl in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11: 324–328.
65. **Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM.** Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kipl is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 542–548.

66. **Vis AN, van Rhijn BW, Noordzij MA, Schroder FH, van der Kwast TH.** Value of tissue markers p27(kipl), MIB-1, and CD44s for the preoperative prediction of tumour features in screen detected prostate cancer. *J Pathol* 2002; 197: 148–154.
67. **Freedland SJ, deGregorio F, Saccoolidge JC, Elshimali I, Csathy GS, Dorey F, Reiter RE, Aronson WJ.** Preoperative p27 status is an independent predictor of prostate specific antigen failure following radical prostatectomy. *J Urol* 2003; 169: 1325–1330.
68. **Koivisto PA, Rantala I.** Amplification of the androgen receptor gene is associated with P53 mutation in hormone-refractory recurrent prostate cancer. *J Pathol* 1999; 187: 237–241.
69. **Revelos K, Petraki C, Gregorakis A, Scorilas A, Papanastasiou P, Tenta R, Koutsilieris M.** P27(kipl) and Ki-67 (MIB1) immunohistochemical expression in radical prostatectomy specimens of patients with clinically localized prostate cancer. In *Vivo* 2005; 19: 911–920.
70. **Rubio J, Ramos D, Lopez-Guerrero JA, Iborra I, Collado A, Solsona E, Almenar S, Llombart-Bosch A.** Immunohistochemical expression of Ki-67 antigen, cox-2 and Bax/ Bcl-2 in prostate cancer; prognostic value in biopsies and radical prostatectomy specimens. *Eur Urol* 2005; 48: 745–751.
71. **Borre M, Bentzen SM, Nerstrom B, Overgaard J.** Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. *J Urol* 1998; 159: 1609–1614.
72. **Carrol PR, Waldman FM, Rosenau W et al.** Cell proliferation in prostatic adenocarcinoma: In vitro measurement by 5- bromodeoxyuridine incorporation and proliferating cell nuclear antigen expression. *J Urol* 1993; 149: 403–407.
73. **Xiang G, Porter AT, Grignon DJ.** Diagnostic and prognostic Markers for Human Prostate Cancer. *The Prostate* 1997; 31: 264–281.
74. **Mori R, Wang Q, Quek ML, Tarabolous C, Cheung E, Ye W, Groshen S, Hawes D, Togo S, Shimada H, Danenberg KD, Danenberg PV, Pinski JK.** Prognostic value of the androgen receptor and its coactivators in patients with prostate cancer. *Anticancer Res* 2008; 28(1B): 425–330.
75. **Augustin H, Hammerer PG, Graefen M, Palisaar J, Daghofer F, Huland H, Erbersdobler A.** Characterisation of bio-molecular profiles in primary high-grade prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 662–668.

76. **Cheng L, Nagabhushan M, Pretlow TP, Amini SB, Pretlow TG.** Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer. *Am J Pathol* 1996; 148: 1375–1380.
77. **Patriarca C, Petrella D, Campo B, Colombo P, Giunta P, Parente M, Zucchini N, Mazzucchelli R, Montironi R.** Elevated E-cadherin and alpha/beta-catenin expression after androgen deprivation therapy in prostate adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2003; 199: 659–665.
78. **Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M, Kosma VM.** Alpha-catenin expression has prognostic value in local and locally advanced prostate cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 477–482.
79. **Bostwick DG, Qian J, Pacelli A, Zincke H, Blute M, Bergstralh EJ, Slezak JM, Cheng L.** Neuroendocrine expression in node positive prostate cancer: correlation with systemic progression and patient survival. *J Urol* 2002; 168: 1204–1211.
80. **Theodorescu D, Broder SR, Boyd JC, Mills SE, Frierson HF Jr.** Cathepsin D and chromogranin A as predictors of long-term disease specific survival after radical prostatectomy for localized carcinoma of the prostate. *Cancer* 1997; 80: 2109–2119.
81. **Cindolo L, Cantile M, Vacherot F, Terry S, de la Taille A.** Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: from lab to bedside. *Urol Int.* 2007; 79(4): 287–296.
82. **Mack B, Gires O.** CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS ONE* 2008; 3(10): e3360 [Epub 2008 Oct 9].
83. **Bussemakers MJ, van Bockhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA.** DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999; 59(23): 5975–5979.
84. **De Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW.** DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002; 62(9): 2696–2698.
85. **Meng FJ, Shan A, Jin L, Young CY.** The expression of a variant prostate-specific antigen in human prostate. *Cancer Epidemic Biomarkers Prev* 2002; 11(3): 305–309.
86. **Moul JW.** Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. *Eur Urol* 1999; 35(5–6): 399–407.