



UNIwersytet Medyczny
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra Morfologii i Embriologii Człowieka

Zakład Histologii i Embriologii

PRACA DOKTORSKA

Paweł Piotrów

Ekspresja podoplaniny

w tkankach raka prostaty

Promotor pracy: prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Wrocław 2024

*Składam podziękowania mojemu Promotorowi -
Panu Profesorowi Piotrowi Dzięgielowi
za nieocenioną pomoc i życzliwość przy pisaniu tej rozprawy.
Pracę dedykuję wszystkim osobom, które swoim
wsparciem przyczyniły się do jej powstania.*

Spis treści

1.	Wykaz skrótów	5
2.	Wstęp	9
2.1	RAK GRUCZOŁU KROKOWEGO	9
2.1.1	EPIDEMIOLOGIA	9
2.1.2	ETIOLOGIA	10
2.1.3	CZYNNIKI RYZYKA	11
2.1.4	DIAGNOSTYKA	12
2.1.5	LECZENIE	21
2.2	Podoplanina	25
2.2.1	Budowa i funkcja podoplaniny	25
2.2.2	Rola podoplaniny w nowotworzeniu	26
2.3	Białko Ki-67	30
2.5	Białko CD31	30
2.6	Białko CD34	31
3.	Cele pracy	32
4.	Materiał i Metody	34
4.2	Reakcje immunohistochemiczne (IHC)	35
4.3	Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych	36
4.4	Analiza statystyczna	37
5.	Wyniki	39
6.	Dyskusja	60
7.	Wnioski	66
8.	Streszczenie	67
9.	Summary	69
10.	Piśmiennictwo	71
11.	Załączniki	85

1. Wykaz skrótów

ARI – inhibitor 5-alfa-reduktazy

A2M – ang. alpha-2-Macroglobulin – α 2-makroglobulina

ACT – ang. alpha-1-Chymotrypsin – α 1-antychymotrypsyna

ADT – ang. androgen deprivation therapy – terapia deprivacji androgenów

API – ang. alpha trypsin inhibitor – inhibitor α 1-proteazy (API)

BPH – ang. benign prostate hyperplasia – łagodny rozrost gruczołu krokowego

białka ERM – białka z kompleksem ezryna-radyksyna-moesyna

CAFs – ang. cancer associated fibroblasts – fibroblasty związane z nowotworem

CCL21 – ang. chemokine (C-C motif) ligand 21 – cytokina należąca do rodziny chemokin CC.

CD – ang. cluster of differentiation – marker różnicowania komórkowego

CLEC-2 – C typ lektyny receptor 2

COVID-19 – ang. *coronavirus disease* – choroba koronawirusowa 2019

CRPC – ang. castration resistant prostate cancer – rak prostaty oporny na kastrację

D2-40, PDPN – podoplanina

DNA – ang. deoxyribonucleic acid – kwas deoksyrybonukleinowy

DRE – ang. digital rectal examination – palpacyjne badanie przez odbytnicę

EANM – ang. European Association of Nuclear Medicine – Europejskie Towarzystwo Medycyny Nuklearnej

EAU – ang. European Association of Urology – Europejskie Towarzystwo Urologiczne

eLND – ang. extended lymphadenectomy – rozszerzona limfadenektomia.

EPE – ang. extraprostatic extension – przekraczanie torebki gruczołu krokowego

FSH – ang. follicle-stimulating hormone – hormon folikulotropowy

GnRH – ang. gonadotropin-releasing hormone – hormon uwalniający gonadotropiny

GS – ang. Gleason score – skala Gleasona

hK3 – ang. human Kalikrein 3 – ludzka kalikreina 3

IHC – reakcja immunohistochemiczna

IMRT – ang. Image Guided Intensity Modulated Radiation Therapy – radioterapia oparta o modulację intensywności wiązek

ISUP – ang. International Society of Urological Pathology – Międzynarodowe Towarzystwo Patologii Urologicznej

Ki-67 – antygen Ki-67

LH – ang. luteinizing-hormone – hormon luteinizujący

LHRH – ang. luteinizing-hormone-releasing hormone – hormon uwalniający hormon luteinizujący

LNI – ang. lymph node involvement – zajęcie węzłów chłonnych

LRP – laparoskopowa prostatektomia radykalna

mpMRI – ang. Multiparametric MRI – wieloparametryczne badanie rezonansu magnetycznego

mRNA – ang. Messenger RNA – RNA informacyjny, inaczej matrycowy lub przekaźnikowy

miRNA ang. microRNA – mikroRNA

p – ang. probability value – prawdopodobieństwo testowe

PARP – inhibitory polimerazy poli ADP-rybozy

PC – ang. prostate cancer – rak gruczołu krokowego

PCA3 – ang. prostate cancer gene 3 – gen raka prostaty

PDPN, D2-40 – podoplanina

PECAM-1 – ang. platelet endothelial cell adhesion molecule – cząsteczka adhezji komórek, płytek krwi i śródbłonna typu 1

PET/CT – ang. positron emission tomography – pozytonowa tomografia emisyjna

PFS – ang. progression-free survival – czasu przeżycia wolnego od progresji choroby

PLAG – ang. platelet aggregation domain – domena stymulująca wzrost płytek

PLND – ang. pelvic lymph node dissection – usunięcie węzłów chłonnych w regionie miednicy

PSA – ang. prostate-specific antigen – swoisty antygen dla gruczołu krokowego

PSMA – ang. prostate specific membrane antigen – antygen błony komórkowej komórek gruczołu krokowego

RARP – prostatektomia radykalna w asyście robota

RNA – ang. ribonucleic acid – kwas rybonukleinowy

RP – prostatektomia radykalna

SCC – ang. squamous cell carcinoma – rak płaskonabłonkowy

TK – tomografia komputerowa

TMPRSS2 – ang. transmembrane protease, serine 2 – proteaza transbłonowa genu regulowanego przez androgeny, seryny 2

TRUS – ang. trans rectal ultrasound – przezodbytnicze badanie ultradźwiękowe prostaty

UICC – ang. Union for International Cancer Control – Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem

VEGF – ang. vascular endothelial growth factor – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego

2. Wstęp

2.1 RAK GRUCZOŁU KROKOWEGO

Rak gruczołu krokowego (ang. prostate cancer, PC) wg aktualnie obowiązującej dziesiątej rewizji Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych opublikowanej przez Światową Organizację Zdrowia [1] klasyfikowany jest jako:

C61 – nowotwór złośliwy gruczołu krokowego

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Rak gruczołu krokowego (PC) jest jedną z najczęstszych chorób nowotworowych na świecie. Według raportu GLOBOCAN z 2020, rocznie odnotowuje się 1414259 nowych przypadków oraz 375304 zgonów [2]. Rak gruczołu krokowego był drugim co do częstości występowania nowotworem i piątą główną przyczyną zgonów z powodu nowotworów wśród mężczyzn w 2020 roku. W ponad połowie krajów świata (112/185) jest to najczęściej diagnozowany nowotwór, z zapadalnością wahającą się od 6,3 do 83,4 na 100 000 mężczyzn [2]. Największą zapadalność odnotowuje się w Europie Północnej i Zachodniej, na Karaibach, w Australii i Nowej Zelandii a najniższą w Azji i Afryce Północnej. W raporcie Krajowego Rejestru Nowotworów z 2020 roku, rak gruczołu krokowego w Polsce był najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym u mężczyzn (19,6%) i stanowił drugą co do częstości przyczynę zgonu (11%) [2]. W Polsce w 2020 roku odnotowano 5748 zgonów z powodu raka gruczołu krokowego [3]. Nowotwór ten jest też najczęściej rozpoznawany w większości województw, poza

kujawsko-pomorskim i warmińsko-mazurskim, gdzie częściej występuje nowotwór złośliwy płuca. W porównaniu do 2019, w 2020 roku liczba zachorowań spadła z 17,638 do 14,244 (spadek o 19,2%), co koreluje bezpośrednio z okresem pandemii COVID-19. Zapadalność na raka gruczołu krokowego zwiększa się wraz z wiekiem i rzadko jest on rozpoznawany przed 50 rokiem życia (jedynie 2% przypadków) [4 – 5].

2.1.2 ETIOLOGIA

Wywiad rodzinny

Występowanie raka gruczołu krokowego w rodzinie stanowi istotny czynnik ryzyka [6]. Randazzo i wsp., w badaniu populacyjnym opartym na danych pochodzących z Swiss European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC, Aarau), oceniali dodatni wywiad rodzinny jako czynnik ryzyka raka stercza [6]. Wśród 4 932 uczestników badania, 334 (6.8%) miało dodatni wywiad rodzinny, rozumiany jako występowanie nowotworu gruczołu krokowego u krewnego I-stopnia. U badanych z dodatnim wywiadem istotnie częściej diagnozowany był nowotwór gruczołu krokowego w porównaniu do grupy z ujemnym wywiadem (18% vs 12%). W obu grupach większość zdiagnozowanych raków gruczołu krokowego była niskiego ryzyka oraz nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie stężenia w surowicy antygenu specyficznego dla gruczołu krokowego (ang. Prostate-Specific Antigen, PSA) dla wieku, w chwili rozpoznania oraz punktacji w skali Gleasona (zarówno z biopsji jak i w materiale pooperacyjnym) [7]. Częstość rozpoznawania rośnie również zależnie od ilości krewnych z nowotworem gruczołu krokowego, z czego największa obserwowana była w przypadku dodatniego wywiadu u trzech braci [8]. Rodzinne występowanie raka stercza wiąże się z prawie 4-krotnym wzrostem ryzyka wczesnego wystąpienia PC [9].

Rasa

Rasa czarna wiąże się z 28-56% większym ryzykiem zachorowania na raka gruczołu krokowego niż w populacji ogólnej oraz z 44-75% wyższym ryzykiem choroby przerzutowej w momencie rozpoznania [10]. Ponadto, mężczyźni pochodzenia afrykańskiego mają gorsze wyniki leczenia raka gruczołu krokowego, co jest skorelowane z czynnikami społecznymi, środowiskowymi, biologicznymi oraz socjoekonomicznymi [11]. Z kolei Japończycy mają mniejsze ryzyko zachorowania na raka gruczołu krokowego niż mężczyźni z krajów zachodnich, aczkolwiek ryzyko to rośnie wraz z przeprowadzeniem się do miejsca o wyższej częstotliwości występowania nowotworu [12].

Mutacje genetyczne

Wiele czynników genetycznych może potencjalnie wpływać na ryzyko rozwoju raka prostaty. Zidentyfikowano liczne defekty genetyczne, do których zaliczają się m.in. mutacje w genach BRCA1, BRCA2, HOXB13, MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, EPCAM, ATM, CHEK2, NBN, TP53 oraz błędy w naprawie DNA, które wpływają na rozwój, tempo progresji i agresywność raka prostaty [13 – 16].

2.1.3 CZYNNIKI RYZYKA

Do czynników ryzyka raka stercza można zaliczyć:

- zespół metaboliczny [17]
- otyłość [18] (związana była z częściej występującym nisko zróżnicowanym rakiem gruczołu krokowego)
- dieta (wysokie spożycie alkoholu [19], niskim poziom witaminy D [20], niski poziom witaminy E i selenu [21] związane były ze wzrostem ryzyka PC, kofeina [22] oraz soja [23] zmniejszały ryzyko PC)

- stosowanie antyandrogenów z grupy inhibitorów 5-alfa-reduktazy (5ARI) ma prewencyjny i opóźniający wpływ na raka gruczołu krokowego, ale jednocześnie wiąże się ze zwiększeniem ryzyka wystąpienia raka o wyższym stopniu złośliwości [24]

- inne czynniki, takie jak choroby zapalne jelit, łysienie androgenowe, rzeżączka, czynniki zawodowe np. praca nocna, nikotynizm, narażenie na kadm, HPV-16, narażenie na środki również owadobójcze zwiększają ryzyko raka gruczołu krokowego [25 – 32]

Czynniki protekcyjne:

- promieniowanie ultrafioletowe [33]

- obrzezanie [34]

- większa częstość ejakulacji [35](21 i więcej ejakulacji w ciągu miesiąca)

2.1.4 DIAGNOSTYKA

Stężenie markera PSA w surowicy

Badanie stężenia PSA jako badanie przesiewowe jest wykonywane u osób bez objawów w celu identyfikacji pacjentów z rakiem gruczołu krokowego w stadium utajenia lub u tych, u których występuje duże prawdopodobieństwo wystąpienia choroby. Dzięki badaniom przesiewowym możliwe jest wykrycie choroby na wcześniejszym etapie rozwoju dzięki czemu możliwe jest wdrożenie leczenia radykalnego, co przekłada się na zwiększenie przeżywalności, poprawę jakości życia oraz mniejsze obciążenie opieki zdrowotnej [36].

Badanie przesiewowe w kierunku raka gruczołu krokowego polegające na ocenie stężenia PSA w surowicy krwi, zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Towarzystwa Urologicznego z 2022 r, należy przeprowadzić u mężczyzn >50 roku życia (>45 roku życia w przypadku dodatniego wywiadu

rodzinnego lub u osób rasy czarnej) [37 – 40]. W tym celu bada się produkowany przez komórki nabłonka gruczołu krokowego antygen sterczowy (PSA, prostat-specific antygen, hK3, ludzka kalikreina 3), który jest wysoce specyficzny narządowo [36]. PSA jest proteazą, której główną rolą biologiczną jest upłynnianie nasienia [41]. W surowicy możemy spotkać dwie formy PSA – wolną (fPSA) oraz związaną (cPSA). Z PSA wiążą się trzy białka: α 1-antychymotrypsyna (ACT), α 2-makroglobulina (A2M) i inhibitor α 1-proteazy (API), z czego jego połączenie z ACT doprowadza do jego inaktywacji. 70% PSA w surowicy jest związana z białkami (głównie z ACT), 5-10% z A2M i 1-2% z API [41]. Ekspresja PSA jest w dużej mierze stymulowana przez androgeny. Wzrost stężenia PSA wiąże się z uszkodzeniem błony podstawnej nabłonka gruczołu krokowego i przedostawaniem się PSA do krwioobiegu. Poza rakiem prostaty, podwyższone stężenie PSA obserwujemy również w łagodnym rozroście gruczołu krokowego (ang. benign prostate hiperplasia, BPH), zapaleniu gruczołu krokowego, po instrumentacji dróg moczowych, w urazach stercza, po biopsji oraz intensywnym stosunku seksualnym [36, 42]. Wzrost PSA po biopsji lub cewnikowaniu dróg moczowych może utrzymywać się nawet ponad 4 tygodnie. Natomiast, stosowanie inhibitorów 5 α -reduktazy (5ARI) takich jak finasteryd i dutasteryd powoduje obniżenie jego poziomu średnio o ok 50% w ciągu 12 miesięcy [43]. U mężczyzn pomiędzy 60 a 85 rokiem życia bez rozrostu stercza, PSA rośnie średnio o 0,04 ng/ml/rok, w porównaniu do 0,07 – 0,27 ng/ml/rok u mężczyzn z BPH [44]. Nie powinno się podejmować decyzji klinicznych na podstawie pojedynczego oznaczenia stężenia w surowicy markeru PSA. Wraz ze wzrostem stężenia PSA rośnie ryzyko raka gruczołu krokowego (dla stężenia PSA w przedziale od 0,0 – 0,5 ng/ml ryzyko wynosi 6,6%, natomiast dla PSA 3,1 – 4,0 ng/ml wynosi 26,9%) [44].

Poza samym oznaczeniem stężenia PSA, celem dokładniejszej oceny ryzyka raka stercza, można korzystać z innych wskaźników takich jak gęstość PSA (całkowite PSA podzielone przez objętość gruczołu krokowego, PSA density, PSAD), roczny wzrost PSA ng/ml/rok (PSA velocity, PSAV), czas podwojenia PSA (wykładniczy wzrost stężenia PSA w surowicy w czasie, PSA-DT) oraz wskaźnik PSA wolnego/całkowitego (f/t PSA) [44 – 46].

Do innych biomarkerów raka gruczołu krokowego pozwalających na zmniejszenie liczby niepotrzebnych biopsji oraz wykazujących działanie komplementarne do rezonansu magnetycznego (ang. Magnetic Resonance Imaging - MRI), które jeszcze nie są szeroko stosowane w praktyce klinicznej, zaliczamy:

- PHI/4K score/IsoPSA – oznaczenie czterech form kalikrein (PSA, fPSA, intactPSA i kalikreiny 2 (hK2)) [47],
- PCA3/SelectMDX/Mi Prostate score (MiPS)/ExoDX – oznaczenie ekspresji genu raka gruczołu krokowego (ang. Prostate Cancer Gene 3, PCA3) [48 – 49]
- geny fuzji – nieulegającego translacji regionu 5' proteazy transbłonowej genu regulowanego przez androgeny, seryny 2 (ang. Transmembrane protease, serine 2, TMPRSS2) z homologiem onkogenu E26 wirusa erytroblastozy v-ets (ERG) [50]

Palpacyjne badanie palcem (ang. Digital Rectal Examination – DRE)

Nieodłącznym elementem badania urologicznego w diagnostyce raka stercza jest palpacyjne badanie przezodbytnicze (Digital rectal examination, DRE). Zgodnie z danymi literaturowymi ok 18% raków gruczołu krokowego jest wykrywana w rezultacie dodatniego badania DRE [51]. Nieprawidłowości w DRE wiążą się ze wzrostem ryzyka raka o wyższym zaawansowaniu oraz są wskazaniem do wykonania MRI i biopsji [52 – 53]. Należy podkreślić, że badanie przezodbytnicze jest niezbędne do określenia kategorii klinicznego stopnia zaawansowania guza pierwotnego w skali TNM [54].

Przezodbytnicze badanie ultradźwiękowe prostaty (ang. trans rectal ultrasound – TRUS)

Badanie USG nie wykazuje wystarczającej czułości i swoistości w wykrywaniu zmian podejrzanych w obrębie gruczołu krokowego i obecnie wykorzystywane jest głównie do wykonywania biopsji podejrzanych zmian [55].

Rezonans magnetyczny (ang. magnetic resonance imaging - MRI)

MRI wieloparametryczne (ang. Multiparametric MRI – mpMRI) jest obecnie podstawowym narzędziem wykorzystywanym w diagnostyce raka prostaty, charakteryzującym się wysoką czułością, szczególnie wobec zmian powyżej 10 mm średnicy [56]. Do opisu zmian podejrzanych w mpMRI służy 5-stopniowa skala PI-RADS, która polega na prawdopodobieństwie opracowania kategorii ocen, które wskazują na ryzyko podejrzenia raka istotnego klinicznie. Poza samą detekcją zmian podejrzanych, mpMRI stanowi podłoże do wykonania biopsji fuzyjnej przekroczonej i przezodbytnicznej gruczołu krokowego, w której obraz z rezonansu i ultrasonografii są nakładane w czasie rzeczywistym celem dokładnego określenia miejsc pobierania wycinków. W wysokowyspecjalizowanych zakładach diagnostyki obrazowej możliwe jest również pobieranie wycinków ze stercza pod kontrolą MRI, natomiast wiąże się to z długim czasem zabiegu, znacznym dyskomfortem pacjenta oraz koniecznością jego ścisłej współpracy z przeprowadzającym zabieg [57]. Rezonans magnetyczny służy także lepszemu zaplanowaniu zabiegu, np. dzięki pomiarowi długości cewki moczowej można przewidzieć efekty czynnościowe zabiegu, a znajomość dokładnej lokalizacji guza zmniejsza ryzyko uzyskania dodatknych marginesów chirurgicznych [58].

Biopsja stercza

Zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Towarzystwa Urologicznego przed wdrożeniem jakiegokolwiek procedury leczniczej niezbędne jest potwierdzenie obecności raka gruczołu krokowego w badaniu histopatologicznym, w materiale pozyskanym drogą biopsji gruboigłowej [59]. Może ona być wykonana metodą przezodbytniczną lub przekroczonej. Dostęp przekroczonej, zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Urologicznego z 2022 roku, jest dostępem preferowanym w związku ze znacznie zmniejszonym ryzykiem rozwoju infekcji. Wskazaniem do biopsji stercza jest:

- podwyższony lub narastający poziom stężenia PSA w surowicy

- wyczuwalny guz w DRE

- wykrycie podejrzanej zmiany w badaniach obrazowych (mpMRI) [52, 58 – 60]

Przy wskazaniach do biopsji stercza należy uwzględnić również wiek pacjenta, choroby współistniejące oraz konsekwencje terapeutyczne związane z wykryciem PC. W przypadku braku uzyskania potwierdzenia histopatologicznego należy dążyć do powtórzenia biopsji, w przypadku gdy w dalszym ciągu narasta stężenie PSA w surowicy, pojawiły się nowe zmiany w badaniach obrazowych, poprzednio wykryte zmiany ewoluują lub stwierdzono w biopsji raka śródprzewodowego, który wiąże się z >90% ryzykiem współwystępującego raka stercza o wysokim stopniu złośliwości [61].

Tomografia komputerowa (TK) i MRI jamy brzusznej i miednicy

W celu prawidłowej oceny przedoperacyjnej stopnia zaawansowania choroby, TK i MRI jamy brzusznej służą poszukiwaniu zajętych chorobą nowotworową węzłów chłonnych. Za węzły podejrzane uważamy takie, w których wymiar osi krótkiej wynosi >8mm dla węzłów położonych w miednicy i >10 mm dla węzłów poza miednicą. Badania te, mimo ich rutynowego zastosowania, charakteryzują się niską czułością na poziomie 40% [62].

Pozytonowa tomografia emisyjna (ang. positron emission tomography – PET /CT)

Standardowe badanie PET/CT z choliną, z uwagi na swoją niską czułość i swoistość nie jest wykorzystywane w praktyce klinicznej [63]. Zamiast tego, celem określenia ryzyka zajęcia węzłów chłonnych (LNI), wykorzystywany jest specyficzny antygen błony komórkowej komórek gruczołu krokowego (ang. prostate specific membrane antigen – PSMA) PSMA PET/CT). Jest to specjalistyczne badanie wykorzystujące PSMA w połączeniu z gadoliną [64]. Większa ekspresja antygenu PSMA na powierzchni komórek raka stercza pozwala na wykrycie nowotworu już na jego wczesnych etapach [64].

Nomogramy

Do oceny ryzyka zajęcia węzłów chłonnych i konieczności rozszerzenia zabiegu operacyjnego o limfadenektomię miedniczną (Pelvic lymph node dissection, PLND) służą nomogramy. Prognozują one, na podstawie zebranych dotychczasowych wyników badań pacjenta przed leczeniem radykalnym, stopień zaawansowania nowotworu. Dwa najczęściej wykorzystywane to nomogram MSKCC oraz Briganti, Partin [65 – 66]. Pozwalają one, na podstawie wartości PSA, liczby dodatnich wycinków, stopnia zaawansowania w skali TNM oraz stopnia złośliwości w skali Gleasona, na określenie m.in ryzyka zajęcia węzłów chłonnych (ang. lymph node involvement – LNI) oraz przekraczania torebki gruczołu krokowego (ang. extraprostatic extension – EPE) [65 – 66] Dzięki temu możliwe jest odpowiednie zaplanowanie rozległości zabiegu operacyjnego. Ryzyko wystąpienia przerzutów węzłowych >5% na podstawie wyżej wymienionych nomogramów stanowi podstawę do rozszerzenia zabiegu o eLND (ang. extended lymphadenectomy – rozszerzona limfadenektomia). W przypadku nomogramów wyznaczanych na podstawie biopsji celowanej opartej na mpMRI, można odstąpić od eLND jeżeli ryzyko LNI jest mniejsze niż 7% [67].

OCENA ZAAWANSOWANIA RAKA STERCZA

Do oceny zaawansowania klinicznego raka stercza wykorzystywana jest klasyfikacja TNM opracowana przez Międzynarodową Unię do Walki z Rakiem (Union for International Cancer Control, UICC) [54]. W skład klasyfikacji wchodzi:

- T – wielkość/rozległość guza
- N – brak lub obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
- M – brak lub obecność przerzutów odległych

Dodatkowe oznaczenia:

- p – przypadek oceniany na podstawie badania histopatologicznego
- c – ocena kliniczna

- a – ocena sekcyjna

Doszczędność resekcji oznacza się jako:

- R0 – nowotwór usunięty całkowicie

- R1 – resekcja nieradykalna w badaniu mikroskopowym

- R2 – resekcja nieradykalna makroskopowo

Klasyfikacja TNM dla raka stercza:

T (tumor) – guz pierwotny nowotworu

Tx – nie można ocenić guza pierwotnego

T0 – nie stwierdza się guza pierwotnego

T1 – guz klinicznie niewidoczny w badaniach obrazowych, niebadalny

T1a – przypadkowo wykryty guz w wyciętej tkance <5% objętości wyciętej tkanki

T1b – przypadkowo wykryty guz w wyciętej tkance >5% objętości wyciętej tkanki

T1c – guz wykryty biopsją wykonaną z innych wskazań, np. podwyższony poziom PSA

T2 – guzy wyczuwalny lub widoczny w badaniach obrazowych, w obrębie prostaty

T2a – wielkość poniżej połowy jednego płata, guz ograniczony do jednego płata

T2b – wielkość powyżej połowy jednego płata, guz ograniczony do jednego płata

T2c – guz obejmuje oba płaty

T3 – guz przekracza granice torebki gruczołu krokowego

T3a – guz nacieka poza torebkę, w tym mikroskopowe naciekanie szyi

T3b – naciekanie pęcherzyków nasiennych

T4 – guz nieruchomy lub naciekający przyległe struktury inne niż pęcherzyki nasienne, np. zwieracz zewnętrzny odbytu, pęcherz moczowy, mięsień dźwigacz odbytu, ściana miednicy

N (lymph nodes) – stan regionalnych węzłów chłonnych*

Nx – nie można ocenić regionalnych węzłów chłonnych

N0 – brak przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych

N1 – obecne przerzuty w regionalnych węzłach chłonnych

*Przerzuty nie większe niż 0,2 cm mogą być oznaczone jako pNmi

M (metastases) – przerzuty odległe**

Mx – brak możliwości oceny przerzutów odległych

M0 – nie stwierdza się obecności przerzutów odległych

M1 – obecne przerzuty odległe

M1a – przerzuty w jednym lub więcej pozaregionalnych węzłach chłonnych

M1b – przerzuty do kości

M1c – przerzuty o innym umiejscowieniu niż wcześniej wymienione

**Jeżeli występuje więcej niż jedno miejsce przerzutu, stosuje się kategorię (p)M1c

Należy podkreślić, że kliniczne stadium T (cT) dotyczy wyłącznie przedbadania (DRE). W klasyfikacji histopatologicznej (pTNM) nie istnieją stopnie pT1a/b/c, a rak stercza ograniczony do gruczołu po prostatektomii radykalnej jest klasyfikowany jako pT2. Obecna UICC nie uznaje również podstopni pT2. W EANM (ang. European Association of Nuclear Medicine – Europejskie Towarzystwo Medycyny Nuklearnej) zaproponowano również klasyfikację „miTNM” (TNM w obrazowaniu molekularnym), które uwzględnia wyniki badania pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej (PSMA PET/CT) [68].

Ocena histopatologiczna – Skala Gleasona oraz ISUP 2014 (ang. International Society of Urological Pathology – Międzynarodowe Towarzystwo Patologii Urologicznej)

Skala Gleasona (GS) jest to ocena patomorfologiczna raka prostaty bazująca na rodzaju struktury – architektonice histologicznej guza, określająca stopień złośliwości nowotworu. Opisana została przez Donalda Gleasona w latach 60-tych [69] Zmiany nisko zróżnicowane otrzymują 5 punktów, natomiast wysoko zróżnicowane, przypominające prawidłowe komórki prostaty - 1 punkt. W skali Gleasona ocenia się dwa dominujące wzorce, a przyporządkowane punkty sumuje się i podaje jako wynik końcowy. Jeżeli występuje tylko jeden wzorec to należy go podwoić. W przypadku trzech składowych do wyniku bierze się najczęstszy wzorec i najwyższy w skali. Rak wewnątrzprzewodowy również powinien być włączony do skali Gleasona [70]. Najniższym możliwym wynikiem dla raka prostaty stwierdzonego w biopsji jest GS 3+3=6 (wyniki od 1 do 2 nie są wykorzystywane w ocenie architektury raka i nie są ujęte przy jego diagnozie). Poza klasyfikacją Gleasona w raku stercza obowiązuje również klasyfikacja stworzona przez Międzynarodowe Towarzystwo Patologii Urologicznej (ang. International Society of Urological Pathology, ISUP). Ma ona za zadanie uprościć i unowocześnić „starą” klasyfikację skali Gleasona. Klasyfikacja ISUP z 2014 roku ogranicza liczbę stopni raka stercza do 5 [71 – 72]. W tabeli 1. Przedstawiono Skalę Gleasona oraz ISUP [71 – 72].

Tabela 1. Skala Gleasona oraz ISUP [71 – 72]

Stopień ryzyka/ złośliwości	Skala Gleasona	ISUP
Niski – wysoce zróżnicowany	2-6	1
Pośredni korzystny- z komponentą nowotworu niskozróżnicowanego < 50%	7 (3+4)	2
Pośredni niekorzystny- z komponentą nowotworu niskozróżnicowanego > 50%	7 (4+3)	3
Wysoki – nowotwór niskozróżnicowany lub dojrzały z komponentą anaplastyczną	8 (4+4 lub 3+5 lub 5+3)	4
Wysoki- nowotwór anaplastyczny	9-10	5

Bazując na wyniku PSA oraz klasyfikacji Gleasona/ISUP wyróżniono raka stercza niskiego, pośredniego oraz wysokiego ryzyka. Tabela 2.

Tabela 2. Grupy ryzyka raka gruczołu krokowego na podstawie EAU [59]

Niskiego ryzyka	Pośredniego ryzyka	Wysokiego ryzyka	
PSA <10 ng/mL i GS <7 (ISUP 1) i cT1-2a	PSA 10-20 ng/mL lub GS 7 (ISUP 2/3) lub cT2b	PSA >20 ng/mL lub GS >7 (ISUP 4/5) lub cT2c	Każde PSA Każdy GS/ISUP cT3-4 lub cN+
Choroba zlokalizowana			Choroba lokalnie zaawansowana

Scyntygrafia kości

Scyntygrafia kości służy głównie do określenia cechy M w klasyfikacji TNM, czyli ryzyka występowania przerzutów [73]. W raku gruczołu krokowego przerzuty odległe lokalizują się najczęściej w obrębie kości i mogą prezentować się klinicznie bólami kostnymi czy patologicznymi złamaniami.

2.1.5 LECZENIE

Wybór metody leczenia raka stercza w dużej mierze uzależniony jest od stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, wieku pacjenta, obecności chorób współistniejących oraz możliwości technicznych wykonania zabiegu [74].

Aktywny nadzór/czuje wyczekiwanie

W przypadku nowotworu gruczołu krokowego korzyści terapeutyczne z aktywnego leczenia dotyczą pacjentów, u których przewidywana długość życia przekracza 10 lat [75]. Z uwagi

na w większości powolny rozwój raka stercza oraz obciążenie chorobami współistniejącymi w starszej grupie wiekowej, u większości pacjentów przyczyna zgonu nie będzie związana z rozwijającym się rakiem gruczołu krokowego np. z powodu chorób sercowo-naczyniowych [75]. Dlatego, zasadnym wydaje się prowadzenie aktywnego nadzoru w ściśle wyselekcjonowanej grupie pacjentów, z rakiem stercza niskiego ryzyka, z zastrzeżeniem dobrej współpracy pacjenta z lekarzem oraz stosowania się do zaleceń. Jeżeli przewidywana długość życia pacjenta wynosi <10 lat i/lub pacjent kwalifikuje się do leczenia paliatywnego, wtedy stosowane jest czujne wyczekiwanie skupione głównie na obniżaniu toksyczności leczenia i poprawie jakości życia [76].

Prostatektomia radykalna

Prostatektomia radykalna (RP) jest chirurgiczną metodą leczenia raka stercza. Polega ona na usunięciu gruczołu krokowego wraz z pęcherzykami nasiennymi a następnie zespoleniu szyi pęcherza z cewką moczową. RP może być wykonana techniką otwartą, laparoskopową (LRP) oraz przy wykorzystaniu robota chirurgicznego (RARP) [77]. Zabieg ten można wykonać przezotrzewnowo lub przedotrzewnowo [77]. Podczas zabiegu rutynowo usuwa się również tkankę tłuszczową na przedniej powierzchni prostaty, w której w około 5,5-10% można znaleźć tkankę chłonną, a przerzuty w tych węzłach stwierdzane są z częstością 1,3% [78 – 79] W przypadku dogodnych warunków anatomicznych oraz nowotworu nienaciekającego torebkę, w wyselekcjonowanych grupach pacjentów, można przeprowadzić operację z zaoszczędzeniem pęczków naczyniowo-nerwowych zaopatrujących ciała jamiste prącia co przekłada się bezpośrednio na wyniki erekcyjne po operacji [77].

Radioterapia

Kolejną metodą stosowaną w leczeniu raka stercza jest radioterapia, która może być stosowana w postaci napromieniowania wiązką zewnętrzną, brachyterapii lub obu tych metod. Obecnie najczęściej stosowaną techniką radioterapii jest radioterapia konformalna, oparta na planowaniu trójwymiarowym, która umożliwia odpowiednie dopasowanie wiązki do naświetlanego

narządu [80] Celem zmniejszenia działania radioterapii na okoliczne tkanki stosuje się modulację intensywności wiązek (ang. Image Guided Intensity Modulated Radiation Therapy – IMRT). Istota działania brachyterapii polega na wprowadzenia źródeł radioaktywnych do guza przy pomocy aplikatorów. Często radioterapię łączy się z hormonoterapią, która poprawia wyniki leczenia [81]. Możliwe jest także zastosowanie radioterapii po leczeniu chirurgicznym w przypadku dodatnich marginesów czy przetrwałego wysokiego stężenia PSA w surowicy. Radioterapia, w porównaniu do leczenia operacyjnego, wiąże się z większą liczbą powikłań odległych (uporczywego krwimoczu, włóknienia zaotrzewnowego, przetok układu moczowego) związanych z działaniem promieniowania na okoliczne tkanki w tym pęcherz moczowy i odbytnicę [82].

Hormonoterapia

W zaawansowanym raku stercza podstawę leczenia stanowi hormonoterapia. Ablacja androgenowa uzyskiwana jest na drodze kastracji chirurgicznej lub farmakologicznej, poprzez zastosowanie agonistów oraz antagonistów gonadoliberynu [83]. Za kastracyjny poziom testosteronu uważa się wartość <50 ng/dl ($1,7$ nmol/L), aczkolwiek aktualne badania donoszą, że wartość <20 ng/dl wiąże się z lepszymi wynikami leczenia [84 – 85]. Najszybszą, ale nieodwracalną metodą uzyskania kastracyjnego poziomu testosteronu jest wykonanie obustronnej orchidektomii [86]. Obecnie głównymi formami obniżenia stężenia androgenów w surowicy krwi (ang. Androgen deprivation therapy, ADT) są długo działający agonści hormonu uwalniającego hormon luteinizujący (luteinizing-hormone-releasing hormone, LHRH). Są one podawane w zastrzykach o zmodyfikowanym uwalnianiu co 1, 2, 3, 6 lub 12 miesięcy i poprzez hamowanie wydzielania hormonu luteinizującego (ang. luteinizing hormone – LH) i hormonu folikulotropowego (ang. follicle-stimulating hormone – FSH) powodują zmniejszenie produkcji testosteronu aż do wartości kastracyjnych, które udaje się uzyskać po około 2 do 4 tygodniach [87]. Z uwagi na wzrost poziomu testosteronu w pierwszych dniach leczenia wynikający z przejściowego wzrostu FSH i LH oraz możliwości wystąpienia działań niepożądanych w postaci bólu kostnego, obstrukcji szyi pęcherza moczowego, kompresji rdzenia kręgowego i zdarzeń sercowo-naczyniowych, należy leki te łączyć początkowo z lekami antyandrogenowymi [88].

Antagoniści LHRH są związkami szybko doprowadzającymi do spadku FSH, LH i testosteronu, ale dostępne są jedynie w postaci preparatów podawanych co miesiąc. Kastracyjny poziom testosteronu uzyskuje się szybciej niż w przypadku agonistów LHRH bowiem już w 3 dobie. Antagoniści GnRH (ang. gonadotropin-releasing hormone, hormon uwalniający gonadotropiny) częściej niż agoniści mogą powodować takie objawy jak spadek libido, uderzenia gorąca, przyrost masy ciała, za to powodują mniej zdarzeń sercowo-naczyniowych [89]. Spośród antyandrogenów wyróżniamy związki steroidowe (octan cyproteronu, octan megastrolu i octan medroksyprogesteronu) oraz niesteroidowe (nilutamid, flutamid i bicalutamid) [90 – 93]. Ich działanie skupia się na konkutowaniu z androgenami na poziomie receptorowym. Związki steroidowe są pochodnymi hydroksyprogesteronu i poza wtórnymi do kastracji działaniami niepożądanymi, działają toksycznie na układ sercowo-naczyniowy oraz wątrobę [93]. Niesteroidowe antyandrogeny w monoterapii nie hamują wydzielania testosteronu, a ich głównymi działaniami niepożądanymi są ginekomastia oraz ból piersi [92]. Stosowanie hormonoterapii wymaga regularnej kontroli enzymów wątrobowych oraz stanu układu kostnego. Po odpowiednio długim czasie stosowania ADT może dojść do rozwoju oporności na kastrację (ang. castration resistant prostate cancer – CRPC), przez co konieczne było poszukiwanie nowych preparatów w tej grupie pacjentów. Octan abirateronu, jako inhibitor cytochromu P17, obniża poziom testosteronu hamując jego syntezę na poziomie nadnerczy oraz w komórkach nowotworowych. Stosuje się go wraz z prednizonem/prednizolonem celem ograniczenia ryzyka wystąpienia hiperaldosteronizmu [94]. Apalutamid, darolutamid, enzalutamid w przeciwieństwie do starszych antyandrogenów, blokują również dojazdowy transport androgenów, przez co ograniczone jest ich działanie agonistyczne [95]. Poza wymienionymi lekami w leczeniu raka stercza wykorzystywane są również nowoczesne metody takie jak inhibitory polimerazy poli ADP-rybozy (PARP), Inhibitory punktów kontrolnych układu immunologicznego (checkpoint inhibitors), czy terapia radiofarmaceutyczna (terapia z Rad-223) [96 – 99].

Terapia ogniskowa (niszczenie nowotworu z zaoszczędzeniem narządu)

Terapia ogniskowa w leczeniu raka gruczołu krokowego powinna być, zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (European Association of Urology, EAU), przeprowadzana jedynie w kontekście badań klinicznych lub prospektywnych badań kohortowych [100].

2.2 Podoplanina

Podoplanina (PDPN, D2-40) jest przezbłonową glikoproteiną typu-1, o budowie podobnej do mucyny, o masie cząsteczkowej od 36 do 43 kDa [101 – 102]. Ulega ona ekspresji w większości dojrzałych tkanek oraz odgrywa ważną rolę w procesie embriogenezy, odpowiadając za prawidłowy rozwój serca, płuc i układu limfatycznego [103 – 105]. Podoplanina pierwotnie została opisana w komórkach śródbłonna limfatycznego, fibroblastach tkanki łącznej siateczkowej, narządów limfoidalnych i komórkach nabłonka grasicy [106] Nazwa molekuly pochodzi od jej ekspresji w podocytach, gdzie odpowiada m.in. za regulację ich kształtu [107]. Fizjologiczna rola podoplaniny w dalszym ciągu jest nie do końca poznana. Udowodniono, że łączy się ona z receptorem 2 lektyny typu C (CLEC-2), ulegającym ekspresji w płytkach krwi i komórkach układu odpornościowego [108]. Połączenie podoplaniny z receptorem na płytkach krwi doprowadza do ich agregacji i aktywacji. Z uwagi na ekspresję w obrębie śródbłonna naczyń limfatycznych i brak występowania w obrębie naczyń krwionośnych, jest specyficznym markerem dla śródbłonna limfatycznego i limfangiogenezy [109].

2.2.1 Budowa i funkcja podoplaniny

Ludzka podoplanina składa się ze 162 aminokwasów, których sekwencje tworzą 3 domeny: zewnątrzkomórkową, przezbłonową i wewnątrzkomórkową [101] Jej N-koniec, jak w innych glikoproteinach typu I, skierowany jest na zewnątrz komórki [101, 110 – 111]. W obrębie domeny zewnątrzkomórkowej znajdują się 3 tandemowe, przylegające do siebie sekwencje aminokwasowe,

z czego pierwsza z nich, nazywana domeną stymulującą agregację płytek krwi (PLAG), oddziałuje bezpośrednio z receptorem lektyny typu C (CLEC-2) zlokalizowanym w obrębie trombocytów. PLAG jest nośnikiem dla łańcucha O-glikozydowego połączonego z treoniną w pozycji 52 łańcucha polipeptydowego podoplaniny (Thr52) [108, 112]. Domena wewnątrzkomórkowa jest krótka i tworzy ją 9 aminokwasów. W jej obrębie może zaobserwować, typową dla innych białek błonowych, sekwencję 3 podstawowych aminokwasów, które odpowiadają za ich wiązanie z kompleksem ezryna-radyksyna-moesyna (białka ERM) [113]. Białka ERM są łącznikami wiążącymi cytoszkielet aktywny z białkami błonowymi, co ma szczególne znaczenie w szlaku sygnałowym związanym z przyleganiem i migracją komórek [114]. Zdolności migracyjne komórek są podstawową właściwością komórek nowotworowych odpowiedzialną za progresję nowotworu [114].

2.2.2 Rola podoplaniny w nowotworzeniu

Nadkspresja PDPN występuje w wielu różnych typach nowotworów, takich jak: chrząstniakomięsak, kostniakomięsak, naczyniakomięsak, międzybłoniak, nowotwory germinalne, gwiaździak, glejak oraz raki płaskonabłonkowe różnego pochodzenia, w tym jamy ustnej, gardła, języka, skóry, przełyku i płuc [109, 111 – 112, 115, 116 – 120]. Chociaż niektóre doniesienia sugerują, że ekspresja PDPN może być korzystnym czynnikiem prognostycznym w rakach szyjki macicy, niektórych podtypach raka płuc i jelita grubego, dominująca ilość danych klinicznych i eksperymentalnych wskazuje na ekspresję PDPN w guzach nowotworowych jako niepomyślny czynnik rokowania, szczególnie w rakach płaskonabłonkowych, nowotworach głowy i szyi, przełyku, skóry oraz glejakach [114]. W przypadkach inwazyjnego raka płaskonabłonkowego jamy ustnej ekspresja PDPN korelowała ze zmniejszoną ekspresją E-kadheryny w połączeniach międzykomórkowych [111]. PDPN ulega również ekspresji w komórkach podścieliska nowotworów. Opisywano sprzeczne wyniki dotyczące wartości prognostycznej ekspresji PDPN w fibroblastach związanych z nowotworem (CAF). W gruczolakorakach płuc, inwazyjnych przewodowych rakach piersi, wewnątrzwartrobowych rakach dróg żółciowych i gruczolakorakach przełyku, ekspresja PDPN w fibroblastach związanych z nowotworem (CAF) wiąże się z krótszym przeżyciem całkowitym i złym rokowaniem [121 – 122].

Natomiast, zwiększona ekspresja podoplaniny uważana jest za korzystny czynnik prognostyczny w raku jelita grubego, raku płaskonabłonkowym płuca, ale nie ma znaczącej wartości prognostycznej w raku szyjki macicy [123 – 125]. PDPN na powierzchni komórek nowotworowych wiąże CLEC-2 na płytkach krwi, wyzwalając szlak sygnałowy kinazy tyrozynowej z udziałem Syk, członka rodziny kinaz Src, co prowadzi do agregacji i aktywacji płytek krwi [126]. Agregacja płytek krwi, oprócz ochrony krążących komórek nowotworowych, umożliwia im uniknięcie odpowiedzi cytotoksycznej i sprzyja embolizacji mikronaczyń. Ponadto, aktywowane płytki krwi wydzielają szeroką gamę czynników wzrostu i cytokin, które sprzyjają wzrostowi guza i ułatwiają przerzutowanie [127]. CD9, członek rodziny tetraspanin zidentyfikowany jako białko hamujące proces przerzutowania, zmniejsza agregację płytek krwi i przerzutowanie poprzez interakcję z PDPN [128]. Interakcja PDPN-CD9 obejmuje domeny przezbłonowe TM1 i TM2 CD9 oraz lokalizację obu białek we frakcjach błonowych o niskiej gęstości, co wskazuje, że domena transbłonowa PDPN jest również zaangażowana w tę interakcję. Co ciekawe, wiązanie CD9 z PDPN nie zakłóca interakcji tego ostatniego z CLEC-2, co sugeruje, że hamowanie agregacji płytek krwi za pośrednictwem CD9 odbywa się w mechanizmie wiązania PDPN z CLEC-2 [128]. Wykazano, że PDPN jest wydzielana do mikrośrodowiska nowotworowego związanego z dwoma głównymi typami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych: egzosomami i mikropęcherzykami [129]. Egzosomy to pęcherzyki, które uwalniane są po połączeniu wielu pęcherzyków wewnątrz komórki, a następnie przetransportowane na jej powierzchnię, podczas gdy mikropęcherzyki są bezpośrednio uwalniane z błony cytoplazmatycznej. Oba typy pęcherzyków przekazują informację genetyczną, w tym DNA, mRNA i miRNA oraz białka z komórek guza do komórek biorcy, i promują rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych poprzez stymulację angiogenezy, przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, ułatwienie ucieczki spod nadzoru immunologicznego oraz transformację komórek w kierunku fenotypu przerzutowego [130 – 131]. Egzosomy wydzielane przez komórki ekspresjonujące PDPN transportują zarówno mRNA PDPN, jak i białka. Większość białek w egzosomach zawierających PDPN to cząsteczki adhezji komórek i keratyny cytoszkieletowe typowe dla komórek nabłonkowych, biorące udział w procesie EMT [129]. Inwadopodia to bogate w aktynę uwypuklenie błony

cytoplazmatycznej, które są powiązane z degradacją macierzy pozakomórkowej, zwiększając agresywność i zdolność przerzutowania nowotworów. Hoshino i wsp. odkryli synergiczną interakcję między egzosomami a inwadopodiami w komórkach SCC (ang. squamous cell carcinoma – rak płaskonabłonkowy) głowy i szyi, dzięki której dojrzewanie i aktywność inwadopodii zależy od dostarczania MMP14 przez egzosomy [132]. Ponieważ wygaszenie ekspresji PDPN w rakach płaskonabłonkowych jamy ustnej upośledza zarówno stabilność inwadopodii (i degradację macierzy zewnątrzkomórkowej), jak i wydzielanie egzosomów [129, 133], PDPN może być kluczowym elementem związku między inwadopodiami a egzosomami w SCC. CD44 jest szeroko rozpowszechnioną i wysoce polimorficzną przezbłonową glikoproteiną typu I [134]. Pełni funkcję głównego receptora hialuronanu (HA) i pośredniczy w adhezji oraz migracji komórek w różnych procesach patofizjologicznych, w tym przerzutach nowotworowych [135]. Ponieważ CD44 jest również składnikiem egzosomów, można podejrzewać, że interakcja PDPN-CD44 odgrywa rolę w procesie karcinogenezy [136].

Limfangiogeneza jest istotnym procesem umożliwiającym przerzutowanie komórek nowotworowych, szczególnie w czerniaku i raku gruczołu piersiowego [137]. Tym samym obecność komórek nowotworowych w regionalnych lub wartowniczych węzłach chłonnych jest uważana za zły czynnik prognostyczny u chorych na nowotwory [137 – 138]. Istnieje ścisły związek między ekspresją PDPN a procesem limfangiogenezy. PDPN ulega specyficznie ekspresji w komórkach naczyń limfatycznych, ale nie w naczyniach krwionośnych [139]. W badaniach na myszach z niedoborem PDPN stwierdzono, że rodzą się myszy z zaburzeniami i obrzękiem limfatycznym [140]. Korelacja między wysoką ekspresją PDPN w komórkach nowotworowych a zwiększoną gęstością naczyń chłonnych stwierdzono m.in. u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej [116, 141]. Ponadto, wysoka ekspresja PDPN w komórkach naczyń limfatycznych raka piersi z komórek MCF7, sprzyjała limfangiogenezie w obrębie guza i przerzutom do węzłów chłonnych w mysim modelu ksenoprzeszczepu in vivo [141]. Przeciwnie, ekspresja PDPN w komórkach raka płaskonabłonkowego płuc EBC-1 zmniejszyła limfangiogenezę guza i hamowała powstawanie przerzutów do węzłów

chłonnych, co jest zgodne z tym, że PDPN jest korzystnym czynnikiem rokowniczym związanym z mniejszą agresywnością i mniejszym stopniem zaawansowania choroby u pacjentów z SCC płuc [114]. Ponadto, ekspresja PDPN w CAFs była związana z nasiloną limfangiogenezą w guzie oraz z przerzutami do węzłów chłonnych, a także inwazją naczyń limfatycznych w wielu typach nowotworów, w tym gruczole krokowym, jajnikach, pęcherzu moczowym, trzustce i inwazyjnych przewodowych rakach gruczołu piersiowego [142, 143]. Mechanizmem molekularnym, dzięki któremu CAFs z ekspresją PDPN uczestniczą w procesie limfangiogenezy, może być wydzielanie limfangiogennych czynników wzrostu i cytokin, takich jak VEGF-C, VEGF-D i CCL21. CCL21, które wiąże PDPN. Podoplanina jest wydzielana przez komórki nowotworowe, ułatwiając przedostawaniu się komórek dendrytycznych oraz nowotworowych do naczyń limfatycznych [137]. Inną możliwością promowania limfangiogenezy przez PDPN może być uwalnianie z egzosomów PDPN. W związku z tym wykazano, że egzosomy pochodzące z komórek nowotworowych indukują różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych oraz CAFs, a te ostatecznie wydzielają egzosomy, które sprzyjają wzrostowi guza i przerzutom komórek nowotworowych [144]. Niewątpliwie ekspresja podoplaniny w komórkach nowotworowych pozwala na wykorzystanie jej w celach diagnostycznych, będąc uznanym markerem naczyń limfatycznych [139, 142].

W pracy Kitano i wsp. ekspresja PDPN w komórkach CAFs gruczolakoraka prostaty była związana z nasiloną limfangiogenezą i przerzutami do węzłów chłonnych [142]. Ekspresja PDPN w tkance gruczołu krokowego nie została dobrze scharakteryzowana. W jednej z nielicznych prac opisującej ekspresję podoplaniny (wykazaną za pomocą metody immunohistochemicznej) w gruczole krokowym, stwierdzono ją w cytoplazmie komórek podstawnych gruczołu krokowego oraz w prawidłowym sterczu. Z kolei ekspresji PDPN nie stwierdzono we wszystkich badanych przypadkach w komórkach raka gruczołu krokowego [145].

2.3 Białko Ki-67

Antygen proliferacyjny Ki-67 jest niehistonowym białkiem jądrowym, który został pierwotnie odkryty przy pomocy przeciwciał monoklonalnych otrzymanych po procesie immunizacji myszy jądrami komórkowymi linii komórkowej L428 (komórki chłoniaka Hodgkina) [146]. Nazwa białka pochodzi od skrótu nazwy miejscowości (Kilonia), w której dokonano odkrycia oraz numeru „studzienki” na przygotowanej do tego celu płytce laboratoryjnej. Gen kodujący białko Ki-67 znajduje się na ramieniu długim chromosomu 10 (10q25). Ki-67 jest obecny w komórce podczas faz aktywnych cyklu komórkowego (G1, S, G2, mitoza), nie stwierdza się jego obecności w fazie spoczynkowej (G0). Liczba komórek, w których stwierdza się ekspresję Ki-67 obrazuje pulę komórek dzielących się, co pozwala na użycie tego antygenu jako markera aktywności proliferacyjnej guza nowotworowego. Wysoki poziom ekspresji antygenu Ki-67 korelujący z stopniem złośliwości został udowodniony m. in. dla raka gruczołu piersiowego, chłoniaków, raka jelita grubego, czerniaka i in. [147]. Przeprowadzone do tej pory badania wykazały istotną dodatnią korelację pomiędzy stopniem odróżnicowania (złośliwości) raka gruczołu krokowego, krótszym czasem wolnym od progresji choroby a nasileniem ekspresji Ki-67 [148].

2.5 Białko CD31

Cząsteczka adhezji komórek, płytek krwi i śródbłonna typu 1 (PECAM-1) znana również jako CD31, jest białkiem, które u ludzi jest kodowane przez gen PECAM-1 występujący na chromosomie 17q23.3 [149 – 150]. PECAM-1 jest wysoce glikozylowaną cząsteczką o masie około 130 kDa [151]. CD31 stosuje się przede wszystkim do detekcji komórek śródbłonna nowotworowych naczyń, ponieważ umożliwia powstanie nowych naczyń krwionośnych poprzez adhezję pomiędzy komórkami. Właściwość ta może pomóc w ocenie stopnia nasilenia procesu angiogenezy guza, co może skutkować szybko rosnącym nowotworem [152]. Nowotworowe komórki śródbłonna również często wykazują jego ekspresję, dzięki czemu badanie immunohistochemiczne CD31 może być również wykorzystane do diagnozowania naczynek, jak i naczynekomięsaków. W świetle ww. informacji

PECAM-1 uznawany jest za ważny marker angiogenezy [153]. Nadekspresja białka PECAM-1 została stwierdzona w liniach komórkowych takich nowotworów jak: naczyniaki, naczyniakomięsaki, mięsak Kaposiego, rak gruczołu piersiowego, glejaki, rak okrężnicy, rak skóry oraz innych [154].

2.6 Białko CD34

Białko CD34 jest glikoproteiną błonową występującą na powierzchni komórek śródbłonna [155]. Podczas angiogenezy białko CD34 odpowiada za adhezję leukocytów do wewnętrznej powierzchni ściany naczyń oraz za migrację komórek śródbłonna naczyniowego [156]. CD34 ulega ekspresji we wszystkich komórkach śródbłonna podczas ich proliferacji, a także w stadium G0, co sprawia, że jest markerem procesu neoangiogenezy [157]. Należy jednak pamiętać, że ekspresja CD34 występuje też w różnych komórkach podścieliska ograniczając ich swoistość w ocenach gęstości mikrounaczyniania [158]. Ekspresję białka CD34 potwierdzono w wielu badaniach nad rakiem jelita grubego, głowy i szyi, piersi, wątroby, gruczołu krokowego [155, 157, 159 – 162].

3. Cele pracy

Rak gruczołu krokowego (PC) jest jedną z najczęstszych chorób nowotworowych na świecie. Pomimo coraz szerszego wachlarza dostępnych badań, zarówno diagnostyki obrazowej jak i molekularnej, stale wzrastająca możliwość terapii opartych na rozwoju techniki robotycznej, teleradioterapii, brachyterapii, czy terapii systemowej opartej na kolejnych generacjach leków antyandrogenowych, inhibitorach punktów kontrolnych, inhibitorach kinazy białkowej B czy terapii radiofarmaceutycznej [96 – 99], to w raporcie Krajowego Rejestru Nowotworów z 2020 roku rak gruczołu krokowego był najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym u mężczyzn (19,6%) i stanowił drugą co do częstości przyczynę zgonu z powodu nowotworów (11%) [3]. W zestawieniu z powyższym, zasadnym wydaje się poszukiwanie zarówno nowych markerów prognostycznych jak i celów terapeutycznych dla przyszłych terapii przeciwnowotworowych.

Podoplanina (PDPN) jest przezbłonową glikoproteiną typu-1, podobną do mucyny. PDPN pełni wiele różnych funkcji w organizmie, w tym reguluje organogenezę, mobilność komórek, ale także uczestniczy w procesie transformacji nowotworowej. Ekspresja podoplaniny w komórkach nowotworowych pozwala na wykorzystanie jej w celach diagnostycznych i prognostycznych. Do tej pory wykrywana ona była w wielu nowotworach, głównie w rakach płaskonabłonkowych, guzach OUN oraz nowotworach germinalnych [114]. Podoplanina jest też uznanym markerem naczyń limfatycznych [139, 142]. W przeglądzie literatury jest niewiele prac poświęconych badaniu ekspresji podoplaniny w raku gruczołu krokowego. W jednej z nielicznych prac ekspresja PDPN w komórkach gruczolakoraka prostaty była związana z nasiloną limfangiogenezą i przerzutami do węzłów chłonnych [142]. Ekspresja PDPN w tkance gruczołu krokowego nie została dobrze scharakteryzowana. W kolejnej pracy opisującej ekspresję immunohistochemiczną podoplaniny w gruczole krokowym, stwierdzono ją w cytoplazmie komórek podstawnych tego narządu. Z kolei wykazano brak jej ekspresji w komórkach raka gruczołu krokowego [145].

Powyższe dane skłoniły mnie do zbadania ekspresji podoplaniny w raku gruczołowym prostaty i sformułowaniu następujących celów pracy:

- 1) określenie lokalizacji i nasilenia ekspresji podoplaniny w badanych przypadkach raka gruczołu krokowego
- 2) analiza ekspresji podoplaniny w korelacji z danymi kliniczno – patologicznymi pacjentów
- 3) analiza korelacji ekspresji podoplaniny z ekspresją markerów CD31, CD34 oraz Ki-67 w badanych przypadkach raka prostaty
- 4) analiza związku ekspresji podoplaniny, CD31, CD34 oraz Ki-67 z wybranymi wskaźnikami rokowniczymi

4. Materiał i Metody

Materiał do przeprowadzenia badań stanowiły archiwalne bloczki parafinowe pochodzące od 96 pacjentów z rozpoznanym i potwierdzonym histopatologicznie rakiem gruczołu krokowego, po przeprowadzonej radykalnej prostatektomii w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu w latach 2011-2015. Materiał pochodził z pracowni histopatologicznej ww. szpitala za zgodą Dyrektora prof. dr hab. Wojciecha Witkiewicza i Kierownika Zakładu Patomorfologii „Hist-Med” dr Mariusza Kosińskiego. Średni wiek pacjentów wynosił 68 lat (mediana 67 lat). Dane kliniczno-patologiczne przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Dane kliniczno-patologiczne pacjentów

Parametr	Pacjenci	
	Liczba	%
Stopień zaawansowania T2	35	36,4
Stopień zaawansowania T3a	50	52,1
Stopień zaawansowania T3b	11	11,5
Status węzłów chłonnych N0	87	90,6
Status węzłów chłonnych N1	9	9,4
Stopień wg Gleason (suma 6)	39	40,6
Stopień wg Gleason (suma 7)	40	41,7
Stopień wg Gleason (suma 8)	8	8,3
Stopień wg Gleason (suma 9)	8	8,3
Stopień wg Gleason (suma 10)	1	1,1

Na wykorzystanie do badań materiału tkankowego oraz danych kliniczno – patologicznych (wiek, stopień złośliwości histologicznej guza, stopień zaawansowania miejscowego TNM, przedoperacyjny poziom stężenia markera PSA w surowicy krwi i czas przeżycia wolnego od progresji choroby, definiowany jako czas po operacji, po którym nastąpił wzrost stężenia markera PSA w surowicy krwi pacjenta powyżej wartości 0,2 ng/ml) uzyskano również zgodę Dyrektora Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego we Wrocławiu. Na realizację badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym (nr KB. – 743/2018).

4.2 Reakcje immunohistochemiczne (IHC)

Reakcje immunohistochemiczne przeprowadzono na materiale utrwalonym w 4% zbuforowanej formalinie (Chempur, Polska), zatopionym w bloczki parafinowe i pokrojonym na skrawki grubości 4 µm. Do badań użyto następujących przeciwciał pierwszorzędowych: monoclonal mouse anti-human podoplanin, klon D2-40 (nr kat. IR072, RTU, Dako, Glostrup, Dania), monoclonal mouse anti-human CD31, klon JC70A (nr kat. IR610, RTU, Dako), monoclonal mouse anti-human CD34, klon QBEnd 10 nr kat. (IR632, RTU, Dako) oraz monoclonal mouse anti-human Ki-67, klon MIB-1 (nr kat. IR626, RTU, Dako). Pierwszym etapem procedury było odparafinowanie, nawodnienie oraz cieplne odsłonięcie epitopów poprzez gotowanie skrawków w aparacie PTLINK (Dako) – 97°C, 20 minut w buforze EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (dla przeciwciała podoplaniny, CD31 oraz CD34) lub w buforze EnVision FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (dla przeciwciała Ki-67). Studzenia dokonano w buforze płuczącym Wash Buffer (bufor TBS z Tween 20). Właściwe reakcje IHC przeprowadzono w aparacie AutostainerLink 48 (Dako, Dania) z zastosowaniem systemu do wizualizacji EnVision FLEX+, Mouse High pH (Link) (nr kat. K8002, Dako, Dania). Na wstępie dokonano blokowania aktywności endogennej peroksydazy poprzez inkubację skrawków w EnVision FLEX Peroxidase Blocking Reagent (5 minut w temperaturze pokojowej). Następnie, preparaty przepłukano w buforze płuczącym i inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Celem usunięcia nadmiaru przeciwciał preparaty przepłukano za pomocą

buforu płuczącego. Kolejnym etapem była 20-minutowa inkubacja w temperaturze pokojowej z drugorzędowymi przeciwciałami sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (EnVision FLEX/HRP). Po przepłukaniu w buforze płuczącym dodano tetrachlorowodorek 3,3'-diaminobenzydyny będący substratem dla peroksydazy chrzanowej i całość inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Dla całkowitego usunięcia resztek odczynnika zastosowano dwukrotne płukanie w buforze płuczącym. Kolejnym etapem procedury było wykonanie barwienia kontrastującego hematoksyliną (EnVision Flex Hematoxylin) (Dako, Dania) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Ostatniego płukania dokonano przy użyciu wody destylowanej. Ostatnim etapem było odwodnienie materiału poprzez 5-minutowe kąpiele w szeregu alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (70, 96 i 99,8 %) w temperaturze pokojowej, a następnie przeprowadzenie przez 5 minut przez ksylen. Na koniec, preparaty zmontowano w aparacie Coverslipper żywicą syntetyczną Dako Mounting Medium (Dako, Dania).

4.3 Ocena nasilenia reakcji immunohistochemicznych

Do określenia poziomu ekspresji immunohistochemicznej (IHC) podoplaniny wykorzystano skalę IRS opracowaną przez Remmele'go i Stegner [163] wykorzystującą odsetek komórek pozytywnych oraz intensywność reakcji barwnej (Tabela 4). Do określenia ekspresji jądrowej markera Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego wykorzystana półilościową skalę określającą odsetek komórek z pozytywną reakcją jądrową Ki-67 (0% pozytywnych komórek – 0; 1-10% pozytywnych komórek – 1; 11-25% pozytywnych komórek – 2; 26-50% pozytywnych komórek – 3; 51-100% pozytywnych komórek – 4). Gęstość naczyń krwionośnych (CD31 i CD34) oraz limfatycznych (PDPN) zmierzono wykorzystując metodą Chalkleya [164]. Trzy najbardziej unaczynione obszary guza zwane „hotspotami” oceniono pod powiększeniem x100 (metodą Weidnera [165], [166]). Oceny dokonywałem sam, przypadki wątpliwe były konsultowane przez patologów.

Tabela 4. Skala IRS wg Remmele'go i Stegner[163].

Odsetek pozytywnych komórek (%)	Punktacja A	Intensywność reakcji barwnej	Punktacja B
0	0	Brak reakcji barwnej	0
<10	1	mała	1
10-50	2	średnia	2
51-80	3	duża	3
>80	4	-	-

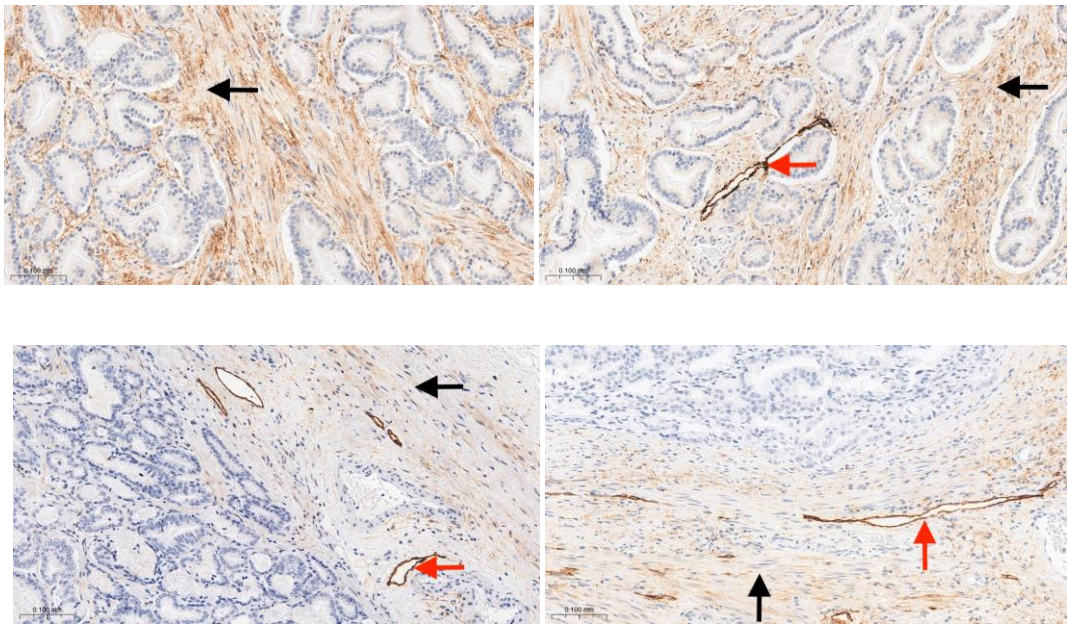
Ilość uzyskanych punktów $\Sigma = A \times B$	Interpretacja wyników
0-1	Negatywny
2-3	Pozytywny: słaba ekspresja
4-8	Pozytywny: średnia ekspresja
9-12	Pozytywny: silna ekspresja

4.4 Analiza statystyczna

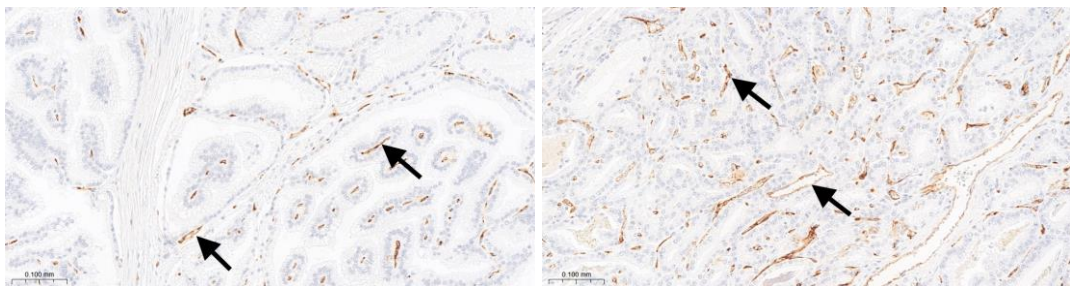
Uzyskane rezultaty zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu "GraphPad Prism 5,0 (La Jolla, Ca, USA). Do określenia rozkładu badanych cech ilościowych wykorzystany został test Kołmogorowa-Smirnowa. W celu porównania różnic pomiędzy dwoma cechami zastosowano test t-Studenta lub test Manna Whitneya (w zależności od rozkładu cech). W przypadku porównywania

więcej niż dwóch cech, wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) lub test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna. W celu zbadania istniejących korelacji, w zależności od rozkładu cech, wykorzystano testy korelacji Pearsona lub Spearmana. Analizę przeżycia wolnego od progresji choroby wykonano przy użyciu testu Mantela – Coxa. Wyniki były uznane za istotne, gdy $p < 0,05$.

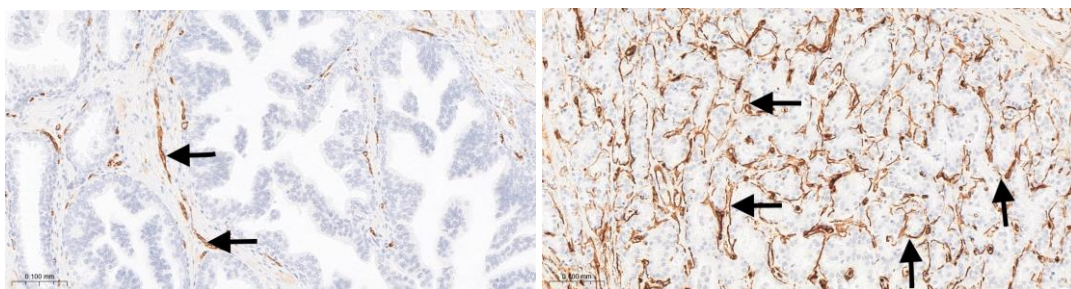
5. Wyniki



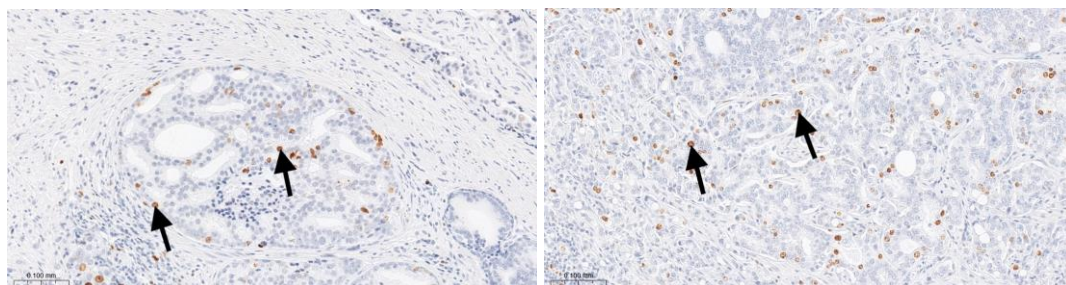
Ryc 1. Ekspresja podoplaniny widoczna w komórkach podścieliska (czarna strzałka) oraz śródbłónka naczyń limfatycznych (czerwona strzałka) raka gruczołu krokowego (x100).



Ryc 2. Ekspresja markera CD31 widoczna w komórkach śródbłónka naczyń krwionośnych (czarne strzałki) raka gruczołu krokowego (x100).



Ryc 3. Ekspresja markera CD34 widoczna w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych (czarne strzałki) raka gruczołu krokowego (x100).



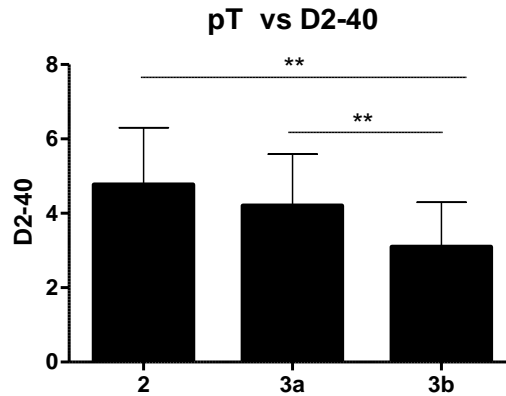
Ryc 4. Ekspresja markera proliferacji Ki-67 widoczna w komórkach (czarne strzałki) raka gruczołu krokowego (x100).

Pozytywną ekspresję IHC podoplaniny zaobserwowałem w komórkach podścieliska raka gruczołu krokowego w 88% (84/96) oraz komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych w 89% (85/96) przebadanych przypadków. Nie zaobserwowałem ekspresji PDPN w komórkach raka gruczołu krokowego.

Tabela A. Grupa badana - rozkład ilościowy obecności ekspresji IHC podoplaniny.

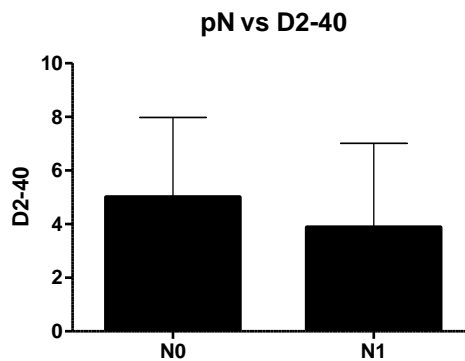
Grupa badana	
(n – liczba przypadków)	
Podoplanina w komórkach	
podścieliska IRS, n (%)	
0	12 (12,5)
1-12	84 (87,5)
Podoplanina w komórkach	
śródbłonna naczyń	
limfatycznych IRS, n (%)	
0	11 (11,45)
1-4	85 (88,5)

Następnie, podjąłem próbę analizy nasilenia reakcji IHC podoplaniny (D2-40) w komórkach podścieliska w zależności od stopnia wielkości guza wg klasyfikacji TNM. W pierwszym etapie porównałem wyniki dla stopnia T2 (33 przypadki), T3a (43 przypadki) i T3b (8 przypadków). Nie zaobserwowałem różnic w ekspresji PDPN między guzami T2 a T3a. Istotnie statystycznie wyższą ekspresję wykazałem dla grupy T2 w porównaniu do grupy T3b ($p < 0,01$) oraz dla grupy T3a w porównaniu do grupy T3b ($p < 0,01$). Wyniki analiz przedstawiono na Rycinie 5,



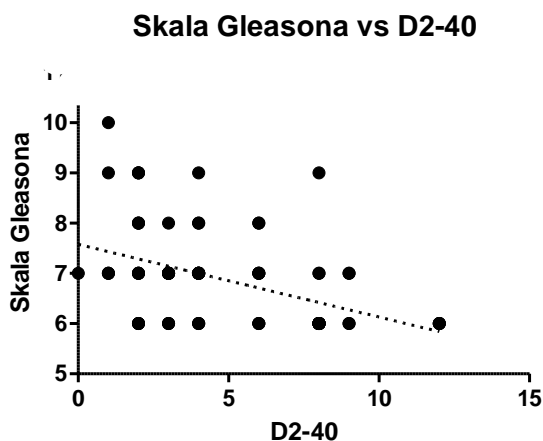
Ryc 5. Analiza nasilenia ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach podścieliska raka gruczołu krokowego w zależności od wielkości guza wg klasyfikacji TNM nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami T2 i T3a ($p=0,51$; test Manna-Whitney'a), wyższą istotnie statystycznie ekspresję wykazałem dla grupy z guzem T2 względem grupy z guzem T3b oraz dla grupy T3a w porównaniu do grupy T3b (odpowiednio $p<0,01$; $p<0,01$, test Manna-Whitney'a), (** $p<0,01$)

W kolejnym etapie, przeprowadziłem analizę stopnia nasilenia ekspresji IHC dla podoplaniny (D2-40) w komórkach podścieliska raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Wyniki analizy nie wykazały istotnie statystycznej różnicy ekspresji podoplaniny w guzach bez stwierdzonych przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N0) w porównaniu do guzów z stwierdzonymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N1) Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 6,



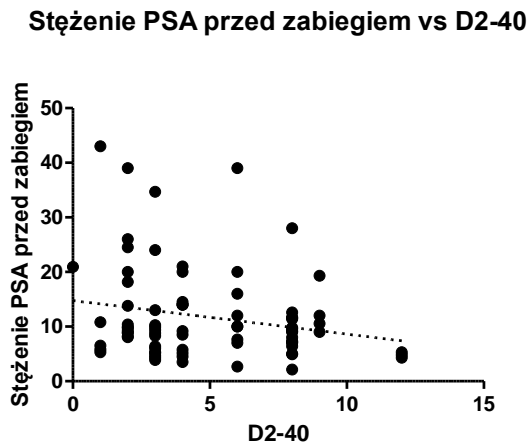
Ryc 6. Analiza nasilenia ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach podścieliska raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami N0 i N1 ($p=0,34$; test Manna-Whitney'a).

W następnym etapie dokonałem analizy korelacji nasilenia ekspresji podoplaniny w komórkach raka gruczołu krokowego w zależności od skali Gleasona. Wyniki badań wykazały istotną statystycznie, średnią korelację ujemną pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego a poziomem ekspresji podoplaniny w podścielisku. Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 7,



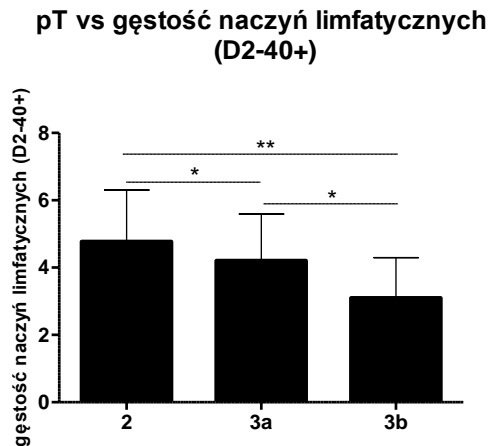
Ryc 7. Ujemna korelacja pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego a poziomem ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach jego podścieliska ($r=-0,4827$; $p<0,0001$, test korelacji Spearmana).

Kolejnym krokiem było zbadanie ekspresji podoplaniny (D2-40) w komórkach podścieliska raka gruczołu krokowego w zależności od wartości stężenia PSA w surowicy przed podjętym leczeniem operacyjnym. Przeprowadzona ocena wykazała brak korelacji pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy a poziomem ekspresji podoplaniny w podścielisku. Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 8,



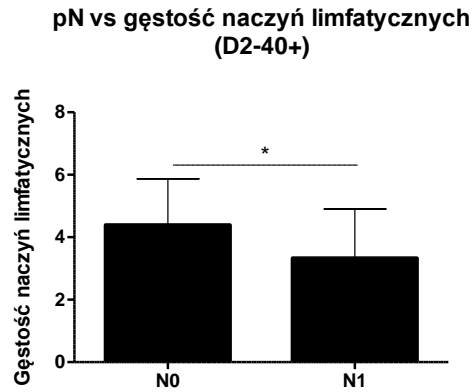
Ryc 8. Analiza korelacji pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy przed zabiegiem a poziomem ekspresji podoplaniny (D2-40) w podścielisku ($r=-0,166$; $p=0,1385$, test korelacji Spearmana).

W następnym etapie podjąłem próbę analizy gęstości naczyń limfatycznych (D2-40+) w zależności od wielkości guza wg klasyfikacji (pT). Ponownie porównałem wyniki dla stopnia T2 (33 przypadki) T3a (42 przypadki) i T3b (10 przypadków). Wyniki wykazały istotną statystycznie większą gęstość naczyń D2-40+ w guzach T2 w porównaniu do guza T3a ($p<0,05$) oraz w porównaniu do guza T3b ($p<0,01$). Wyższą istotnie statystycznie gęstość naczyń D2-40+ wykazałem również dla grupy z guzem T3a względem grupy z guzem T3b ($p<0,05$). Wyniki analiz przedstawiono na Rycinie 9,



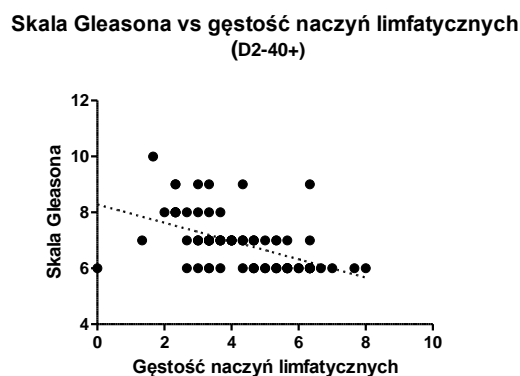
Ryc 9. Analiza gęstości naczyń limfatycznych (D2-40+) raka gruczołu krokowego w zależności od wielkości guza wg klasyfikacji TNM, wykazała istotnie statystycznie wyższą gęstość naczyń D2-40+ dla grupy T2 względem grupy T3a ($p < 0,05$; test Manna-Whitney'a), istotnie statystycznie wyższą gęstość naczyń D2-40+ wykazałem również dla grupy z guzem T2 względem grupy z guzem T3b oraz dla grupy T3a w porównaniu do grupy T3b (odpowiednio $p < 0,01$; $p < 0,05$; test Manna-Whitney'a), (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Przeprowadziłem również analizę gęstości naczyń D2-40+ w raku gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Wyniki analizy wykazały istotnie statystycznie wyższą gęstość naczyń D2-40+ w guzach bez stwierdzonych przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N0) w porównaniu do guzów z stwierdzonymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N1) ($p < 0,05$). Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 10,



Ryc 10. Analiza gęstość naczyń limfatycznych D2-40+ raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych wykazała istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji w grupie N0 w porównaniu do grupy N1 ($p < 0,05$; test Manna-Whitney'a), (* $p < 0,05$)

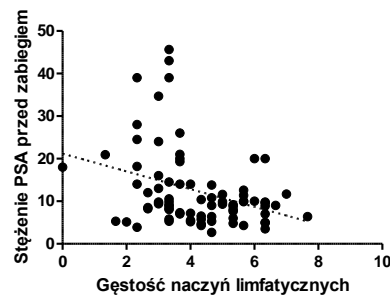
W kolejnym etapie dokonałem analizy gęstość naczyń limfatycznych D2-40+ raka gruczołu krokowego w zależności od skali Gleasona. Wyniki badań wykazały istotną statystycznie, silną ujemną korelację pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego a gęstością naczyń limfatycznych D2-40+. Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 11,



Ryc 11. Ujemna korelacja pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego (wg skali Gleasona), a gęstością naczyń limfatycznych D2-40+ raka gruczołu krokowego ($r = -0,6075$; $p < 0,0001$, test korelacji Spearmana).

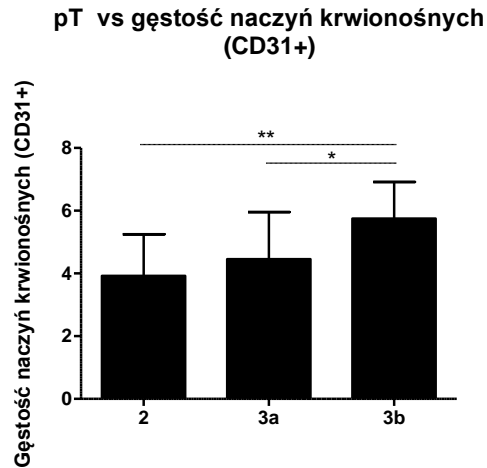
Następnie zbadałem korelację gęstości naczyń limfatycznych raka gruczołu krokowego w zależności od wartości stężenia PSA w surowicy przed podjętym leczeniem operacyjnym [36]. Przeprowadzona analiza wykazała istotną statystycznie słabą ujemną korelację pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy a gęstością naczyń D2-40+ raka gruczołu krokowego. Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 12,

Stężenie PSA przed zabiegiem vs gęstość naczyń limfatycznych (D2-40+)



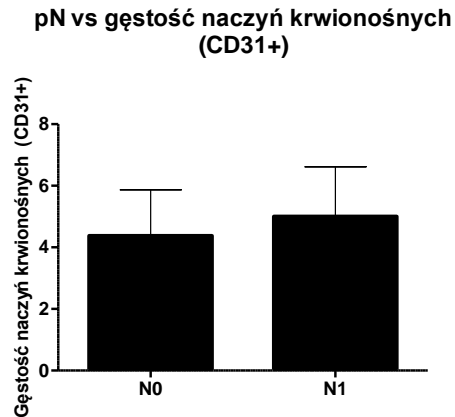
Ryc 12. Ujemna korelacja pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy a gęstością naczyń limfatycznych D2-40+ raka gruczołu krokowego ($r=-0,3032$; $p<0,01$, test korelacji Spearmana).

Analizowałem również nasilenie ekspresji IHC dla pozostałych badanych przeze mnie markerów angiogenezy, określających gęstość naczyń krwionośnych (CD31 i CD34) w raku gruczołu krokowego, w zależności od stopnia wielkości guza wg klasyfikacji TNM. Wyniki wykazały nieistotne statystycznie różnice między guzami T2 a T3a a gęstością naczyń CD31+. Natomiast wyższą istotnie statystycznie gęstość naczyń CD31+ wykazałem dla grupy z guzem T3b względem grupy z guzem T2 ($p<0,001$) oraz dla grupy T3b w porównaniu do grupy T3a ($p<0,05$). Wyniki analiz przedstawiono na Rycinie 13,



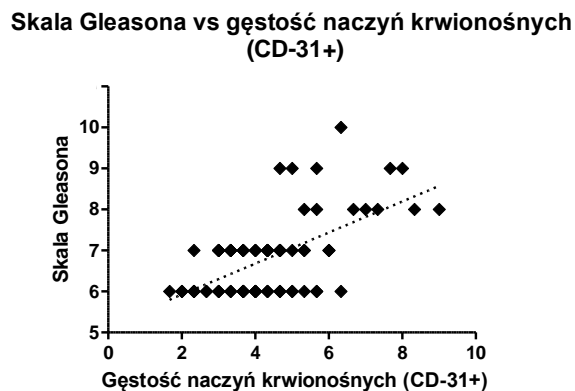
Ryc 13. Analiza gęstości naczyń krwionośnych CD31+ raka gruczołu krokowego w zależności od wielkości guza wg klasyfikacji TNM nie wykazała istotnych statystycznie różnic (na granicy istotności) pomiędzy grupami T2 i T3a ($p=0,054$; test Manna-Whitney'a), wyższą istotnie statystycznie ekspresję wykazałem dla grupy z guzem T3b względem grupy z guzem T2 oraz dla grupy T3b w porównaniu do grupy T3a (odpowiednio $p<0,01$; $p<0,05$; test Manna-Whitney'a), (* $p<0,05$; ** $p<0,01$)

Ponadto, analizowałem gęstość naczyń krwionośnych CD31+ raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Wyniki analizy nie wykazały istotnie statystycznie różnicy w gęstości naczyń CD31+ w guzach bez stwierdzonych przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N0) w porównaniu do guzów z stwierdzonymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N1). Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 14,



Ryc 14. Analiza gęstości naczyń CD31+ raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami N0 i N1 ($p=0,2031$; test Manna-Whitney'a),

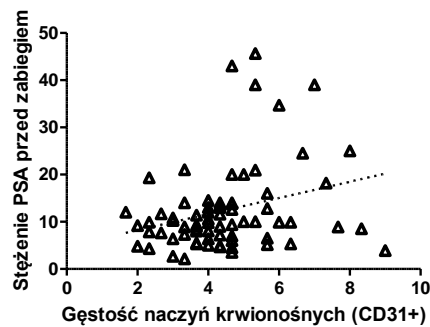
W kolejnym etapie dokonałem analizy gęstości naczyń krwionośnych CD31+ raka gruczołu krokowego w zależności od skali Gleasona. Wyniki badań wykazały istotną statystycznie, średnią korelację pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego a gęstością naczyń krwionośnych CD31+. Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 15,



Ryc 15. Korelacja pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego (wg Gleasona) a gęstością naczyń krwionośnych CD31+ raka gruczołu krokowego ($r=0,5242$; $p<0,0001$, test korelacji Spearmana).

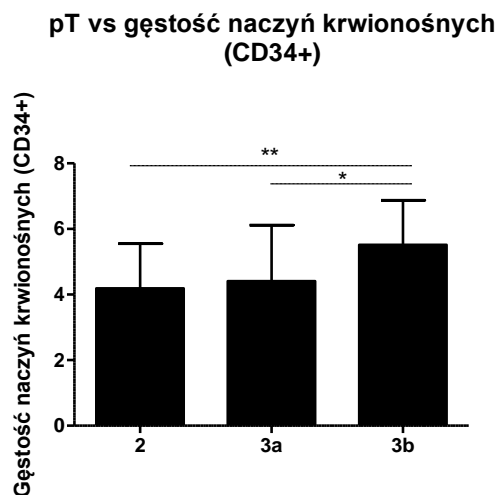
Dodatkowo, zbadałem korelację gęstości naczyń krwionośnych CD31+ raka gruczołu krokowego w zależności od wartości stężenia PSA w surowicy, przed podjętym leczeniem operacyjnym. Przeprowadzona analiza wykazała również istnienie istotnej statystycznie słabej korelacji pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy a gęstością naczyń CD31+ w raku gruczołu krokowego. Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 16,

Stężenie PSA przed zabiegiem vs gęstość naczyń krwionośnych (CD31+)



Ryc 16. Korelacja pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy a gęstością naczyń krwionośnych CD31+ raka gruczołu krokowego ($r=0,2551$; $p<0,05$, test korelacji Spearmana).

Następnie, oceniałem gęstość naczyń krwionośnych CD34+ raka gruczołu krokowego w zależności od stopnia wielkości guza wg klasyfikacji TNM. Wyniki wykazały nieistotne statystycznie różnice gęstości naczyń CD34+ między guzami T2 a T3a. Natomiast, wyższą istotnie statystycznie gęstość naczyń krwionośnych (CD34+) wykazałem dla grupy T3b względem grupy T2 ($p<0,01$) oraz dla grupy T3b w porównaniu do grupy T3a ($p<0,05$). Wyniki analiz przedstawiono na Rycinie 17,

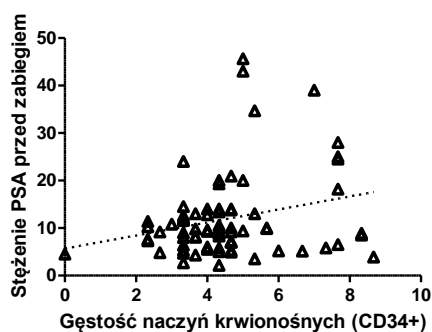


Ryc 17. Analiza nasilenia gęstości naczyń krwionośnych CD34+ raka gruczołu krokowego w zależności od wielkości guza wg klasyfikacji TNM nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami T2 i T3a ($p=0,582$; test Manna-Whitney'a), wyższą istotnie statystycznie ekspresję wykazałem dla grupy T3b względem grupy T2 oraz dla grupy T3b w porównaniu do grupy T3a (odpowiednio $p<0,01$; $p<0,05$; test Manna-Whitney'a), (* $p<0,05$; ** $p<0,01$)

Przeprowadziłem również analizę gęstości naczyń krwionośnych CD34+ raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Wyniki analizy wykazały istotną statystycznie większą gęstość naczyń CD34+ w guzach z stwierdzonymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N1) w porównaniu do guzów bez stwierdzonych przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N0) ($p<0,05$). Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 18,

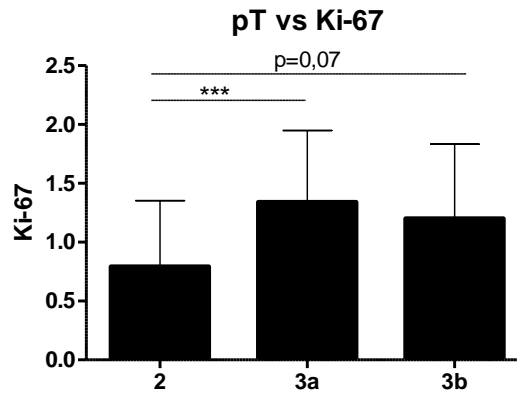
Dodatkowo, analizowałem zależność gęstości naczyń krwionośnych CD34+ raka gruczołu krokowego a wartością stężenia PSA w surowicy przed podjętym leczeniem operacyjnym. Przeprowadzona ocena nie wykazała istotnej statystycznie korelacji pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy a gęstością naczyń krwionośnych CD34+ w rakach gruczołu krokowego. Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 20,

Stężenie PSA przed zabiegiem vs gęstość naczyń krwionośnych (CD34+)



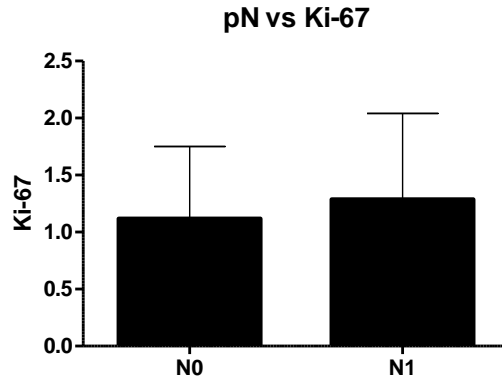
Ryc 20. Analiza korelacji pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy przed zabiegiem a gęstością naczyń krwionośnych CD34+ ($r=0,1586$; $p=0,1711$, test korelacji Spearmana).

Dokonałem również analizy nasilenia ekspresji markera proliferacji komórkowej – białka Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego w zależności od stopnia wielkości guza wg klasyfikacji TNM. Wykazałem wyższą istotnie statystycznie ekspresję dla grupy z guzem T3a względem grupy z guzem T2 ($p<0,001$). Wyniki nasilenia ekspresji białka Ki-67 między grupą z guzem T2 a T3b oraz T3a i T3b nie wykazały istotnych statystycznie różnic. Wyniki analiz przedstawiono na Rycinie 21,



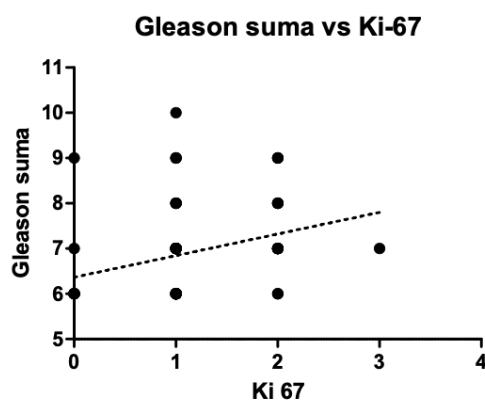
Ryc 21. Analiza nasilenia ekspresji markera Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego w zależności od wielkości guza wg klasyfikacji TNM, wykazała wyższą istotnie statystycznie ekspresję dla grupy z guzem T3a względem grupy z guzem T2 ($p < 0,001$; test Manna-Whitney'a), wyniki stopnia nasilenia ekspresji białka Ki-67 między grupą z guzem T2 a T3b oraz T3a i T3b nie wykazały istotnych statystycznie różnic (odpowiednio $p = 0,0723$; $p = 0,5729$; test Manna-Whitney'a), (***) $p < 0,001$).

Analizowałem także stopień nasilenia ekspresji białka Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Wyniki analizy nie wykazały istotnej statystycznie różnicy nasilenia ekspresji ww. markera w guzach bez stwierdzonych przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N0) w porównaniu do guzów ze stwierdzonymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych (stopień N1). Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 22,



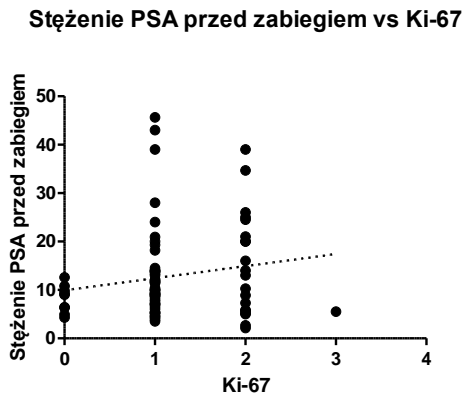
Ryc 22. Analiza nasilenia ekspresji markera Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego w zależności od braku lub obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami N0 i N1 ($p=0,4497$; test Manna-Whitney'a).

W kolejnym etapie dokonałem analizy nasilenia ekspresji białka Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego w zależności od skali Gleasona. Wyniki badań wykazały istotną statystycznie, średnią korelację pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego a nasileniem ekspresji białka Ki-67. Wynik analizy przedstawiono na Rycinie 23,



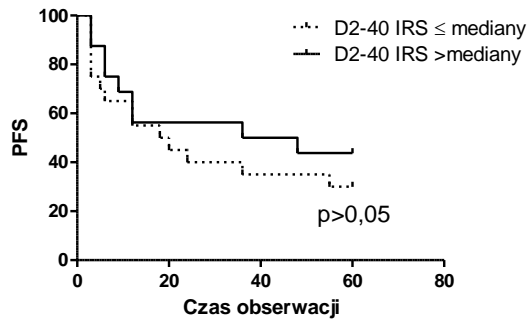
Ryc 23. Korelacja pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej raka gruczołu krokowego (wg skali Gleasona) a poziomem ekspresji białka Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego ($r=0,4047$; $p<0,0001$, test korelacji Spearmana).

Ponadto, zbadano również korelację nasilenia ekspresji białka Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego w stosunku do stężenia PSA w surowicy przed podjętym leczeniem operacyjnym. Przeprowadzona analiza nie wykazała istotnej statystycznie korelacji pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy a nasileniem ekspresji białka Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego. Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 24,



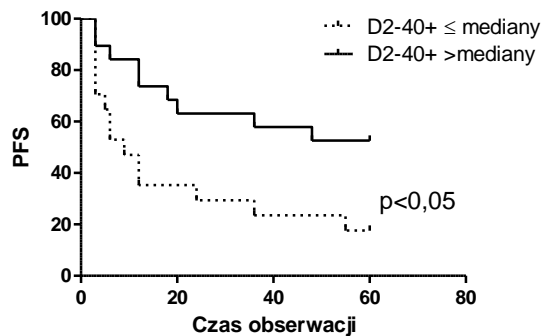
Ryc 24. Analiza korelacji pomiędzy wartością stężenia PSA w surowicy przed zabiegiem a poziomem ekspresji białka Ki-67 ($r=0,1485$; $p=0,1976$, test korelacji Spearmana).

Po zbadaniu nasilenia ekspresji wszystkich badanych przeze mnie białek oraz gęstości naczyń, nie stwierdziłem związku pomiędzy nimi a wiekiem pacjenta przed operacją. Analiza czasu przeżycia wolnego od progresji choroby (ang. progression-free survival - PFS) nie wykazała również istotnej statystycznie zależności z ekspresją PDPN w podścielisku. Wynik przedstawiono na Rycinie 25,



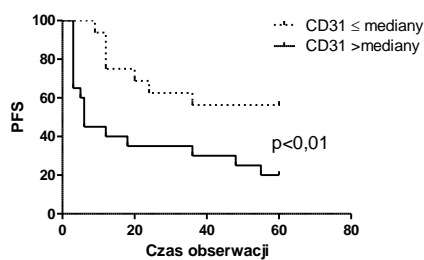
Ryc 25. Analiza czasu przeżycia wolnego od progresji choroby (PFS) w zależności od nasilenia ekspresji podoplaniny w komórkach podścieliska ($p=0,3992$, test Mantel-Cox).

Natomiast wysoka gęstość naczyń limfatycznych D2-40+ była obserwowana w przypadkach z dłuższym przeżyciem wolnym od progresji choroby (PFS). W przypadkach ekspresji markerów CD31, CD34 oraz Ki-67 zaobserwowano odwrotną tendencję. Wyniki przedstawiono na Rycinie 26 i 27 (A,B,C),

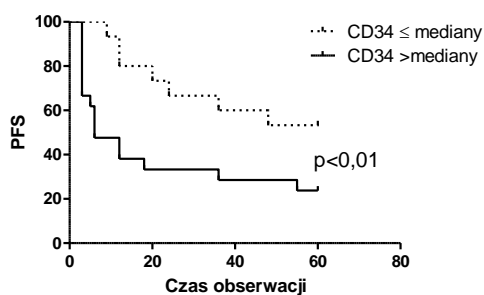


Ryc 26. Analiza czasu przeżycia wolnego od progresji choroby wykazała, że przypadki z wysoką gęstością naczyń limfatycznych D2-40+ charakteryzują się istotnie statystycznie dłuższym czasem przeżyć wolnym od nawrotu choroby ($p<0,05$, test Mantel-Cox).

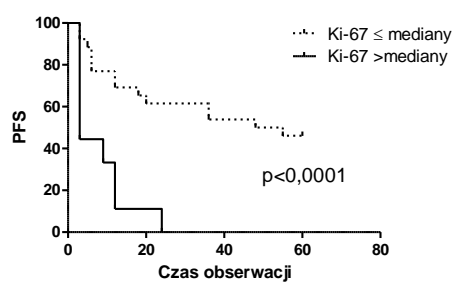
A



B



C



Ryc 27. Analiza czasu przeżycia wolnego od progresji choroby (PFS) wykazała, że przypadki z większą gęstością naczyń krwionośnych znakowanych markerami CD31 i CD34 oraz większym nasileniem ekspresji proliferacji komórek raka gruczołu krokowego (Ki-67) charakteryzują się istotnie statystycznie krótszym czasem wolnym od nawrotu choroby (odpowiednio $p < 0,05$; $p < 0,05$; $p < 0,01$, test Mantel-Cox).

Po analizie nasilenia ekspresji wszystkich markerów podjąłem próbę analizy korelacji pomiędzy poziomami ich ekspresji. Wyniki przedstawiono w Tabeli 5,

Tabela 5. Analiza korelacji nasilenia ekspresji poszczególnych badanych markerów

Badane markery	Współczynnik korelacji r (test korelacji Spearmana)	Poziom istotności p
D2-40 podścielisko vs Ki-67	-0,1561	0,1751
D2-40 podścielisko vs CD-31	-0,3517	<0,01
D2-40 podścielisko vs CD-34	-0,2908	<0,05
D2-40 naczynia limfatyczne vs Ki-67	-0,3198	<0,01
D2-40 naczynia limfatyczne vs CD-31	-0,424	<0,001
D2-40 naczynia limfatyczne vs CD34	0,0832	0,4967
D2-40 podścielisko vs D2-40 naczynia limfatyczne	0,3885	<0,001
CD-31 vs CD-34	0,7485	<0,0001
Ki-67 vs CD-31	0,1126	0,3428
Ki -67 vs CD-34	0,1599	0,1766

Analiza wykazała:

- Silną korelację między poziomami ekspresji markerów naczyń krwionośnych CD31 i CD34
- Średnią korelację między poziomem ekspresji podoplaniny w komórkach podścieliska a gęstością naczyń limfatycznych D2-40+
- Średnią ujemną korelację pomiędzy gęstością naczyń krwionośnych CD31+ a gęstością naczyń limfatycznych D2-40+ jak i ekspresją podoplaniny w komórkach podścieliska
- Średnią ujemną korelację między gęstością naczyń limfatycznych a poziomem ekspresji białka Ki-67 w komórkach raka stercza
- Słabą ujemną korelację między poziomem ekspresji podoplaniny w komórkach podścieliska a gęstością naczyń krwionośnych CD34+

6. Dyskusja

Podoplanina (PDPN, D2-40) jest przezbłonową glikoproteiną typu-1, o masie cząsteczkowej od 36 do 43 kDa. Ulega ona ekspresji w większości dojrzałych tkanek oraz odgrywa istotną rolę w procesie embriogenezy, regulując prawidłowy rozwój serca, płuc i układu limfatycznego [103, 104 – 105]. Jest ona m.in. uznanym specyficznym markerem dla śródbłonka limfatycznego i procesu limfangiogenezy z uwagi na ekspresję w obrębie tego śródbłonka i brak występowania w obrębie śródbłonka naczyń krwionośnych [140]. Stanowi również marker CAFs (ang. cancer associated fibroblasts – fibroblasty związane z nowotworem), które dominują w podścielisku guza nowotworowego [167]. Udział tego białka w karcinogenezie nie jest do końca jasny, natomiast ekspresja podoplaniny występuje w wielu różnych typach nowotworów, m. in. takich jak: chrzęstniakomięsak, kostniakomięsak, naczyniakomięsak, międzybłoniaku, nowotworach germinalnych, gwiaździakach, glejakach oraz rakach płaskonabłonkowych różnego pochodzenia, w tym jamy ustnej, gardła, języka, skóry, przełyku oraz płuc [109, 111 – 112, 115 – 120]. Chociaż niektóre doniesienia sugerują, że ekspresja PDPN może być korzystnym czynnikiem prognostycznym w rakach szyjki macicy, gruczolakorakach jelita grubego, raku płaskonabłonkowym płuc [123 – 125], to zdecydowana większość danych klinicznych i eksperymentalnych wskazuje na ekspresję PDPN w guzach jako zły czynnik rokowania, szczególnie w rakach płaskonabłonkowych, nowotworach głowy i szyi, przełyku, skóry, raku gruczołu piersiowego, oraz glejaków [114, 122, 168 – 169]. W literaturze jest niewiele prac poświęconych związkowi podoplaniny z rakiem gruczołu krokowego. Badanie opisujące ekspresję podoplaniny w raku gruczołu krokowego, obejmujące niewielką grupę (10 przypadków) wykonał Kanner i wsp. [145]. W warunkach jego eksperymentu, pozytywna ekspresja PDPN była stwierdzona w cytoplazmie komórek podstawnych gruczołu krokowego niezmiennych nowotworowo gruczołów. Jednak marker D2-40 był nieobecny we wszystkich przypadkach komórek raka gruczołu krokowego [145]. W mojej pracy również wykazałem brak ekspresji podoplaniny w komórkach raka gruczołu krokowego, natomiast zaobserwowałem jej ekspresję w komórkach podścieliska. W Pracy Kitano i wsp. [142] ekspresję białka D2-40 stwierdzono w zrębie raka gruczołu

krokowego. W swojej publikacji autorzy ocenili ekspresję podoplaniny w różnych typach 14 najczęstszych nowotworów złośliwych w tym rakach gruczołu krokowego. Wyższa ekspresja podoplaniny w podścielisku korelowała z wielkością guza, obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, wyższą gęstością zarówno naczyń limfatycznych jak i naczyń krwionośnych. W mojej pracy również udowodniłem istotną statystycznie korelację ekspresji podoplaniny w komórkach podścieliska z gęstością naczyń chłonnych, wykazujących ekspresję podoplaniny. Kitano przebadał 1350 przypadków wszystkich 14 typów nowotworów, z czego 50 stanowiły raki gruczołu krokowego. W wynikach nie wyszczególniono grupy pacjentów wyłącznie z nowotworem gruczołu krokowego a pozytywną ekspresję PDPN w podścielisku stwierdzono w 26 % (8 z 31 przebadanych przypadkach). W swojej pracy wykazałem ekspresję w podścielisku w ponad 90% wszystkich badanych przypadków. Tak znaczna różnica mogła wynikać z zmodyfikowanej metody immunohistochemicznej z wykorzystaniem innych, bardziej specyficznych przeciwciał. Wykazałem także, istotnie niższą ekspresję podoplaniny w podścielisku w większych guzach, o wyższym stopniu złośliwości histologicznej wg skali Gleasona oraz w grupie z obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Wyniki te są odmienne od tych przedstawionych w pracy Kitano oraz licznych pracach badających poziom ekspresji PDPN w zrębie wielu innych nowotworów. W pracy Puły i wsp. [122] ekspresja podoplaniny w inwazyjnym przewodowym raku gruczołu piersiowego korelowała pozytywnie z wielkością guza, stopniem złośliwości, przerzutami do węzłów chłonnych, limfangioinwazją i ekspresją białka Ki-67. W mojej pracy podobnie jak u Puły ekspresję podoplaniny stwierdzono wyłącznie w CAFs i śróbłonku naczyń limfatycznych, jednakże ekspresja podoplaniny w podścielisku korelowała negatywnie z wielkością guza, stopniem złośliwości oraz obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Nie zaobserwowałem korelacji pomiędzy ekspresją PDPN w CAFs a ekspresją białka Ki-67 w raku stercza [122].

Inne wyniki uzyskał Yamanashi i wsp. [123] wykazując, że wzrost ekspresji podoplaniny w podścielisku korelował istotnie z bardziej obwodowym wzrostem guza, bardziej powierzchownym naciekaniem oraz dłuższym czasem przeżycia przypadków raka jelita grubego. Autorzy dowiedli też,

że ekspresja podoplaniny występuje w CAFs nowotworu okrężnicy, brak zaś jej ekspresji w komórkach raka i zdrowej tkance z marginesu guza – zarówno w nabłonku jak i podścielisku [123]. Podobne do moich rezultatów przedstawili Carvalho i wsp. [124] dowodząc, że ekspresja podoplaniny w raku szyjki macicy związana była istotnie z przypadkami wolnymi od przerzutów w węzłach chłonnych [124].

W mojej pracy oceniłem również ekspresji podoplaniny w komórkach śródbłonka w kontekście gęstości naczyń limfatycznych. W zdecydowanej większości prac, większa gęstość naczyń limfatycznych D2-40+ korelowała z krótszym czasem wolnym od progresji choroby, wyższym stopniem złośliwości komórkowej czy obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, w nowotworach gruczołu piersiowego, rakach płaskonabłonkowych płuc i szyjki macicy [170 – 172]. Moje badania wykazały, że wyższa gęstość naczyń limfatycznych D2-40+ występuje w przypadkach mniej zaawansowanych klinicznie, z guzami ograniczonymi do stercza, bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Natomiast gęstość naczyń D2-40+ koreluje ujemnie z stopniem złośliwości histologicznej oraz przedoperacyjnym stężeniem markera PSA w surowicy krwi. Wykazałem również, że gęstość naczyń D2-40+ w raku gruczołu krokowego, koreluje istotnie z dłuższym czasem wolnym od wznowy. Ambrosio i wsp. [173] wykazali, że w zrębie gruczolakoraków prostaty wraz z wzrostem złośliwości wg Gleasona, zmniejsza się pole powierzchni przekroju naczyń limfatycznych oznaczonych markerem D2-40. Natomiast gęstość naczyń limfatycznych w tkance okołogruczołowej, istotnie koreluje z stopniem zaawansowania klinicznego, dodatnim marginesem chirurgicznym, naciekiem na pęcherzyki nasienne oraz obecnością przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych komórek nowotworowych. Wykazali oni również istotny statystycznie związek większej gęstości naczyń limfatycznych z krótszym czasem wolnym od progresji choroby. Nie stwierdzili korelacji ani z wiekiem pacjentów ani z wartością stężenia PSA w surowicy przed leczeniem operacyjnym [173]. Rozbieżność wyników uzyskanych przez innych autorów z moimi rezultatami, może wynikać z zastosowania innej metody liczenia naczyń limfatycznych. Z kolei, w innej pracy Zeng i wsp. [174] badając gęstość naczyń chłonnych w tkankach gruczolakoraka prostaty, również znakowanych ekspresją podoplaniny, wykazali, że gęstość naczyń chłonnych w tkance przylegającej bezpośrednio do nowotworu koreluje

z skalą Gleasona, natomiast liczba naczyń chłonnych w tkankach raka nie zmienia się istotnie w zależności od stopnia złośliwości [174]. Interesujący wynik przedstawili Trojan i wsp. [175], badając gęstość naczyń limfatycznych gruczołu krokowego. W przypadkach raka stercza, gęstość naczyń limfatycznych była najniższa w guzie, w tkankach zlokalizowanych obwodowo względem guza wyższa, jeszcze wyższa w preparatach gruczołu krokowego niezmienionych chorobowo a najwyższa w przypadku łagodnego rozrostu gruczołu krokowego [175]. W przypadku naczyń krwionośnych, inni autorzy wykazali najwyższą ich gęstość (znakowanych ekspresją markera CD34) w raku gruczołu krokowego, a najniższą w łagodnym rozroście tego narządu [175]. Roma i wsp. [176] w swojej pracy analizę gęstości naczyń chłonnych, wykazujących ekspresję markera D2-40 podzielił na 3 kompartmenty. W centrum guza raka gruczołu krokowego gęstość naczyń limfatycznych była najniższa, wyższa natomiast okazała się w tkance okołoguzowej i w przypadkach wolnych od choroby nowotworowej. Autor ten wykazał, że gęstość naczyń limfatycznych w kompartmentcie poza guzem koreluje odwrotnie z skalą złośliwości Gleason [176]. W mojej pracy również wykazałem ujemną korelację gęstości naczyń limfatycznych (D2-40+) ze stopniem złośliwości histologicznej (wg Gleasona) w badanych przypadkach raka gruczołu krokowego, bez podziału na kompartmenty. Gęstość naczyń limfatycznych była zliczana w obrębie guza i przylegającym do niego podścielisku.

Angiogeneza odgrywa ważną rolę we wzroście, progresji i efektach leczenia nowotworu u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego. Zarówno nasilenie ekspresji markerów CD31 jak i CD34, u autorów wielu prac poświęconych badaniu neoangiogenezy w raku gruczołu krokowego, korelowało istotnie dodatnio z wielkością guza, stopniem złośliwości histologicznej wg Gleasona, przedoperacyjnym stężeniem markera PSA w surowicy krwi oraz krótszym czasem przeżycia wolnym od progresji choroby [160, 177 – 179]. Rezultaty te są zbieżne z uzyskanymi przeze mnie. Wykazałem m. in., że gęstość naczyń krwionośnych CD34+ korelowała dodatnio z obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych [177, 180]. Rezultaty powyższych prac pokazywały również istotną statystycznie dodatnią korelację obu markerów (CD31 i CD34) z przedoperacyjnym stężeniem PSA w surowicy krwi. Moje wyniki są zgodne z powyższymi, jednak w moich badaniach dodatnia korelacja

z markerem CD31 była istotna statystycznie, a dla markera CD34 wykazałem trend, bez istotnej statystycznie zależności.

Marker proliferacji Ki-67, podobnie jak markery angiogenezy CD31 i CD34, został dokładnie przebadany przez wielu autorów oceniających jego ekspresję w raku gruczołu krokowego [181 – 183]. W metaanalizie Berlina i wsp. [183] udowodnili, że zwiększony indeks proliferacji komórek guza Ki-67+ istotnie korelował z krótszym czasem wolnym od progresji choroby, czasem przeżycia specyficznym dla choroby oraz ogólnym przeżyciem [183]. Podobne wyniki uzyskałem w swojej analizie. Z kolei, Bettencourt i wsp. [182] wykazali również, że zwiększona ekspresja Ki-67 koreluje z stopniem złośliwości w skali Gleason, wielkością guza i obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych oraz przedoperacyjnym stężeniem markera PSA w surowicy krwi, co pokrywa się z wynikami mojej pracy. Jednakże, nie uzyskałem istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją Ki-67 a stężeniem przedoperacyjnym markera PSA w surowicy krwi oraz korelacji nasilenia ekspresji Ki-67 w guzach z obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych [182].

Przeprowadzone przeze mnie badanie jest, jedną z kilku prac oceniającą ekspresję podoplaniny w raku gruczołu krokowego [142, 145]. Eksperyment wyróżnia się spośród nich większą liczbą przebadanych przypadków. W swojej pracy dowiodłem wyższej ekspresji badanego PDPN w podścielisku, w mniej zaawansowanych klinicznie guzach, o mniejszej złośliwości (wg Gleasona). Dokonałem oceny i analizy uznanych markerów angiogenezy (CD 31 i CD34), limfangiogenezy (naczynia chłonne D2-40+) oraz proliferacji komórkowej (Ki-67). Rezultaty te z jednej strony wykazują ekspresję podoplaniny w tkance podścieliska raków stercza, a z drugiej są jednymi z niewielu, w dostępnym przeglądzie literatury, pokazującymi odwrotną korelację PDPN z agresywnością tego nowotworu [123, 124]. Stąd tak interesujący wynik nasilenia ekspresji D2-40 jako markera gęstości naczyń limfatycznych, który wykazał pozytywny związek większej gęstości naczyń limfatycznych w badanych przypadkach ze spadkiem agresywności guza, mniejszym stopniem zaawansowania klinicznego oraz niższym przedoperacyjnym stężeniem markera PSA w surowicy krwi. Pokazałem również korelację ekspresji podoplaniny w komórkach podścieliska z jej ekspresją jako markera naczyń

limfatycznych, a wyższa gęstość naczyń limfatycznych korelowała istotnie z czasem wolnym od progresji choroby, co może mieć znaczenie prognostyczne. Prawdopodobnie zwiększona gęstość naczyń limfatycznych (D2-40+) w przypadkach raka gruczołu krokowego bez przerzutów do węzłów chłonnych (N0) w stosunku do ww. nowotworu z przerzutami (N1) oraz dokładnie przeciwne rezultaty pokazujące gęstość naczyń naczyń krwionośnych (CD34+), mogą świadczyć o tym, że progresja w rakach stercza zachodzi głównie drogą naczyń krwionośnych, a nie limfatycznych oraz kluczowym procesem jest zjawisko angio- a nie limfangiogenezy. Odwrotna zależność między zaawansowaniem klinicznym choroby a ekspresją PDPN oraz limfangiogenezą może być ciekawym zagadnieniem wymagających dalszych badań na poszerzonym materiale, szczególnie pod względem wykorzystanych do przeprowadzenia eksperymentu przypadków raka gruczołu krokowego w różnych stadiach zaawansowania kliniczno – patologicznego.

7. Wnioski

1. Ekspresja podoplaniny w komórkach podścieliska, w rakach gruczołu krokowego nie ma znaczenia prognostycznego.
2. Zwiększona gęstość naczyń limfatycznych znakowanych ekspresją podoplaniny w rakach gruczołu krokowego może mieć korzystne znaczenie prognostyczne.
3. Wyższa gęstość naczyń limfatycznych znakowanych podoplaniną w przypadkach raka gruczołu krokowego bez przerzutów do węzłów chłonnych i odwrotna zależność w przypadkach naczyń krwionośnych może świadczyć o związku progresji tego nowotworu z procesem angiogenezy, a nie limfangiogenezy.

8. Streszczenie

Wstęp: Rak gruczołu krokowego jest jedną z najczęstszych chorób nowotworowych na świecie i najczęściej rozpoznawanym nowotworem złośliwym u mężczyzn w Polsce. Pomimo coraz szerszego wachlarza dostępnych badań zarówno diagnostyki obrazowej jak i molekularnej, stale poszerzającego się arsenału terapii systemowych, rozwoju techniki robotycznej, teleradioterapii, brachyterapii to rak gruczołu krokowego stanowił drugą, co do częstości przyczynę zgonu z powodu nowotworów. Poszukiwanie nowych markerów prognostycznych jak i celów terapeutycznych dla przyszłych terapii nowotworowych wydaje się zasadne. Podoplanina (PDPN) jest przezbłonową glikoproteiną typu-1, która uczestniczy w procesie karcinogenezy wielu nowotworów oraz jest uznanym markerem śródbłonna naczyń limfatycznych. Chociaż niektóre doniesienia sugerują, że ekspresja PDPN może być korzystnym czynnikiem prognostycznym w rakach szyjki macicy, jelita grubego, niektórych podtypach raka płuc, to dominująca ilość danych klinicznych i eksperymentalnych wskazuje ekspresję podoplaniny jako niepomyślny czynnik rokowania wielu nowotworów.

Cel pracy: Celem niniejszej pracy jest immunohistochemiczna ocena poziomu ekspresji podoplaniny w raku gruczołu krokowego a także skorelowanie jej z danymi kliniczno-patologicznymi.

Materiał i metody: Materiałem do przeprowadzenia badania stanowiły archiwalne bloczki parafinowe pochodzące od 96 pacjentów z rozpoznanym i potwierdzonym badaniem histopatologicznym rakiem gruczołu krokowego, po przeprowadzonej radykalnej prostatetkomii, w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu w latach 2011-2015. Uzyskane preparaty poddano badaniu z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej (IHC) celem oceny ekspresji: podoplaniny (PDPN), Ki-67 (marker proliferacji komórkowej), CD31 oraz CD 34 (markery naczyń krwionośnych, które pozwoliły na ocenę gęstości mikronaczyń). Ekspresję markerów skorelowano z danymi kliniczno-patologicznymi uzyskanymi w wyniku retrospektywnej obserwacji pacjentów.

Wyniki: W badaniu nie stwierdzono obecności PDPN w komórkach raka gruczołu krokowego. Pozytywną ekspresję IHC zarówno błonową jak i cytoplazmatyczną podoplaniny zaobserwowano w komórkach podścieliska raka gruczołu krokowego w 88% (84/96) oraz komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych 89% (85/96). Wysoki poziom ekspresji PDPN w komórkach podścieliska korelował ujemnie z wielkością guza i skalą Gleasona. Natomiast nasilenie ekspresji podoplaniny w komórkach śródbłonna naczyń limfatycznych wykazała istotnie statystycznie wyższą gęstość naczyń PDPN+ w guzach mniejszych, bez obecności przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, z niższym wynikiem skali Gleasona oraz niższym przedoperacyjnym stężeniem markera PSA w surowicy krwi. Wysoka gęstość naczyń PDPN+ była związana również z istotnym statystycznie dłuższym czasem wolnym od progresji choroby. Wykazano również ujemną korelację pomiędzy ekspresją podoplaniny w komórkach podścieliska raka a gęstością mikronaczyń ocenianą za pomocą CD31 oraz CD34 oraz ujemną korelację pomiędzy gęstością naczyń PDPN+ a ekspresją markera proliferacji Ki-67 w komórkach raka gruczołu krokowego. Ponadto analiza czasu przeżycia wolnego od progresji choroby wykazała, że większa gęstość naczyń krwionośnych oraz większa ekspresja Ki-67 koreluje z krótszym czasem wolnym od progresji choroby.

Wnioski: W oparciu o przeprowadzone badanie gęstość naczyń limfatycznych znakowanych ekspresją podoplaniny w rakach gruczołu krokowego może mieć korzystne znaczenie prognostyczne, a wyższa gęstość naczyń limfatycznych znakowanych podoplaniną w przypadkach raka gruczołu krokowego bez przerzutów do węzłów chłonnych i odwrotna zależność w przypadkach naczyń krwionośnych może świadczyć o związku progresji tego nowotworu z procesem angiogenezy, a nie limfangiogenezy.

9. Summary

Background: Prostate cancer is a prevalent malignancy worldwide and constitutes the most commonly diagnosed cancer among men in Poland. Despite the availability of various diagnostic tools, including imaging and molecular diagnostics, and advancements in treatment modalities such as robotic surgery, teleradiotherapy, and brachytherapy, prostate cancer remains the second leading cause of cancer-related mortality. Consequently, there is an urgent need to explore novel prognostic markers and therapeutic targets to improve future treatment strategies. Podoplanin (PDPN), a type-1 transmembrane glycoprotein implicated in carcinogenesis across various cancers, is of particular interest due to its established role as a marker for lymphatic vascular endothelium. While some studies suggest a potential favorable prognostic role for PDPN expression in certain cancers like cervix and colon carcinomas, as well as specific subtypes of lung cancer, a prevailing body of clinical and experimental evidence indicates that podoplanin expression generally portends an unfavorable prognosis in many malignancies.

Objective: The primary objective of this study is to analyze podoplanin expression levels in prostate cancer tissues using immunohistochemistry and correlate these findings with clinicopathological parameters.

Material and methods: Archival paraffin blocks from 96 patients with histopathologically confirmed prostate cancer, who underwent radical prostatectomy at the Provincial Specialized Hospital in Wroclaw between 2011 and 2015, were used for the study. Immunohistochemistry (IHC) was employed to evaluate podoplanin (PDPN) expression, along with Ki-67 (a marker of cell proliferation), and vascular markers CD31 and CD34 to assess microvessel density. The expression of these markers was then correlated with clinicopathological data obtained from retrospective patient follow-up.

Results: Podoplanin expression was not detected in prostate cancer cells; however, positive IHC expression of both membrane and cytoplasmic podoplanin was noted in lining cells of prostate cancer

(88% of cases) and lymphatic vessel endothelial cells (89% of cases). High podoplanin expression in lining cells correlated inversely with tumor size and Gleason score. Conversely, increased podoplanin expression in lymphatic vessel endothelial cells was associated with smaller tumors, absence of regional lymph node metastases, lower Gleason scores, and lower preoperative serum PSA levels. Furthermore, high podoplanin-labeled vessel density correlated with longer progression-free survival. Negative correlations were observed between podoplanin expression in cancer lining cells and microvessel density, as well as between podoplanin-labeled vessel density and Ki-67 expression in prostate cancer cells. Analysis of disease progression-free survival time indicated that higher vascular density and Ki-67 expression were associated with shorter time to disease progression.

Conclusions: This study suggests that podoplanin-labeled lymphatic vessel density in prostate cancer may hold favorable prognostic significance. The higher density of podoplanin-labeled lymphatic vessels in prostate cancer cases without lymph node metastasis, coupled with the inverse relationship observed in blood vessels, suggests that cancer progression may be more closely tied to angiogenesis rather than lymphangiogenesis.

10. Piśmiennictwo

- [1] WHO, „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems ICD-10: Instruction Manual”, *WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO nternational statistical classification of diseases and related health problems ICD-10: instruction manual*, t. 2, 2016.
- [2] H. Sung *i in.*, „Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries”, *CA Cancer J Clin*, t. 71, nr 3, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [3] J. Didkowska, U. Wojciechowska, I. Michałek, F. Caetano dos Santos, i P. Olasek, „Nowotwory Złośliwe W Polsce W 2019 Roku (Cancer in Poland in 2019).”, *Krajowy Rejestr Nowotworów*, 2021.
- [4] A. B. Jani, P. A. S. Johnstone, S. L. Liauw, V. A. Master, i O. W. Brawley, „Age and Grade Trends in Prostate Cancer (1974–2003)”, *Am J Clin Oncol*, t. 31, nr 4, 2008, doi: 10.1097/coc.0b013e3181637384.
- [5] G. P. Haas, N. Delongchamps, O. W. Brawley, C. Y. Wang, i G. de la Roza, „The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies.”, *Can J Urol*, t. 15, nr 1, 2008.
- [6] M. Randazzo *i in.*, „A positive family history as a risk factor for prostate cancer in a population-based study with organised prostate-specific antigen screening: Results of the Swiss European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC, Aarau)”, *BJU Int*, t. 117, nr 4, 2016, doi: 10.1111/bju.13310.
- [7] F. H. Schröder *i in.*, „The European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer – Prostate Cancer Mortality at 13 Years of Follow-up”, *Lancet*, t. 384, nr 9959, 2014.
- [8] K. Hemminki, „Familial risk and familial survival in prostate cancer”, *World Journal of Urology*, t. 30, nr 2. 2012. doi: 10.1007/s00345-011-0801-1.
- [9] J. L. Beebe-Dimmer, A. L. Kapron, A. M. Fraser, K. R. Smith, i K. A. Cooney, „Risk of prostate cancer associated with familial and hereditary cancer syndromes”, *Journal of Clinical Oncology*, t. 38, nr 16, 2020, doi: 10.1200/JCO.19.02808.
- [10] A. Tsodikov *i in.*, „Is prostate cancer different in black men? Answers from 3 natural history models”, *Cancer*, t. 123, nr 12, 2017, doi: 10.1002/cncr.30687.
- [11] Y. A. Nyame *i in.*, „Deconstructing, Addressing, and Eliminating Racial and Ethnic Inequities in Prostate Cancer Care”, *European Urology*, t. 82, nr 4. 2022. doi: 10.1016/j.eururo.2022.03.007.
- [12] N. Breslow *i in.*, „Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas”, *Int J Cancer*, t. 20, nr 5, 1977.
- [13] A. A. Al Olama *i in.*, „Multiple novel prostate cancer susceptibility signals identified by fine-mapping of known risk loci among Europeans”, *Hum Mol Genet*, t. 24, nr 19, 2015, doi: 10.1093/hmg/ddv203.
- [14] F. R. Schumacher *i in.*, „Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci”, *Nat Genet*, t. 50, nr 7, 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0142-8.

- [15] V. N. Giri *i in.*, „Germline genetic testing for inherited prostate cancer in practice: Implications for genetic testing, precision therapy, and cascade testing”, *Prostate*, t. 79, nr 4, 2019, doi: 10.1002/pros.23739.
- [16] T. Nyberg *i in.*, „Prostate Cancer Risks for Male BRCA1[Formula presented] and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study”, *Eur Urol*, t. 77, nr 1, 2020, doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.025.
- [17] A. Blanc-Lapierre, A. Spence, P. I. Karakiewicz, A. Aprikian, F. Saad, i M. É. Parent, „Metabolic syndrome and prostate cancer risk in a population-based case-control study in Montreal, Canada Chronic Disease epidemiology”, *BMC Public Health*, t. 15, nr 1, 2015, doi: 10.1186/s12889-015-2260-x.
- [18] A. C. Vidal, L. E. Howard, D. M. Moreira, R. Castro-Santamaria, G. L. Andriole, i S. J. Freedland, „Obesity increases the risk for high-grade prostate cancer: Results from the REDUCE study”, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, t. 23, nr 12, 2014, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0795.
- [19] B. A. Dickerman, S. C. Markt, M. Koskenvuo, E. Pukkala, L. A. Mucci, i J. Kaprio, „Alcohol intake, drinking patterns, and prostate cancer risk and mortality: a 30-year prospective cohort study of Finnish twins”, *Cancer Causes and Control*, t. 27, nr 9, 2016, doi: 10.1007/s10552-016-0778-6.
- [20] A. R. Kristal *i in.*, „Plasma vitamin D and prostate cancer risk: Results from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial”, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, t. 23, nr 8, 2014, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0115.
- [21] Z. Cui, D. Liu, C. Liu, i G. Liu, „Serum selenium levels and prostate cancer risk”, *Medicine (United States)*, t. 96, nr 5, 2017, doi: 10.1097/MD.0000000000005944.
- [22] X. Chen, Y. Zhao, Z. Tao, i K. Wang, „Coffee consumption and risk of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis”, *BMJ Open*, t. 11, nr 2. 2021. doi: 10.1136/bmjopen-2020-038902.
- [23] M. Zhang, K. Wang, L. Chen, B. Yin, i Y. Song, „Is phytoestrogen intake associated with decreased risk of prostate cancer? A systematic review of epidemiological studies based on 17,546 cases”, *Andrology*, t. 4, nr 4, 2016, doi: 10.1111/andr.12196.
- [24] X. Hu, Y. H. Wang, Z. Q. Yang, Y. X. Shao, W. X. Yang, i X. Li, „Association of 5-alpha-reductase inhibitor and prostate cancer incidence and mortality: A meta-analysis”, *Transl Androl Urol*, t. 9, nr 6, 2020, doi: 10.21037/tau-20-843.
- [25] J. A. Burns *i in.*, „Inflammatory Bowel Disease and the Risk of Prostate Cancer”, *Eur Urol*, t. 75, nr 5, 2019, doi: 10.1016/j.eururo.2018.11.039.
- [26] C. K. Zhou, P. H. Levine, S. D. Cleary, H. J. Hoffman, B. I. Graubard, i M. B. Cook, „Male pattern baldness in relation to prostate cancer-specific mortality: A prospective analysis in the NHANES I epidemiologic follow-up study”, *Am J Epidemiol*, t. 183, nr 3, 2016, doi: 10.1093/aje/kwv190.
- [27] W. Q. Lian, F. Luo, X. L. Song, Y. J. Lu, i S. C. Zhao, „Gonorrhoea and prostate cancer incidence: An updated meta-analysis of 21 epidemiologic studies”, *Medical Science Monitor*, t. 21, 2015, doi: 10.12659/MSM.893579.
- [28] D. Rao, H. Yu, Y. Bai, X. Zheng, i L. Xie, „Does night-shift work increase the risk of prostate cancer? A systematic review and meta-analysis”, *Onco Targets Ther*, t. 8, 2015, doi: 10.2147/OTT.S89769.

- [29] F. Islami, D. M. Moreira, P. Boffetta, i S. J. Freedland, „A systematic review and meta-analysis of tobacco use and prostate cancer mortality and incidence in prospective cohort studies”, *European Urology*, t. 66, nr 6, 2014. doi: 10.1016/j.eururo.2014.08.059.
- [30] S. Ju-Kun *i in.*, „Association between Cd Exposure and Risk of Prostate Cancer”, *Medicine (United States)*, t. 95, nr 6, 2016, doi: 10.1097/MD.0000000000002708.
- [31] G. I. Russo, A. E. Calogero, R. A. Condorelli, G. Scalia, G. Morgia, i S. La Vignera, „Human papillomavirus and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis”, *Aging Male*, t. 23, nr 2, 2020. doi: 10.1080/13685538.2018.1455178.
- [32] L. Multigner *i in.*, „Chlordecone exposure and risk of prostate cancer”, *Journal of Clinical Oncology*, t. 28, nr 21, 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.27.2153.
- [33] S. W. Lin *i in.*, „Prospective study of ultraviolet radiation exposure and risk of cancer in the United States”, *Int J Cancer*, t. 131, nr 6, 2012, doi: 10.1002/ijc.27619.
- [34] N. Pabalan, E. Singian, H. Jarjanazi, i A. Paganini-Hill, „Association of male circumcision with risk of prostate cancer: A meta-analysis”, *Prostate Cancer Prostatic Dis*, t. 18, nr 4, 2015, doi: 10.1038/pcan.2015.34.
- [35] J. R. Rider, K. M. Wilson, J. A. Sinnott, R. S. Kelly, L. A. Mucci, i E. L. Giovannucci, „Ejaculation Frequency and Risk of Prostate Cancer: Updated Results with an Additional Decade of Follow-up”, *Eur Urol*, t. 70, nr 6, 2016, doi: 10.1016/j.eururo.2016.03.027.
- [36] T. A. Stamey, N. Yang, A. R. Hay, J. E. McNeal, F. S. Freiha, i E. Redwine, „Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate”, *New England Journal of Medicine*, t. 317, nr 15, 1987, doi: 10.1056/nejm198710083171501.
- [37] S. Carlsson *i in.*, „Screening for Prostate Cancer Starting at Age 50–54 Years. A Population-based Cohort Study”, *Eur Urol*, t. 71, nr 1, 2017, doi: 10.1016/j.eururo.2016.03.026.
- [38] F. Albright *i in.*, „Prostate cancer risk prediction based on complete prostate cancer family history”, *Prostate*, t. 75, nr 4, 2015, doi: 10.1002/pros.22925.
- [39] F. Kamangar, G. M. Dores, i W. F. Anderson, „Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world”, *Journal of Clinical Oncology*, t. 24, nr 14, 2006. doi: 10.1200/JCO.2005.05.2308.
- [40] G. Chornokur, K. Dalton, M. E. Borysova, i N. B. Kumar, „Disparities at presentation, diagnosis, treatment, and survival in African American men, affected by prostate cancer”, *Prostate*, t. 71, nr 9, 2011, doi: 10.1002/pros.21314.
- [41] A. CHRISTENSSON, C. -B LAURELL, i H. LILJA, „Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors”, *Eur J Biochem*, t. 194, nr 3, 1990, doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19466.x.
- [42] F. Tarhan, K. Demir, A. Orçun, i O. C. Madenci, „Effect of ejaculation on serum prostate-specific antigen concentration”, *International Braz J Urol*, t. 42, nr 3, 2016, doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2015.0116.

- [43] H. A. Guess, J. F. Heyse, i G. J. Gormley, „The effect of finasteride on prostate-specific antigen in men with benign prostatic hyperplasia”, *Prostate*, t. 22, nr 1, 1993, doi: 10.1002/pros.2990220105.
- [44] H. B. Carter, J. D. Pearson, E. J. Metter, L. J. Brant, i J. L. Fozard, „Longitudinal Evaluation of Prostate-Specific Antigen Levels in Men With and Without Prostate Disease”, *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, t. 267, nr 16, 1992, doi: 10.1001/jama.1992.03480160073037.
- [45] N. Omri *i in.*, „Association between PSA density and pathologically significant prostate cancer: The impact of prostate volume”, *Prostate*, t. 80, nr 16, 2020, doi: 10.1002/pros.24078.
- [46] H. -P Schmid, J. E. McNeal, i T. A. Stamey, „Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume”, *Cancer*, t. 71, nr 6, 1993, doi: 10.1002/1097-0142(19930315)71:6<2031::AID-CNCR2820710618>3.0.CO;2-Q.
- [47] S. Carlsson *i in.*, „Predictive value of four kallikrein markers for pathologically insignificant compared with aggressive prostate cancer in radical prostatectomy specimens: Results from the European randomized study of screening for prostate cancer section Rotterdam”, *Eur Urol*, t. 64, nr 5, 2013, doi: 10.1016/j.eururo.2013.04.040.
- [48] M. P. M. Q. Van Gils *i in.*, „The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance”, *Clinical Cancer Research*, t. 13, nr 3, 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2679.
- [49] J. A. Schalken, D. Hessels, i G. Verhaegh, „New targets for therapy in prostate cancer: Differential display code 3 (DD3PCA3), a highly prostate cancer-specific gene”, *Urology*, t. 62, nr 5 SUPPL. 1, 2003, doi: 10.1016/S0090-4295(03)00759-3.
- [50] B. Laxman *i in.*, „Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer.”, *Neoplasia*, t. 8, nr 10, 2006, doi: 10.1593/neo.06625.
- [51] J. P. Richie *i in.*, „Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination”, *Urology*, t. 42, nr 4, s. 365–374, 1993, doi: 10.1016/0090-4295(93)90359-I.
- [52] C. Gosselaar, M. J. Roobol, S. Roemeling, i F. H. Schröder, „The Role of the Digital Rectal Examination in Subsequent Screening Visits in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC), Rotterdam”, *Eur Urol*, t. 54, nr 3, 2008, doi: 10.1016/j.eururo.2008.03.104.
- [53] O. T. Okotie, K. A. Roehl, M. Han, S. Loeb, S. N. Gashti, i W. J. Catalona, „Characteristics of Prostate Cancer Detected by Digital Rectal Examination Only”, *Urology*, t. 70, nr 6, 2007, doi: 10.1016/j.urology.2007.07.019.
- [54] W. C. Bierley JD, Gospodarowicz MK, „TNM classification of malignant tumours. 8th ed: Wiley, 2017”, *Wiley*, 2017.
- [55] M. Smeenge *i in.*, „Role of transrectal ultrasonography (TRUS) in focal therapy of prostate cancer: report from a Consensus Panel”, *BJU Int*, t. 110, nr 7, s. 942–948, paź. 2012, doi: 10.1111/J.1464-410X.2012.11072.X.

- [56] F. Bratan *i in.*, „Influence of imaging and histological factors on prostate cancer detection and localisation on multiparametric MRI: a prospective study”, *Eur Radiol*, t. 23, nr 7, s. 2019–2029, lip. 2013, doi: 10.1007/S00330-013-2795-0.
- [57] M. van der Leest *i in.*, „Head-to-head Comparison of Transrectal Ultrasound-guided Prostate Biopsy Versus Multiparametric Prostate Resonance Imaging with Subsequent Magnetic Resonance-guided Biopsy in Biopsy-naïve Men with Elevated Prostate-specific Antigen: A Large Prospective Multicenter Clinical Study(Figure presented.)”, *Eur Urol*, t. 75, nr 4, 2019, doi: 10.1016/j.eururo.2018.11.023.
- [58] D. He *i in.*, „MRI-based radiomics models to assess prostate cancer, extracapsular extension and positive surgical margins”, *Cancer Imaging*, t. 21, nr 1, 2021, doi: 10.1186/s40644-021-00414-6.
- [59] N. Mottet *i in.*, *EAU - EANM - ESTRO - ESUR - SIOG: Guidelines on Prostate Cancer*. 2020.
- [60] I. M. Thompson *i in.*, „Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter”, *New England Journal of Medicine*, t. 350, nr 22, 2004, doi: 10.1056/nejmoa031918.
- [61] C. C. Guo i J. I. Epstein, „Intraductal carcinoma of the prostate on needle biopsy: Histologic features and clinical significance”, *Mod Pathol*, t. 19, nr 12, s. 1528–1535, grudz. 2006, doi: 10.1038/MODPATHOL.3800702.
- [62] A. M. Hövels *i in.*, „The diagnostic accuracy of CT and MRI in the staging of pelvic lymph nodes in patients with prostate cancer: a meta-analysis”, *Clin Radiol*, t. 63, nr 4, s. 387–395, kwi. 2008, doi: 10.1016/J.CRAD.2007.05.022.
- [63] L. Van Den Bergh *i in.*, „Final analysis of a prospective trial on functional imaging for nodal staging in patients with prostate cancer at high risk for lymph node involvement”, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, t. 33, nr 3, 2015, doi: 10.1016/j.urolonc.2014.11.008.
- [64] L. W. M. Van Kalmthout *i in.*, „Prospective Validation of Gallium-68 Prostate Specific Membrane Antigen-Positron Emission Tomography/Computerized Tomography for Primary Staging of Prostate Cancer”, *Journal of Urology*, t. 203, nr 3, 2020, doi: 10.1097/JU.0000000000000531.
- [65] A. Briganti *i in.*, „Updated nomogram predicting lymph node invasion in patients with prostate cancer undergoing extended pelvic lymph node dissection: the essential importance of percentage of positive cores”, *Eur Urol*, t. 61, nr 3, s. 480–487, mar. 2012, doi: 10.1016/J.EURURO.2011.10.044.
- [66] S. Cimino *i in.*, „Comparison between Briganti, Partin and MSKCC tools in predicting positive lymph nodes in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis”, *Scand J Urol*, t. 51, nr 5, s. 345–350, wrz. 2017, doi: 10.1080/21681805.2017.1332680.
- [67] G. Gandaglia *i in.*, „Development and Internal Validation of a Novel Model to Identify the Candidates for Extended Pelvic Lymph Node Dissection in Prostate Cancer”, *Eur Urol*, t. 72, nr 4, s. 632–640, paź. 2017, doi: 10.1016/J.EURURO.2017.03.049.
- [68] F. Ceci *i in.*, „E-PSMA: the EANM standardized reporting guidelines v1.0 for PSMA-PET”, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, t. 48, nr 5, s. 1626–1638, maj 2021, doi: 10.1007/S00259-021-05245-Y.
- [69] D. F. Gleason, „Classification of prostatic carcinomas.”, *Cancer chemotherapy reports. Part 1*, t. 50, nr 3, 1966.

- [70] G. J. L. H. Van Leenders *i in.*, „The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma”, *American Journal of Surgical Pathology*, t. 44, nr 8, 2020, doi: 10.1097/PAS.0000000000001497.
- [71] J. I. Epstein, L. Egevad, M. B. Amin, B. Delahunt, J. R. Srigley, i P. A. Humphrey, „The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System”, *Am J Surg Pathol*, t. 40, nr 2, s. 244–252, 2016, doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
- [72] J. I. Epstein *i in.*, „The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma”, *Am J Surg Pathol*, t. 29, nr 9, s. 1228–1242, 2005, doi: 10.1097/01.PAS.0000173646.99337.B1.
- [73] G. Shen, H. Deng, S. Hu, i Z. Jia, „Comparison of choline-PET/CT, MRI, SPECT, and bone scintigraphy in the diagnosis of bone metastases in patients with prostate cancer: a meta-analysis”, *Skeletal Radiology*, t. 43, nr 11. 2014. doi: 10.1007/s00256-014-1903-9.
- [74] H. B. Carter, P. C. Walsh, P. Landis, i J. I. Epstein, „Expectant management of nonpalpable prostate cancer with curative intent: Preliminary results”, *Journal of Urology*, t. 167, nr 3, 2002, doi: 10.1016/S0022-5347(05)65271-8.
- [75] M. Peters, J. R. N. van der Voort van Zyp, i H. M. Verkooijen, „Reply to: 10-year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for localized prostate cancer. Hamdy et al. NEJM October 2016”, *World Journal of Urology*, t. 35, nr 9. 2017. doi: 10.1007/s00345-017-2015-7.
- [76] P. C. Albertsen, D. F. Moore, W. Shih, Y. Lin, H. Li, i G. L. Lu-Yao, „Impact of comorbidity on survival among men with localized prostate cancer”, *Journal of Clinical Oncology*, t. 29, nr 10, 2011, doi: 10.1200/JCO.2010.31.2330.
- [77] „Erratum: Robot-assisted laparoscopic prostatectomy versus open radical retropubic prostatectomy: early outcomes from a randomised controlled phase 3 study (The Lancet (2016) 388(10049) (1057–1066) (S014067361630592X) (10.1016/S0140-6736(16)30592-X))”, *The Lancet*, t. 389, nr 10077. 2017. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30903-0.
- [78] I. Y. Kim *i in.*, „Detailed analysis of patients with metastasis to the prostatic anterior fat pad lymph nodes: a multi-institutional study”, *J Urol*, t. 190, nr 2, s. 527–534, sie. 2013, doi: 10.1016/J.JURO.2013.02.073.
- [79] W. C. Weng *i in.*, „Impact of prostatic anterior fat pads with lymph node staging in prostate cancer”, *J Cancer*, t. 9, nr 18, s. 3361–3365, 2018, doi: 10.7150/JCA.25554.
- [80] R. White *i in.*, „Hypofractionated radiotherapy for localized prostate cancer using three-dimensional conformal radiotherapy technique: 3 years toxicity analysis”, w *Indian Journal of Cancer*, 2015. doi: 10.4103/0019-509X.178409.
- [81] M. V. Pilepich *i in.*, „Androgen suppression adjuvant to definitive radiotherapy in prostate carcinoma - Long-term results of phase III RTOG 85-31”, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, t. 23, nr 6. 2005. doi: 10.1016/j.urolonc.2005.08.015.

- [82] O. Matzinger *i in.*, „Acute toxicity of curative radiotherapy for intermediate- and high-risk localised prostate cancer in the EORTC trial 22991”, *Eur J Cancer*, t. 45, nr 16, 2009, doi: 10.1016/j.ejca.2009.07.009.
- [83] V. Pagliarulo *i in.*, „Contemporary role of androgen deprivation therapy for prostate cancer”, *European Urology*, t. 61, nr 1. 2012. doi: 10.1016/j.eururo.2011.08.026.
- [84] J. Morote, J. Planas, C. Salvador, C. X. Raventós, R. Catalán, i J. Reventós, „Individual variations of serum testosterone in patients with prostate cancer receiving androgen deprivation therapy”, *BJU Int*, t. 103, nr 3, s. 332–335, luty 2009, doi: 10.1111/J.1464-410X.2008.08062.X.
- [85] M. G. Oefelein, A. Feng, M. J. Scolieri, D. Ricchiutti, i M. I. Resnick, „Reassessment of the definition of castrate levels of testosterone: implications for clinical decision making”, *Urology*, t. 56, nr 6, s. 1021–1024, 2000, doi: 10.1016/S0090-4295(00)00793-7.
- [86] A. D. Desmond, A. J. Arnold, I K. J. Hastie, „Subcapsular Orchiectomy under Local Anaesthesia Technique, Results and Implications”, *Br J Urol*, t. 61, nr 2, 1988, doi: 10.1111/j.1464-410X.1988.tb05063.x.
- [87] L. Klotz *i in.*, „The efficacy and safety of degarelix: a 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer”, *BJU Int*, t. 102, nr 11, s. 1531–1538, grudz. 2008, doi: 10.1111/J.1464-410X.2008.08183.X.
- [88] Y. Krakowsky i A. Morgentaler, „Risk of Testosterone Flare in the Era of the Saturation Model: One More Historical Myth”, *European Urology Focus*, t. 5, nr 1. 2019. doi: 10.1016/j.euf.2017.06.008.
- [89] M. Abufaraj *i in.*, „Differential Impact of Gonadotropin-releasing Hormone Antagonist Versus Agonist on Clinical Safety and Oncologic Outcomes on Patients with Metastatic Prostate Cancer: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials”, *European Urology*, t. 79, nr 1. 2021. doi: 10.1016/j.eururo.2020.06.002.
- [90] L. E. F. Moffat, „Comparison of Zoladex, diethylstilbestrol and cyproterone acetate treatment in advanced prostate cancer”, w *European Urology*, 1990. doi: 10.1159/000463975.
- [91] F. H. Schröder *i in.*, „Metastatic prostate cancer treated by Flutamide versus Cyproterone acetate: Final analysis of the «European Organization for Research and Treatment of Cancer» (EORTC) protocol 30892”, *Eur Urol*, t. 45, nr 4, 2004, doi: 10.1016/j.eururo.2003.11.016.
- [92] P. Iversen, „Antiandrogen monotherapy: Indications and results”, *Urology*, t. 60, nr 3 SUPPL. 1, 2002, doi: 10.1016/S0090-4295(02)01576-5.
- [93] M. R. Smith, M. Goode, A. L. Zietman, F. J. McGovern, H. Lee, i J. S. Finkelstein, „Bicalutamide monotherapy versus leuprolide monotherapy for prostate cancer: Effects on bone mineral density and body composition”, *Journal of Clinical Oncology*, t. 22, nr 13, 2004, doi: 10.1200/JCO.2004.01.174.
- [94] C. J. Ryan *i in.*, „Abiraterone in Metastatic Prostate Cancer without Previous Chemotherapy”, *New England Journal of Medicine*, t. 368, nr 2, 2013, doi: 10.1056/nejmoa1209096.

- [95] A. M. Moilanen *i in.*, „Discovery of ODM-201, a new-generation androgen receptor inhibitor targeting resistance mechanisms to androgen signaling-directed prostate cancer therapies”, *Sci Rep*, t. 5, lip. 2015, doi: 10.1038/SREP12007.
- [96] C. Parker *i in.*, „Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer”, *New England Journal of Medicine*, t. 369, nr 3, 2013, doi: 10.1056/nejmoa1213755.
- [97] L. Emmett, K. Willowson, J. Violet, J. Shin, A. Blanksby, i J. Lee, „Lutetium 177 PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy”, *Journal of Medical Radiation Sciences*, t. 64, nr 1. 2017. doi: 10.1002/jmrs.227.
- [98] C. Gratzke *i in.*, „KEYNOTE-991: pembrolizumab plus enzalutamide and androgen deprivation for metastatic hormone-sensitive prostate cancer”, *Future Oncology*, t. 18, nr 37. 2022. doi: 10.2217/fon-2022-0776.
- [99] N. Clarke *i in.*, „Olaparib combined with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial”, *Lancet Oncol*, t. 19, nr 7, 2018, doi: 10.1016/S1470-2045(18)30365-6.
- [100] S. Guillaumier *i in.*, „A Multicentre Study of 5-year Outcomes Following Focal Therapy in Treating Clinically Significant Nonmetastatic Prostate Cancer”, *Eur Urol*, t. 74, nr 4, 2018, doi: 10.1016/j.eururo.2018.06.006.
- [101] G. Zimmer *i in.*, „Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium”, *Biochemical Journal*, t. 341, nr 2, 1999, doi: 10.1042/0264-6021:3410277.
- [102] S. Breiteneder-Geleff *i in.*, „Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis”, *American Journal of Pathology*, t. 151, nr 4, 1997.
- [103] J. Renart *i in.*, „New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition”, *Int Rev Cell Mol Biol*, t. 317, s. 185–239, 2015, doi: 10.1016/BS.IRCMB.2015.01.009.
- [104] J. L. Astarita, S. E. Acton, i S. J. Turley, „Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer”, *Front Immunol*, t. 3, nr SEP, 2012, doi: 10.3389/FIMMU.2012.00283.
- [105] H. Krishnan *i in.*, „Podoplanin: An emerging cancer biomarker and therapeutic target”, *Cancer Sci*, t. 109, nr 5, s. 1292, maj 2018, doi: 10.1111/CAS.13580.
- [106] A. Farr, A. Nelson, i S. Hosier, „Characterization of an antigenic determinant preferentially expressed by type I epithelial cells in the murine thymus”, *J Histochem Cytochem*, t. 40, nr 5, s. 651–664, 1992, doi: 10.1177/40.5.1374092.
- [107] S. Breiteneder-Geleff *i in.*, „Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis.”, *Am J Pathol*, t. 151, nr 4, s. 1141, paź. 1997, Dostęp: 15 luty 2023. [Online]. Dostępne na: /pmc/articles/PMC1858024/?report=abstract
- [108] Y. Kato *i in.*, „Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2”, *Cancer Sci*, t. 99, nr 1, 2008, doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00634.x.

- [109] V. Schacht, S. S. Dadras, L. A. Johnson, D. G. Jackson, Y. K. Hong, i M. Detmar, „Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors”, *American Journal of Pathology*, t. 166, nr 3, 2005, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62311-5.
- [110] M. K. Kaneko, Y. Kato, T. Kitano, i M. Osawa, „Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor”, *Gene*, t. 378, nr 1–2, 2006, doi: 10.1016/j.gene.2006.04.023.
- [111] E. Martín-Villar *i in.*, „Characterization of human PA2.26 antigen (T1 α -2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas”, *Int J Cancer*, t. 113, nr 6, 2005, doi: 10.1002/ijc.20656.
- [112] A. Kunita *i in.*, „The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis”, *American Journal of Pathology*, t. 170, nr 4, 2007, doi: 10.2353/ajpath.2007.060790.
- [113] S. Yonemura *i in.*, „Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2”, *Journal of Cell Biology*, t. 140, nr 4, 1998, doi: 10.1083/jcb.140.4.885.
- [114] M. Ugorski, P. Dziegiel, i J. Suchanski, „Podoplanin - a small glycoprotein with many faces”, *American Journal of Cancer Research*, t. 6, nr 2. 2016.
- [115] J. L. Astarita, S. E. Acton, i S. J. Turley, „Podoplanin: Emerging functions in development, the immune system, and cancer”, *Frontiers in Immunology*, t. 3, nr SEP. 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00283.
- [116] P. Yuan *i in.*, „Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome”, *Cancer*, t. 107, nr 3, 2006, doi: 10.1002/cncr.22061.
- [117] S. Breiteneder-Geleff *i in.*, „Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: Podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium”, *American Journal of Pathology*, t. 154, nr 2, 1999, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65285-6.
- [118] K. Mishima, Y. Kato, M. K. Kaneko, R. Nishikawa, T. Hirose, i M. Matsutani, „Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression”, *Acta Neuropathol*, t. 111, nr 5, 2006, doi: 10.1007/s00401-006-0063-y.
- [119] H. Yu, J. A. Gibson, G. S. Pinkus, i J. L. Hornick, „Podoplanin (D2-40) is a novel marker for follicular dendritic cell tumors”, *Am J Clin Pathol*, t. 128, nr 5, 2007, doi: 10.1309/7P8U659JBVCV6EEU.
- [120] N. G. Ordóñez, „D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma”, *Hum Pathol*, t. 36, nr 4, 2005, doi: 10.1016/j.humpath.2005.01.019.
- [121] J. Renart *i in.*, „New Insights into the Role of Podoplanin in Epithelial-Mesenchymal Transition”, *Int Rev Cell Mol Biol*, t. 317, 2015, doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.01.009.
- [122] B. Pula *i in.*, „Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts predicts poor outcome in invasive ductal breast carcinoma”, *Histopathology*, t. 59, nr 6, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04060.x.

- [123] T. Yamanashi *i in.*, „Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma”, *Oncology*, t. 77, nr 1, 2009, doi: 10.1159/000226112.
- [124] F. M. Carvalho, F. L. Zaganelli, B. G. L. Almeida, J. C. S. Goes, E. C. Baracat, i J. P. Carvalho, „Prognostic value of podoplanin expression in intratumoral stroma and neoplastic cells of uterine cervical carcinomas”, *Clinics*, t. 65, nr 12, 2010, doi: 10.1590/S1807-59322010001200009.
- [125] T. Ito *i in.*, „Low podoplanin expression of tumor cells predicts poor prognosis in pathological stage IB squamous cell carcinoma of the lung, tissue microarray analysis of 136 patients using 24 antibodies”, *Lung Cancer*, t. 63, nr 3, 2009, doi: 10.1016/j.lungcan.2008.06.008.
- [126] K. Suzuki-Inoue *i in.*, „Involvement of Src kinases and PLC γ 2 in clot retraction”, *Thromb Res*, t. 120, nr 2, 2007, doi: 10.1016/j.thromres.2006.09.003.
- [127] K. L. Lowe, L. Navarro-Nunez, i S. P. Watson, „PL-06 platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis”, w *Thrombosis Research*, 2012. doi: 10.1016/S0049-3848(12)70013-0.
- [128] Y. Nakazawa *i in.*, „Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis”, *Blood*, t. 112, nr 5, 2008, doi: 10.1182/blood-2007-11-124693.
- [129] P. Carrasco-Ramírez *i in.*, „Podoplanin is a component of extracellular vesicles that reprograms cell-derived exosomal proteins and modulates lymphatic vessel formation”, *Oncotarget*, t. 7, nr 13, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7445.
- [130] G. Raposo i W. Stoorvogel, „Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends”, *Journal of Cell Biology*, t. 200, nr 4. 2013. doi: 10.1083/jcb.201211138.
- [131] M. Colombo, G. Raposo, i C. Théry, „Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles”, *Annual review of cell and developmental biology*, t. 30. 2014. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- [132] D. Hoshino *i in.*, „Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior”, *Cell Rep*, t. 5, nr 5, 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.050.
- [133] E. Martín-Villar *i in.*, „Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability”, *Oncogene*, t. 34, nr 34, 2015, doi: 10.1038/onc.2014.388.
- [134] G. R. Screaton, M. V. Bell, D. G. Jackson, F. B. Cornelis, U. Gerth, i J. I. Bell, „Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 89, nr 24, 1992, doi: 10.1073/pnas.89.24.12160.
- [135] R. Marhaba i M. Zöller, „CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation”, *Journal of Molecular Histology*, t. 35, nr 3. 2004. doi: 10.1023/B:HIJO.0000032354.94213.69.
- [136] E. Martín-Villar *i in.*, „Podoplanin associates with cd44 to promote directional cell migration”, *Mol Biol Cell*, t. 21, nr 24, 2010, doi: 10.1091/mbc.E10-06-0489.
- [137] S. A. Stacker, S. P. Williams, T. Karnezis, R. Shayan, S. B. Fox, i M. G. Achen, „Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer”, *Nature Reviews Cancer*, t. 14, nr 3. 2014. doi: 10.1038/nrc3677.

- [138] A. Alitalo i M. Detmar, „Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression”, *Oncogene*, t. 31, nr 42. 2012. doi: 10.1038/onc.2011.602.
- [139] S. Breiteneder-Geleff *i in.*, „Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries”, *Am J Pathol*, t. 154, nr 2, 1999, doi: 10.1016/s0002-9440(10)65285-6.
- [140] V. Schacht *i in.*, „T1 α /podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema”, *EMBO Journal*, t. 22, nr 14, 2003, doi: 10.1093/emboj/cdg342.
- [141] L. N. Cueni *i in.*, „Podoplanin-Fc reduces lymphatic vessel formation in vitro and in vivo and causes disseminated intravascular coagulation when transgenically expressed in the skin”, *Blood*, t. 116, nr 20, 2010, doi: 10.1182/blood-2010-04-278564.
- [142] H. Kitano *i in.*, „Podoplanin expression in cancerous stroma induces lymphangiogenesis and predicts lymphatic spread and patient survival”, *Arch Pathol Lab Med*, t. 134, nr 10, 2010, doi: 10.5858/2009-0114-oa.1.
- [143] B. Pula, W. Witkiewicz, P. Dziegiel, i M. Podhorska-Okolow, „Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts: A comprehensive review”, *International Journal of Oncology*, t. 42, nr 6. 2013. doi: 10.3892/ijo.2013.1887.
- [144] H. Fu, H. Yang, X. Zhang, i W. Xu, „The emerging roles of exosomes in tumor–stroma interaction”, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, t. 142, nr 9. 2016. doi: 10.1007/s00432-016-2145-0.
- [145] W. A. Kanner, M. T. Galgano, i K. A. Atkins, „Podoplanin expression in basal and myoepithelial cells: Utility and potential pitfalls”, *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, t. 18, nr 3, 2010, doi: 10.1097/PAI.0b013e3181c65141.
- [146] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H. H. Wacker, U. Schwab, i H. Stein, „Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.”, *The Journal of Immunology*, t. 133, nr 4, 1984, doi: 10.4049/jimmunol.133.4.1710.
- [147] G. Cattoretti *i in.*, „Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections”, *J Pathol*, t. 168, nr 4, 1992, doi: 10.1002/path.1711680404.
- [148] M. E. Harper *i in.*, „Pathological and clinical associations of Ki-67 defined growth fractions in human prostatic carcinoma”, *Prostate*, t. 21, nr 1, 1992, doi: 10.1002/pros.2990210108.
- [149] R. J. Gumina, N. E. Kirschbaum, P. N. Rao, P. VanTuinen, i P. J. Newman, „The human PECAM1 gene maps to 17q23”, *Genomics*, t. 34, nr 2, 1996, doi: 10.1006/geno.1996.0272.
- [150] P. J. Newman *i in.*, „PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily”, *Science (1979)*, t. 247, nr 4947, 1990, doi: 10.1126/science.1690453.
- [151] D. L. Simmons, C. Walker, C. Power, i R. Pigotti, „Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen”, *Journal of Experimental Medicine*, t. 171, nr 6, 1990, doi: 10.1084/jem.171.6.2147.

- [152] R. P. Basilio-De-Oliveira i V. L. N. Pannain, „Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors”, *World J Gastroenterol*, t. 21, nr 22, 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i22.6924.
- [153] H. M. DeLisser *i in.*, „Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis”, *American Journal of Pathology*, t. 151, nr 3, 1997.
- [154] C. Bergom, C. Gao, i P. J. Newman, „Mechanisms of PECAM-1-mediated cytoprotection and implications for cancer cell survival”, *Leukemia and Lymphoma*, t. 46, nr 10. 2005. doi: 10.1080/10428190500126091.
- [155] M. Chabowski, A. Nowak, J. Grzegorzolka, A. Piotrowska, D. Janczak, i P. Dziegiel, „Comparison of microvessel density using nestin and CD34 in colorectal cancer”, *Anticancer Res*, t. 38, nr 7, 2018, doi: 10.21873/anticancer.12673.
- [156] H. C. Hollingsworth, E. C. Kohn, S. M. Steinberg, M. L. Rothenberg, i M. J. Merino, „Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma”, *American Journal of Pathology*, t. 147, nr 1, 1995.
- [157] S. Tomisaki, S. Ohno, Y. Ichiyoshi, H. Kuwano, Y. Maehara, i K. Sugimachi, „Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer”, *Cancer*, t. 77, nr 58, 1996, doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19960415)77:8+<1722::aid-cnrc22>3.0.co;2-z.
- [158] S. B. Fox i A. L. Harris, „Histological quantitation of tumour angiogenesis”, *APMIS*, t. 112, nr 7–8. 2004. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0803.x.
- [159] Y. L. Ma, J. Y. Peng, P. Zhang, W. J. Liu, L. Huang, i H. L. Qin, „Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer”, *Medical Oncology*, t. 27, nr 2, 2010, doi: 10.1007/s12032-009-9210-3.
- [160] Y. Miyata i H. Sakai, „Reconsideration of the clinical and histopathological significance of angiogenesis in prostate cancer: Usefulness and limitations of microvessel density measurement”, *International Journal of Urology*, t. 22, nr 9. 2015. doi: 10.1111/iju.12840.
- [161] X. Zhao i J. Li, „Research on the correlation between ultrasonographic features of breast cancer and expressions of ER, CD34 and p53”, *Journal of B.U.ON.*, t. 23, nr 2, 2018.
- [162] S. M. Nitsch, R. Pries, i B. Wollenberg, „Head and neck cancer triggers increased IL-6 production of CD34+ stem cells from human cord blood”, *In Vivo (Brooklyn)*, t. 21, nr 3, 2007.
- [163] W. Remmele i H. E. Stegner, „[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue].”, *Pathologie*, t. 8, nr 3, 1987.
- [164] Y. Karslioğlu, N. Yiğit, i Ö. Öngürü, „Chalkley method in the angiogenesis research and its automation via computer simulation”, *Pathol Res Pract*, t. 210, nr 3, 2014, doi: 10.1016/j.prp.2013.11.010.
- [165] P. B. Vermeulen *i in.*, „Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours”, *Eur J Cancer*, t. 38, nr 12, 2002, doi: 10.1016/S0959-8049(02)00094-1.

- [166] N. Weidner, J. P. Semple, W. R. Welch, i J. Folkman, „Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma”, *New England Journal of Medicine*, t. 324, nr 1, 1991, doi: 10.1056/nejm199101033240101.
- [167] J. L. Astarita *i in.*, „The neutrophil protein CD177 is a novel PDPN receptor that regulates human cancer-associated fibroblast physiology”, *PLoS One*, t. 16, nr 12 December, 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0260800.
- [168] B. Pula, A. Wojnar, W. Witkiewicz, P. Dziegiel, i M. Podhorska-Okolow, „Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts correlates with VEGF-C expression in cancer cells of invasive ductal breast carcinoma”, *Neoplasma*, t. 60, nr 5, 2013, doi: 10.4149/neo_2013_067.
- [169] J. Suchanski *i in.*, „Podoplanin increases the migration of human fibroblasts and affects the endothelial cell network formation: A possible role for cancer-associated fibroblasts in breast cancer progression”, *PLoS One*, t. 12, nr 9, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0184970.
- [170] K. L. Dumoff, C. Chu, X. Xu, T. Pasha, P. J. Zhang, i G. Acs, „Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix”, *Modern Pathology*, t. 18, nr 1, 2005, doi: 10.1038/modpathol.3800269.
- [171] S. Iwakiri *i in.*, „D2-40-positive lymphatic vessel density is a poor prognostic factor in squamous cell carcinoma of the lung”, *Ann Surg Oncol*, t. 16, nr 6, 2009, doi: 10.1245/s10434-009-0432-6.
- [172] S. El-Gendi i M. Abdel-Hadi, „Lymphatic vessel density as prognostic factor in breast carcinoma: relation to clinicopathologic parameters.”, *J Egypt Natl Canc Inst*, t. 21, nr 2, 2009.
- [173] M. R. Ambrosio *i in.*, „Lymphatic vascularization in prostate adenocarcinoma: Correlation with tumor grade, androgen withdrawal and prognosis”, *Anticancer Res*, t. 35, nr 10, 2015.
- [174] Y. Zeng, K. Opeskin, L. G. Horvath, R. L. Sutherland, i E. D. Williams, „Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer”, *Prostate*, t. 65, nr 3, 2005, doi: 10.1002/pros.20288.
- [175] L. Trojan, M. S. Michel, F. Rensch, D. G. Jackson, P. Alken, i R. Grobholz, „Lymph and blood vessel architecture in benign and malignant prostatic tissue: Lack of lymphangiogenesis in prostate carcinoma assessed with novel lymphatic marker lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1)”, w *Journal of Urology*, 2004. doi: 10.1097/01.ju.0000128860.00639.9c.
- [176] A. A. Roma, C. Magi-Galluzzi, M. A. Kral, T. T. Jin, E. A. Klein, i M. Zhou, „Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma”, *Modern Pathology*, t. 19, nr 3, 2006, doi: 10.1038/modpathol.3800546.
- [177] M. G. Ozawa *i in.*, „Angiogenesis with pericyte abnormalities in a transgenic model of prostate carcinoma”, *Cancer*, t. 104, nr 10, 2005, doi: 10.1002/cncr.21436.
- [178] Y. Miyata, K. Mitsunari, A. Asai, K. Takehara, Y. Mochizuki, i H. Sakai, „Pathological Significance and prognostic role of microvessel density, evaluated Using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy”, *Prostate*, t. 75, nr 1, 2015, doi: 10.1002/pros.22894.

- [179] A. De La Taille *i in.*, „Microvessel density as a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy: A comparison of CD34 and CD31”, *Am J Clin Pathol*, t. 113, nr 4, 2000, doi: 10.1309/02w2-ke50-pkef-g2g4.
- [180] Y. M. El-Gohary *i in.*, „Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma”, *Am J Clin Pathol*, t. 127, nr 4, 2007, doi: 10.1309/X6NXYE57DLUE2NQ8.
- [181] R. Verma *i in.*, „Significance of p53 and ki-67 expression in prostate cancer”, *Urol Ann*, t. 7, nr 4, 2015, doi: 10.4103/0974-7796.158507.
- [182] M. C. Bettencourt, J. J. Bauer, I. A. Sesterhenn, F. K. Mostofi, D. G. Mcleod, i J. W. Moul, „Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy”, *Journal of Urology*, t. 156, nr 3, 1996, doi: 10.1016/S0022-5347(01)65703-3.
- [183] A. Berlin *i in.*, „Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis”, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, t. 35, nr 8. 2017. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.05.004.

11. Załączniki