

# Imunohistokemijska ekspresija ERG u biopsijama prostate iglom i uzorcima prostatektomije istih bolesnika

---

Barać Žutelija, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:359471>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Jelena Barać Žutelija**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA  
EKSPRESIJA ERG U BIOPSIJAMA  
PROSTATE IGLOM I UZORCIMA  
PROSTATEKTOMIJE ISTIH  
BOLESNIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021. godine**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Jelena Barać Žutelija**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA  
EKSPRESIJA ERG U BIOPSIJAMA  
PROSTATE IGLOM I UZORCIMA  
PROSTATEKTOMIJE ISTIH  
BOLESNIKA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021. godine**

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ KBC  
Sestre milosrdnice, Vinogradska 29, Zagreb

Mentor rada: Doc.dr.sc. Jasmina Rajc, dr.med.

Rad ima 29 listova, 5 tablica i 4 slike

**Zahvala:**

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Jasmini Rajc na ukazanom povjerenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem prof.dr.sc. Boži Krušlinu na bezrezervnoj podršci i divnom vodstvu, nesebičnom pružanju znanja, korisnih savjeta i smjernica tijekom izrade diplomskog rada.

Također srdačna zahvala dr.sc. Silviji Mašić na pomoći u patohistološkoj analizi preparata te dr. Ivanu Pezelju na izradi statističke analize podataka.

Velika hvala obitelji, a posebno suprugu na razumijevanju i nesebičnoj podršci od prvog dana studija te svakom zagrljaju i utjehi u trenucima kada nije bilo lako...

## **SADRŽAJ:**

1. UVOD .....	1
1.1. ANATOMIJA PROSTATE .....	1
1.2. EMBRIOLOGIJA PROSTATE .....	2
1.3. HISTOLOGIJA PROSTATE .....	2
1.4. KARCINOM PROSTATE .....	3
1.4.1. Epidemiologija i etiologija .....	3
1.4.2. Tijek bolesti, klinička slika i rana detekcija.....	4
1.4.3. Dijagnostički postupci .....	5
1.4.4. Tipovi i patološka slika karcinoma prostate .....	7
1.4.5. Procjena karcinoma prostate .....	9
1.4.6. ERG .....	10
2. HIPOTEZA.....	11
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	12
4. BOLESNICI I METODE (Materijal i metode).....	13
4.1. USTROJ STUDIJE .....	13
4.2. BOLESNICI.....	13
4.3. METODE .....	14
4.3.1. Histološka analiza.....	14
4.3.2. Imunohistokemijska analiza.....	14
5. REZULTATI.....	16
6. RASPRAVA.....	21
7. ZAKLJUČAK.....	23
8. SAŽETAK.....	24
9. SUMMARY .....	25
10. LITERATURA (referencije) .....	26
11. ŽIVOTOPIS.....	29

Popis oznaka i kratica:

CT – engl. computed tomography, kompjuterizirana tomografija

DNA – engl. deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleinska kiselina

DRP – digitorektalni pregled

ETS – engl. erythroblast transformation-specific

ERG – engl. erythroblast transformation-specific [ETS]- related gene

HE – hemalaun - eozin

IHC – imunohistokemija

MR – engl. magnetic resonance, magnetska rezonanca

PHD – patohistološka dijagnoza

PSA – prostata specifični antigen

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TMPRSS2 – engl. transmembrane serine protease 2

TNM – engl. tumour-nodes-metastasis, tumor-limfni čvor-metastaze

TRUS – eng. transrectal ultrasaund, transrektalni ultrazvuk

## 1. UVOD

### 1.1. ANATOMIJA PROSTATE

Prostata je žlijezda s vanjskim lučenjem, dio je muškog spolnog sustava, oblika i veličine kestena. Vrh prostate okrenut je prema dolje, a baza prema gore. Nalazi se ekstraperitonealno, izravno na bazi mjehura, okružena je mokraćnom cijevi i nema kontakta s visceralnim peritonejem. Na dnu zdjelice prostata prolazi kroz urogenitalni hijatus. Sa stražnje strane se naslanja na rektum kroz čiju stijenku na udaljenosti od 4 cm iznad anusa se može jasno palpirati kao gruba struktura. Sprijeda je učvršćena vezivnim tkivom na stražnji rub pubične simfize. Kroz prostatu prolazi mokraćna cijev i parni ejakulatorni duktusi. Prostata je okružena čvrstom fibromuskularnom ovojnicom koja sadržava glatke mišićne stanice. Po klasifikaciji prema McNealu žlijezda se dijeli u pet zona: rubna, središnja, periuretralna, prijelazna i prednja. Rubna zona tvori najveći dio organa, oko 70%, središnja zona je drugi najveći dio i to do 25%, dok najmanji dio otpada na prednju zonu gdje ne nalazimo žljezdano tkivo (1,2).

Prostata ima nekoliko morfoloških dijelova, a sastoji se od dvaju režnjeva: desnog, lijevog i jednog suženja koje se naziva istmus. Desni i lijevi režanj spojeni su ispred mokraćne cijevi nasuprot istmusa, a iza uretre povezan je i središnji režanj. Unutar desnog i lijevog režnja opisuju se četiri režnjića koji se tijekom seciranja mogu razdvojiti jedan od drugog, a svaki je određen rasporedom kanalića i vezivnog tkiva što se može raspoznati i makroskopski (1,2).

U prostatu arterijska opskrba krvi dolazi preko rektalne i donje vezikalne arterije, a venska odvodnja krvi u unutrašnje ilijakalne vene se zbiva preko parnog vezikalnog prostatičkog pleksusa. Limfne žile se dreniraju u zdjelčne i sakralne limfne čvorove. Limfna odvodnja većinom odlazi izravno prema ilijakalnim limfnim čvorovima ili kroz uzvodno otjecanje u sakralne limfne čvorove. Presudnu ulogu u inervaciji prostate imaju autonomna vlakna koja većinom dolaze od zdjelčnog spleta, dok na površini prostate nalazimo brojne ganglijske stanice (1,2).

Težina prostate zdravog, odraslog muškarca iznosi oko 20 grama odnosno volumski od 20 do 30 mL što ovisi o tjelesnoj masi i dobi (3).



## **1.2. EMBRIOLOGIJA PROSTATE**

Prostata se razvija iz mezodermalnog i endodermalnog zametnog listića. Embrionalna osnova prostate počinje se razvijati u 10-om tjednu embrionalnog života. Žlijezda se razvije od solidnih epitelnih pupoljaka nastalim izrastanjem iz dijela urogenitalnog sinusa i primitivne mokraćne cijevi. Tijekom kasnijeg razvoja u solidnim epitelnim pupoljcima nastaje lumen koji se otvara u mokraćni kanal oko ušća Wolffovih kanala, odnosno oko ušća ejakulatornog kanala. Mišićno i vezivno tkivo prostate diferencira se iz mezenhima, a žljezdani dio iz epitelnih pupoljaka.

Razvoj navedenih pupoljaka jako je ovisan o utjecaju okolnog mezenhima na koji djeluju androgeni. Tijekom trećeg mjeseca embrionalnog života formiraju se solidni odijeljeni režnjevi prostate nastali iz primitivne mokraćne cijevi i dijela urogenitalnog sinusa te dolazi do povećanog stvaranja epitela. U četvrtom mjesecu embrionalnog života prostata se sastoji od pet režnjeva, a koju čine prednji, srednji, stražnji te dva bočna režnja. U zadnjoj polovici fetalnog života dolazi do spajanja režnjeva prostate te prilikom rođenja granice među režnjevima nisu jasno diferencirane.

Pri samom kraju trećeg tromjesečja fetalnog života kao rezultanta činidbe gonadalnih i gonadotropnih majčinih hormona, prostata povećava svoj volumen. Navedeno povećanje traje nekoliko dana poslije poroda, a nedugo nakon toga - otprilike par dana, dolazi do njegovog postepenog smanjenja te kao takva ne doživljava promjene sve do puberteta. Po završetku puberteta žlijezda ponovo raste, a nakon šezdesete ili sedmdeste godine života dolazi do postupne atrofije prostate (3,4).

## **1.3. HISTOLOGIJA PROSTATE**

Prostata se sastoji od 30 do 50 razgranatih tubuloalveolarnih žlijezda čiji se odvodni kanali otvaraju u dio uretre koji prolazi kroz prostatu. Periferna zona zauzima 50% volumena prostate i to je glavno sjelo začetka odnosno nastanka karcinoma dok 25% žlijezde zauzima središnja zona. Prijelazna zona ima medicinsko značenje jer je to mjesto izvor nastanka većine benignih hiperplazija prostate. Tubuloalveolarne žlijezde prostate obložene su kubičnim ili višerednim cilindričnim epitelom. Žljezdane dijelove obavija značajna količina fibromuskularne strome. Vezivna fibroelastična čahura bogata je glatkim mišićnim stanicama koje obavijaju cijelu prostatu. Žlijezda je podijeljena u režnjeve pregradama koje polaze i prodiru od čahure te su kod odraslog muškarca nejasno odijeljeni. Prostatički sekret se proizvodi i pohranjuje u

žljezdanom dijelu prostate sve dok se ne izbaci prilikom ejakulacije. Funkcija i građa prostate ovisi o razini testosterona (5).

## **1.4. KARCINOM PROSTATE**

### **1.4.1. Etiologija i epidemiologija**

U razvijenom svijetu karcinom prostate spada u najčešći zloćudni tumor muške populacije, a u Republici Hrvatskoj karcinom prostate uključujući i karcinom pluća predstavlja najčešći zloćudni tumor u muškaraca (6). Godine 2020. od karcinoma prostate u svijetu je oboljelo 1414259 muškaraca, dok je sa smrtnim ishodom bilo njih 375 304 (7). Bitno je za istaknuti da se najveći broj novootkrivenih slučajeva odnosi na muškarce s navršениh 65 godina života (6).

Učestalost bolesti raste sa starenjem, a sama bolest se rijetko pojavljuje prije 40-te godine života. Stoga karcinom prostate predstavlja važan zdravstvenosocijalni problem u zemljama razvijenog svijeta sa značajnom zastupljenošću starije populacije. Svakim sljedećim desetljećem incidencija se povećava. Po najnovijim procjenama u svakog drugog muškarca iza sedamdesete godine života histološki se nalazi karcinom prostate, dok kod većine ne dolazi do razvijanja kliničke slike bolesti, a samim time se bolest ne dijagnosticira. Kod dijagnoze raka prostate u osoba starije životne dobi uočava se tendencija sporijeg rasta i progresije, dok kod onih tek nešto starijih od pedeset godina života razvoj bolesti je osjetno brži (8,9). Godine 2020. u cijeloj Europi dijagnosticirano je 473 344 karcinoma prostate, a u SAD-u 239.574 (7). U Republici Hrvatskoj 2018. godine otkriveno je 2867 novih slučajeva te po učestalosti karcinoma prednjači zajedno s karcinomom bronha. Iste godine stopa incidencije raka prostate u Hrvatskoj iznosila je 145,2 (6).

Pripadnici crne rase u odnosu na bijelce imaju gotovo dva puta veću stopu obolijevanja od karcinoma prostate. Uzroci tome još nisu razjašnjeni, no smatra se da je jedan od mogućih razloga genetski polimorfizam u sintezi i metabolizmu androgenih hormona. Najmanju stopu pojavnosti karcinoma prostate imaju muškarci Azije, posebice Japanci i Kinezi, gdje je smrtnost od te vrste bolesti izuzetno niska i iznosi svega 3 do 4 muškarca na 100.000. U odnosu na navedene skupine suprotnost čine zapadnoeuropske zemlje kao i Sjedinjene Američke Države. Najviša stopa smrtnosti je među Afroamerikancima i iznosi 224 na 100.000, a kod muškaraca zapadne Europe 40 na 100.000 (10). To se pokušava objasniti okolišnim faktorima koji do danas nisu jasno definirani. Incidencija karcinoma prostate dijelomično raste starenjem populacije, a dijelomično širom primjenom sve dostupnijih dijagnostičkih testova, poput prostatičnog

specifičnog antigena (PSA), biopsije prostate pod kontrolom transrektalnog ultrazvuka (TRUS), scintigrafije skeleta, kompjutorizirane tomografije (CT) te magnetske rezonancije (MR) (11).

Važnu ulogu u napretku i ranoj detekciji karcinoma prostate svakako ima i veća informiranost potencijalnih bolesnika, no nažalost nije došlo do očekivanog smanjenja stope mortaliteta. Glavni čimbenici rizika za razvoj karcinoma prostate su: dob, genetika, rasna pripadnost, okruženje i prehrana. Ukoliko postoji pozitivna obiteljska anamneza (otac, brat, stric) porast rizika obolijevanja od karcinoma prostate je znatan te se tada za obolijevanje od raka prostate povećava čak trostruko. U navedenom slučaju, kod muškaraca s pozitivnom obiteljskom anamnezom urološka kontrola bi se trebala prakticirati znatno ranije, tj. iza četrdesete godine života. U današnje vrijeme uvriježeno je mišljenje da do 9% bolesnika s dijagnosticiranim karcinomom prostate ima nasljednu sklonost ka razvoju istog (12-14).

Ne nalazi se jasna korelacija s prehranom, spolnim bolestima, spolnim navikama, pušenjem i profesionalnim izlaganjem određenim tvarima (15). Za rast i razvoj stanica prostate su važni hormoni, a naročito androgeni, koji imaju i bitnu ulogu u rastu i razvoju karcinoma prostate. Testosteron, odnosno njegov aktivni oblik dihidrotestosteron je glavni androgen koji pod utjecajem 5-alfa-reduktaze nastaje u samoj prostati, veže se na nuklearne androgene receptore i kao takav stimulira prijemne gena (16,17).

Razvoj karcinoma prostate je složen proces u koji je uključen niz genetskih promjena. Otkrivene su određene genetske promjene gdje se nalazi gubitak alela ili delecija kromosoma koje su najvjerojatnije uključene u karcinogenezu prostate. Za pojavu karcinoma prostate smatra se da su odgovorne promjene na određenim kromosoma (8p te 10, 13, 16, 18q). Gubitak heterozigotnosti na kromosomu 8p je jedan od najranijih događaja (17). Pretpostavlja se da taj dio kodira *NKX3.1* gen koji je neophodan za normalni razvoj prostate (18).

#### **1.4.2. Tijek bolesti, klinička slika i rana detekcija**

Rak prostate kod muškaraca starije životne dobi je spororastući tumor, što nažalost nije slučaj kod mlađih muškaraca. Stoga, rak prostate koji je dijagnosticiran u starijoj životnoj dobi najvjerojatnije neće dovesti do smrtnog ishoda. Bolesnici su najčešće asimptomatski tj. ne pokazuju nikakve simptome koji bi predmnijevali malignu bolest u toj žlijezdi, međutim ponekad u bolesnika s lokalno proširenim tumorom može doći do pojavnosti bolova, zastoja opstrukcije ravnog crijeva kao i mjehura, a ponekad se lokalno pojavljuje i krvarenje. Simptome

opstrukcije mokraćnog mjehura u brojnijim slučajevima nalazimo kod bolesnika kojima je uz rak dijagnosticirano i benigno povećanje prostate, a mogućnosti njegove pojavnosti su opisane kao rijetki slučajevi velikog periuretralnog tumora. Kod većeg broja bolesnika koji imaju simptome opstrukcije mjehura, karcinom se dijagnosticira slučajno u uzorku tkiva koji se dobije transuretralnom resekcijom, a kojoj je osnovni cilj uspostavljanje ponovnog spontanog mokrenja. Točna dijagnostika uvelike ovisi i o količini mikroskopski pregledanog materijala. Većina dijagnosticiranih karcinoma spada u dobro diferencirane male karcinome iako su ponekad uočljivi umjereno diferencirani do nediferencirani prošireni karcinomi. Karcinom prostate se vrlo rijetko primarno manifestira simptomima opće slabosti, gubitka težine ili umorom, simptomima koji nastaju kao posljedica metastaza u kostima ili limfnim čvorovima te zastojnom uropatijom kao posljedicom zastoja ureteralnih ušća u mokraćni mjehur (19).

Koristeći sve veći broj biomarkera za ispitivanje karcinoma prostate poput faktora tumorskog rasta, faktora angiogeneze, regulatora staničnog ciklusa, regulatora apoptoze, genetskih promjena i sl. moglo bi u budućnosti dovesti do aktivnijeg i kvalitetnijeg ispitivanja karcinoma prostate te na taj način omogućiti aktivno liječenje bolesnika s ciljem izbjegavanja radikalnog liječenja onih koji imaju latentni karcinom prostate.

Za razvoj klinički agresivnog oblika bolesti veću šansu imaju mlađi bolesnici. Iz tog razloga, od velike je važnosti rana dijagnoza karcinoma prostate, dok je karcinom još u fazi izlječenja. Stoga je jako bitno informirati i motivirati mušku populaciju da jednom godišnje obave urološki pregled, pri kojem uz fizikalni pregled te dodatne dijagnostičke postupke, poglavito određivanje PSA treba utvrditi eventualno postojanje karcinoma prostate. Urološki pregled takve vrste poželjno bi bilo da obave svi muškarci nakon pedesete godine života, pa i oni mlađi u slučaju postojanja pozitivne obiteljske anamneze (20).

### **1.4.3. Dijagnostički postupci**

Standardni dijagnostički postupci za karcinom prostate su:

- digitorektalni pregled prostate (DRP),
- određivanje serumskog prostatičnog specifičnog antigena (PSA),
- transrektalni ultrazvuk (TRUS)
- po potrebi biopsija prostate (PHD) (21)

Digitorektalni pregled prostate je temeljni odnosno osnovni urološki pregled koji je učinkovit i služi kao metoda za otkrivanje karcinoma prostate. Patološka potvrda je uvijek važna jer se rani karcinom ne može sa sigurnošću razlikovati od žarišne nodularne hiperplazije, granulomskog prostatitisa, tuberkuloze, infarkta ili kamenaca. Transrektalni ultrazvuk se nije pokazao uspješnim u probiru karcinoma prostate jer ne otkriva 30% tumora prostate koji su izoehogeni (22).

Određivanje vrijednosti PSA u serumu se pokazalo vrlo učinkovito za dijagnozu i determiniranje kliničkog stadija bolesti te za praćenje bolesnika s karcinomom prostate. Povišena vrijednost PSA u jednom određivanju ne zahtijeva odmah biopsiju, odnosno određivanje vrijednosti PSA treba ponoviti unutar nekoliko tjedana. Ne postoji konsenzus o vrijednostima PSA iznad kojih je indicirana biopsija prostate, međutim prema dijelu smjernica biopsija je indicirana uz PSA > 3 ng/mL. (24). Vrijednost PSA manju od 4 ng/mL ima oko 20% pacijenata s karcinomom prostate (24, 25). Povišene vrijednosti PSA su uočene i kod benignih promjena prostate, kod bolesnika starije životne dobi, pri upalnim procesima te nakon pregleda prostate. Kako je PSA nedovoljno specifičan, bolesnici koji imaju slabije diferenciran karcinom uglavnom nemaju povišenu vrijednost PSA. Samim time značajan broj bolesnika bude podvrgnut nepotrebnim biopsijama.

Osim ukupnog PSA, potrebno je odrediti i omjer slobodnog i ukupnog PSA, koji može pomoći razlikovati hiperplaziju od karcinoma prostate. Navedeni odnos uvijek je izražen u postocima, a vrijednost iznad 20 uz serumsku vrijednost PSA od 4 do 10 ng/mL upućuje na vjerojatnost da se radi o hiperplaziji. Tim se načinom dobije poboljšanje specifičnosti u dijagnostici karcinoma, iako povišena vrijednost serumskog PSA uz sniženu vrijednost razmjera ukupnog i slobodnog PSA može upućivati i na upalni proces prostate. Samim time smanjuje se i broj nepotrebno učinjenih biopsija (24, 25).

Muškarci bez dijagnosticiranog karcinoma mogu imati povišene vrijednosti serumskog PSA, koja je u korelaciji s povećanim volumenom prostate, a također i sa starijom životnom dobi. U asimptomatskih muškaraca s očekivanim trajanjem života kraćim od 15 godina određivanje PSA nije opravdano (26).

Tkivo prostate i eventualne promjene u samoj strukturi tkiva mogu se prikazati i transrektalnim ultrazvukom. Danas se smatra da je biopsija prostate pod kontrolom TRUS-a uz uporabu visokofrekventnih bipolarnih sonda (do 12 MHz) jedina prava preoperativna metoda za otkrivanje karcinoma prostate (27, 28).

Patohistološku potvrdu te samim time konačnu dijagnozu postavljamo na temelju dobijene biopsije koje se mogu izvesti transrektalno pomoću igle vođene ultrazvukom (mala biopsija) ili nakon transuretralne resekcije prostate ili prostatektomije (velika biopsija) (25).

Kod biopsije prostate uzorci za PHD se biopiraju tankim iglama u promjeru 18 Gauge te je za patohistološku analizu posljedično na raspolaganju ograničena količina materijala temeljem koje se može postaviti dijagnoza (30). Apsolutne indikacije za biopsiju prostate su:

- vrijednosti PSA više od 10,0 ng/ml
- pozitivni digitorektalni nalaz neovisno od vrijednosti PSA
- prisutne lezije prostate verificirane TRUS-om
- porast PSA više od 0,75 ng/ml u godinu dana

Postojanje negativnog digitorektalnog nalaza, ali povišene vrijednosti serumskog PSA, indikacija je za biopsiju prostate iglom pod kontrolom TRUS-a. Po današnjim smjernicama za dijagnostiku karcinoma prostate uzima se deset do dvanaest cilindara biopsije koji se potom patohistološki analiziraju. Cilindri tkiva nakon učinjene biopsije prostate iglom stavljaju se u pripremljene kapsule sa spužvicama kako bi ostali ravni te ne bi došlo do savijanja ili lomljenja tokom obrade tkiva fiksacijom. U opisanom postupku svaki cilindar se stavlja u jednu kapsulu te se označava mjesto uzimanja biopsije. Označena i zatvorena kapsula se tada označi identifikacijskim brojem te odloži u posudu s formalinom. Uzorak biopsije se potom isti dan dostavlja na patohistološku analizu. Kod prijema materijala upisuje se broj te se opisuje duljina i izgled samog uzorka (31).

Biopsija se u određenom vremenskom odmaku ponavlja u slučaju:

- negativnog nalaza prethodne biopsije te daljnjeg pojavljivanja povišenih vrijednosti serumskog PSA,
- dijagnosticiranja prekancerozne lezije u prvoj biopsiji
- većeg skoka vrijednosti serumskog PSA u kratko vrijeme (21)

#### **1.4.4. Tipovi i patološka slika karcinoma prostate**

Većinu svih primarnih karcinoma prostate (85-90%) čini acinarni ili uobičajeni adenokarcinom prostate. Preostalih 10 – 15 % karcinoma prostate čine posebni tipovi karcinoma prostate kao

što su: atrofični adenokarcinom, adenokarcinom prostatičnih duktusa, mucinozni adenokarcinom, onkocitni adenokarcinom, karcinom pločastih stanica, urotelni karcinom, neuroendokrini karcinom, sarkomatoidni karcinom i karcinom nalik na limfoepiteliom.

Mikroskopski izgled adenokarcinoma prostate može biti od dobro diferenciranih tumora čije se žlijezde teško mogu razlikovati od žlijezda normalnoga prostatičnog tkiva do slabo diferenciranih tumora gdje je tkivo prostate histološki često teško prepoznatljivo.

Histološka dijagnoza karcinoma prostate obično se postavlja na malom ili srednjem povećanju mikroskopa, a temelji se na kombinaciji arhitekturnih i citoloških kriterija. Dva su najvažnija arhitekturna kriterija: infiltrativni rast karcinoma i odsutnost bazalnih stanica. Prisutnost makronukleola u jezgri tumorskih stanica temeljni je citološki kriterij.

Histološki gradus malignog procesa prostate najčešće se izjednačava sa stupnjem diferencijacije neoplastičnih stanica. Kroz Gleasonov sustav koji je osmišljen u periodu od 1966. do 1974. godine određuje se gradus adenokarcinoma prostate te je trenutno najzastupljeniji u kliničkoj praksi. Metoda interpretira standardne tkivne rezove obojene hemalaun-eozinom u svjetlosnoj mikroskopiji. Gleasonov sustav se bazira na arhitekturnim karakteristikama i izgledu tumorskih žlijezda. Prema Gleasonovu sustavu, razlikujemo pet histoloških obrazaca rasta ili gradusa, koji se označavaju od 1 do 5 pri čemu manji broj određuje bolji stupanj diferenciranosti (32, 33). Za svaku biopsiju u kojoj se nađe karcinom potrebno je odrediti Gleasonov gradus koji se temelji na najzastupljenijem histološkom obrascu rasta (primarni Gleasonov broj/gradus) i sljedećem obrascu rasta i to prema zastupljenosti (sekundarni Gleasonov broj/gradus). Gradus odnosno Gleasonov zbroj (engl. Gleason score/sum) se dobije zbrajanjem vrijednosti primarnog i sekundarnog obrasca koji teoretski može biti od 2 do 10, dok u praksi je najčešće između 6 i 10. Gleasonovi zbrojevi primarnog i sekundarnog gradusa se određuju na svim uzorcima karcinoma prostate, uključujući one uzete biopsijom iglom, transuretralnom resekcijom prostate ili radikalnom prostatektomijom. Iako se Gleasonov sustav kroz povijest nekoliko puta mijenjao, koristi se i danas te se navodi u novoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2016. godine koja predlaže pet skupina gradusa adenokarcinoma prostate i to od 1 do 5. Skupina gradusa 1 uključuje tumore, prema Gleasonu sa zbrojem 6 (3+3). Skupina gradusa 2 uključuje karcinome prostate čiji je primarni gradus 3 a sekundarni 4, a ukupni zbroj iznosi 7 (3+4). Skupina gradusa 3 uključuje tumore koji imaju primarni Gleasonov gradus 4, a sekundarni 3, a zbroj iznosi 7 (4+3). Skupina gradusa 4 uključuje tumore koji imaju primarni Gleasonov zbroj 8, bilo da je primarni gradus 3 ili 4, a

sekundarni 5, 3 ili 4 (3+5, 4+4, 5+3) iako je u praksi 4+4 najčešći oblik. U skupinu gradusa 5 spadaju tumori Gleasonova zbroja 9 i 10 (4+5, 5+4 ili 5+5). Skupinu gradusa 5 čine najslabije diferencirani tumori, dok skupinu tumora gradus 1 čine najbolje diferencirani tumori (34,35,36).

Unatoč značajnim promjenama u kliničkom i patohistološkom pristupu dijagnostici adenokarcinoma prostate, Gleasonov sustav ostaje jedan od najvažnijih prognostičkih čimbenika, a ispravna patohistološka dijagnoza i Gleasonov zbroj danas su osnovica za terapijske postupke (34).

Iako se dijagnoza karcinoma prostate uglavnom može postaviti na temelju histoloških karakteristika, ponekad zahtijeva i određivanje biomarkera koji su važni u prognozi, patogenezi te kao ciljane molekule za moguću terapiju. Tijekom posljednjeg desetljeća ERG je sve više uključen u etiologiju karcinoma prostate. Danas se zna da je fuzija androgen promotor TMPRSS2 gena s ETS transkripcijskim čimbenikom ERG (TMPRSS2/ERG,T/E), najčešća genska promjena u karcinomu prostate i rezultira prekomjernom ekspresijom transkripcijskog čimbenika ERG-a koji se nalazi i u ranim i kasnijim stadijima karcinoma prostate. TMPRSS2/ERG gen se nalazi u otprilike 50% svih karcinoma prostate. ERG gen je protoonkogen koji sudjeluje u kromosomskim translokacijama i često je prekomjerno izražen u karcinomu prostate koji sadrži ERG-transmembransku proteazu, serin 2 fuziju (TMPRSS2 /ERG, T/E). Ekspimiranje ERG proteina koji je jedan od približno 30 članova ETS (engl. Erythroblast transformation-specific) obitelji igra važnu ulogu u funkcijama poput staničnog razvoja, stanične funkcije i stanične proliferacije. Kod karcinoma prostate, visoka ekspresija ERG-a povezana je s uznapredovalim stadijem tumora, visokim Gleasonovim zbrojem, metastazama i kraćim vremenom preživljavanja. Važnost ERG proteina u razvoju karcinoma prostate je primjer genske alteracije koja uvodi promjene u normalno ponašanje staničnog ciklusa (37,38).

#### **1.4.5. Procjena karcinoma prostate**

Klinički stadij bolesti se procjenjuje pregledom pacijenta, a patološki analizom biopsije prostate i limfnih čvorova zdjelice nakon radikalne prostatektomije. Prognoza uglavnom ovisi o proširenosti tumora te o Gleasonovu zbroju odnosno skupini gradusa. Sam klinički stadij se određuje prema TNM sustavu. Klinička TNM klasifikacija se temelji na slikovnoj dijagnostici i digitorektalnom pregledu (39).



#### 1.4.6. ERG

ERG (engl. *Erythroblast transformation-specific [ETS]- related gene*) je protoonkogen, član je ETS obitelji transkripcijskih faktora, a smješten na kromosomskom mjestu 21q22. Geni ETS obitelji reguliraju embrionalni razvoj, staničnu proliferaciju, diferencijaciju, angiogenezu, upalu i apoptozu. ERG gen kodira istoimeni protein koji je uključen u hematopoezu i razvoj endotela. U normalnom se tkivu ERG protein eksprimira u endotelnim stanicama i limfocitima, a izražen je u gotovo svim endotelnim tumorima, uključujući hemangioendoteliom, angiosarkom i Kaposijev sarkom (40, 41). Prekomjerna ekspresija ERG proteina viđena je u skoro pola slučajeva svih karcinoma prostate, dok benigno povećanje prostate ne pokazuje ekspresiju ERG proteina. Studije genskog mapiranja karcinoma prostate s prekomjernom ekspresijom ERG proteina pokazale su da gen kodira protein nazvan transmembranska proteaza, serin 2 (TMPRSS2-ERG) i ERG protein (40,41). Gen TMPRSS2-ERG i ERG su u normalnoj stanici smješteni blizu jedan drugome na 21 kromosomu. Ekspresija svakog gena kontrolirana je svojim individualnim promotorom, odnosno kratka DNA sekvenca kontrolira koliko će svaki gen biti aktivan. U nekim slučajevima karcinoma prostate DNA sekvenca koja je smještena između dva gena je greškom izbrisana (mutacija-delecija) tijekom mitotske stanične diobe. Pri tome postoji nekoliko mogućnosti pa mogu biti izbrisani: većina TMPRSS2-ERG gena, nekodirajući segmenti između dva gena, ERG promotor i dio ERG gena. Uslijed tih mutacija, TMPRSS-ERG promotor kontrolira gen sastavljen od početka TIMPRSS2 sekvence te reducirani dio ERG sekvence. Spajanje navedenih gena tako kodira skraćeni ERG protein (krnji protein). Mutacija nastala tijekom stanične diobe stvara fuziju gena gdje ERG gen gubi svoj normalni regulator (promotor) i biva kontroliran TMPRSS2-ERG regulatorom. Jedan od gena kojeg kontrolira ERG protein je uključen u stvaranje krvnih žila te se predmnijeva da prekomjerna ekspresija ERG proteina može pojačati angiogenezu karcinoma prostate. Tumor koji je narastao do određene veličine treba prehrambene tvari i kisik. Stvaranje novih krvnih žila koje opskrbljuju tumor omogućuje opskrbu unutrašnjosti tumora kisikom i nutrijentima, a time i njegov daljni rast. Većina tumora s prekomjernom ekspresijom ERG-a izražava TMPRSS2-ERG fuziju koja rezultira često, ali ne uvijek agresivnijim karcinomom prostate (42, 43, 44, 45).

## **2. HIPOTEZA**

Fuzija gena TMPRSS2-ERG i ERG gena iz obitelji ETS translokacijskih faktora je povezana s agresivnijim ponašanjem karcinoma prostate i lošijim prognostičkim ishodom.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Cilj je istraživanja odrediti ekspresiju ERG proteina u preparatima iglene biopsije prostate bolesnika s dijagnosticiranim karcinomom prostate i usporediti s ekspresijom u uzorcima tumora nakon radikalne prostatektomije istih bolesnika.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) utvrditi razliku u Gleason zbroju i skupini gradusa između bolesnika s povišenom izraženosti ekspresije ERG i onih s negativnom imunohistokemijskom reakcijom.
- 2) utvrditi i odrediti povezanost između ekspresije ERG i nazočnosti kribriformnih formacija.
- 3) utvrditi ekspresiju ERG-a u maloj biopsiji u odnosu na postotak karcinoma u velikoj biopsiji.
- 4) utvrditi razliku u dobivenim rezultatima ekspresije ERG-a kod male i velike biopsije prostate.

## **4. BOLESNICI I METODE (Materijal i metode)**

### **4.1. USTROJ STUDIJE**

Studija je ustrojena kao presječna studija s povijesnim podacima.

### **4.2. BOLESNICI**

U ovo istraživanje je uključeno 50 bolesnika. Uzorci karcinoma prostate uzeti su iz arhivskog materijala Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“ a dobiveni su od pacijenata kojima je učinjena biopsija prostate iglom te naknadno radikalna prostatektomija s pozitivnom dijagnozom karcinoma prostate pri Klinici za urologiju, KBC Sestre milosrdnice u vremenskom periodu od 1.1.2018. do 31.12.2020. godine. U istraživanje su bili uključeni samo bolesnici koji su zadovoljavali sljedeće uvjete:

1. da postoji za bolesnike sva potrebna klinička dokumentacija i zadovoljavajući patohistološki nalaz te praćenje.
2. da bolesnik prije operacije nije uzimao dodatnu hormonsku i/ili radioterapiju.
3. da bolesnik uz karcinom prostate nema drugi maligni proces.

Podaci o bolesnicima dobiveni su iz Bolničkog informacijskog sustava-BIS, KBC Sestre milosrdnice te iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. U istraživanju nisu bili korišteni osobni podatci koji bi otkrili identitet ili ugrozili privatnost bolesnika. Svaki bolesnik je dobio jedinstveni broj s kojim je bio uključen u istraživanje, a radi zaštite osobnih podataka njihov identitet bio je poznat samo istraživaču. Gleasonov gradus, zbroj i skupina gradusa te pT stadij su određeni u skladu sa smjernicama SZO iz 2016. g.

Analizirano je:

- 50 uzoraka tkiva prostate bolesnika s karcinomom prostate dobivenih iglenom biopsijom
- 50 uzoraka tkiva prostate istih bolesnika s karcinomom prostate nakon radikalne prostatektomije

## **4.3.METODE**

### **4.3.1. Histološka analiza**

Materijal je obrađen po standardiziranom protokolu za histološku analizu tkiva koji uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu (12 h do 48 h), obrada tkiva u Sakura VIP- A1 histokinetu, uklapanje u parafinske blokove, rezanje na Leica SM 20102 mikrotomu debljine reza preparata od 3 do 5  $\mu\text{m}$ , deparafinizaciju u zamjenskom supstitutu ksilola i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozin (HE) u Varistan 24-4 Shandon poluautomatskom bojaču.

### **4.3.2. Imunohistokemijska analiza**

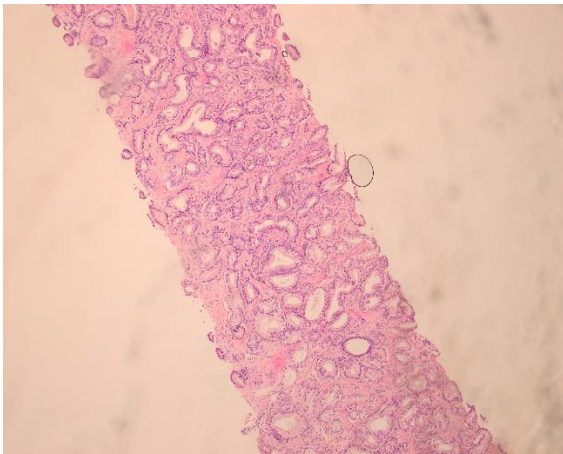
Reprezentativni uzorci tumorskog tkiva imunohistokemijski su obojeni na ERG. Za imunohistokemijsku analizu koristilo se zečje monoklonalno protutijelo anti-ERG, klona EP111 (IR659 RTU, FLEX, Monoclonal Rabbit Anti-Human, Dako, Danska). Primarno protutijelo ERG je prethodno od proizvođača razrijeđeno (RTU, ready to use), a bojenje je napravljeno po preporuci i protokolu proizvođača. Postupak imunohistokemijskog bojenja provodio se na automatiziranom Dako Autostainer Link 48+ aparatu uz uporabu Dako PT-link uređaja. U PT-link uređaju se vrši deparafinizacija i predtretman demaskiranja epitopa tj. antigena u puferu Dako TRS Ph 9, 20 minuta na temperaturi od maksimalno 97°C. Vrijeme inkubacije primarnog protutijela s antigenom je 20 minuta na 22°C. Vežanje protutijela iz seruma s antigenom iz tkiva učinjeno je s Dako EnVision FLEX+ /K8002/SM802 DAB veznim kitom, 20 minuta na 22°C, uz pomoć pojačivača Dako Linker, Maus, 15 minuta na 22°C. Nastala pozitivna imuna reakcija u obliku spoja Ag-At vizualizira se pomoću kromogena, Dako DAB+ /DM827 /DM823 /K800, 10 minuta na 22°C. Radi jasnije vidljivosti strukture stanice te lakše interpretacije rezultata preparati se kontrastiraju hemalaunom. Na predmetno staklo uz uzorak tumorskog tkiva koje se analizira uvijek se postavlja i pozitivnu kontrolu. Prema Nordiqu, crvuljak se preporuča za pozitivnu i negativnu kontrolu tkiva na ERG. Gotovo sve endotelne stanice moraju pokazivati umjerenu do jaku reakciju bojenja jezgre. Mora se očitati slaba reakcija citoplazmatskog bojenja u endotelnim stanicama s visokom ekspresijom ERG, dok epitelne i mišićne stanice moraju biti negativne. Kao kontrola se može koristiti i tonzila(44). Imunohistokemijska reakcija na ERG određivala se semikvantitativno, a rezultati su prikazani kako slijedi:

- do 25% pozitivnih tumorskih stanica (+),
- >25-50% (++),
- >50% (+++).

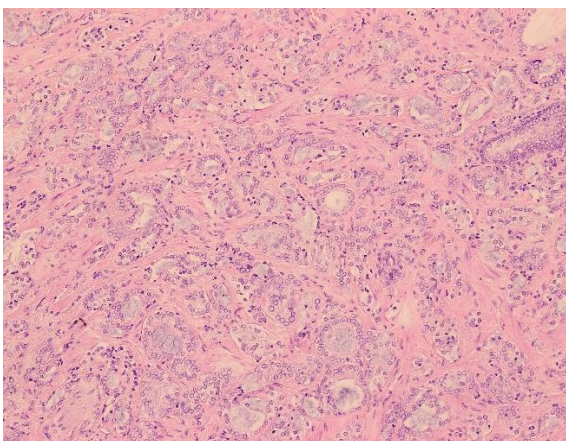
Intenzitet bojenja je određen semikvantitativno i svrstan u tri skupine: slabo, umjereno i jako pozitivna reakcija.

## 5. REZULTATI

U našu studiju je bilo uključeno 50 bolesnika s adenokarcinomom prostate. Dob bolesnika uključenih u studiju bio je u rasponu od 55 do 86 godina starosti, a prosječna starosna dob bolesnika iznosila je 68 godina. Analiza se vršila na uzorcima prostate dobivene iglenom biopsijom i uzorcima prostate nakon radikalne prostatektomije istih bolesnika. Svi HE preparati su mikroskopski pregledani, određen je Gleason zbroj i skupina gradusa tumora (Slike 1 i 2) te su izdvojeni reprezentativni uzorci s adenokarcinomom prostate na kojima se IHC određivala ekspresija ERG. Mikroskopskim pregledom HE preparata u 23 bolesnika su utvrđene kribriformne formacije.



Slika 1. HE preparat adenokarcinoma prostate na biopsiji iglom (100x)



Slika 2. HE preparat adenokarcinoma prostate u uzorku prostatektomije (100x)

Bolesnici su uglavnom imali 2 pozitivna od 10 cilindara prostate, a na jednome se određivala imunohistokemijska ekspresija ERG. Sedamnaest bolesnika je imalo samo jedan pozitivan

cilindar. Postotak tumora u cilindrima prostate je bio od 5-10%, samo 1 bolesnik je imao manje od 5% tumora.

Rezultati za Gleason zbroj svih analiziranih uzorka na HE preparatima kod iglene biopsije prostate su prikazani u tablici 1. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je najviše bolesnika imalo Gleason zbroj 7 (3+4), dok je samo jedan bolesnik imao Gleason zbroj 9 (4+5).

Tablica 1. Gleason zbroj za biopsiju prostate iglom

Gleason zbroj	6 (3+3)	7 (3+4)	7 (4+3)	8 (3+5, 4+4, 5+3)	9 i 10 (4+5, 5+4, 5+5)
Broj bolesnika	13	24	10	2	1

Rezultati za skupine gradusa analiziranih bolesnika kod iglene biopsije prostate prikazani su u tablici 2. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je najviše bolesnika bilo u skupini gradusa 2, a najmanji broj bolesnika u skupini gradusa 5.

Tablica 2. Skupine gradusa za biopsiju prostate iglom

Skupine gradusa	1	2	3	4	5
Broj bolesnika	13	24	10	2	1

Mikroskopskim pregledom HE preparata prostatektomije postotak tumora kod bolesnika je bio od 5- 30%.

Rezultati za Gleason zbroj svih analiziranih uzorka na HE preparatima kod radikalne prostatektomije su prikazani u tablici 3. Iz prikazane tablice vidljivo je da je najviše bolesnika imalo Gleason zbroj 7 (3+4), dok Gleason zbroj 8 nije imao niti jedan bolesnik.



Tablica 3. Gleason zbroj za radikalnu prostatektomiju

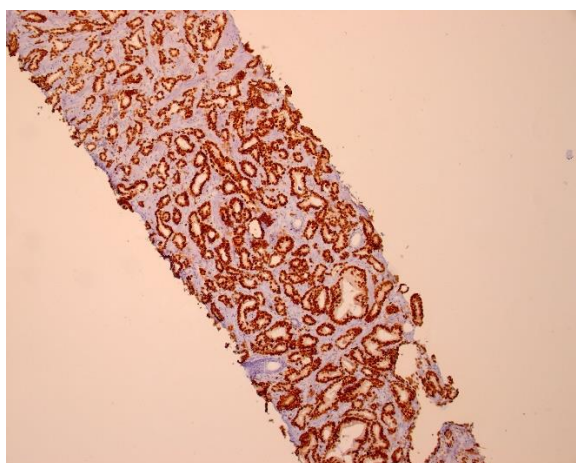
Gleason zbroj	6 (3+3)	7 (3+4)	7 (4+3)	8 (3+5, 4+4, 5+3)	9 i 10 (4+5, 5+4, 5+5)
Broj bolesnika	2	33	13	0	2

Rezultati za skupine gradusa analiziranih bolesnika kod radikalne prostatektomije prikazani su u tablici broj 4. Najviše bolesnika je bilo u skupini gradusa 2, a u skupini gradusa 4 nije bilo bolesnika.

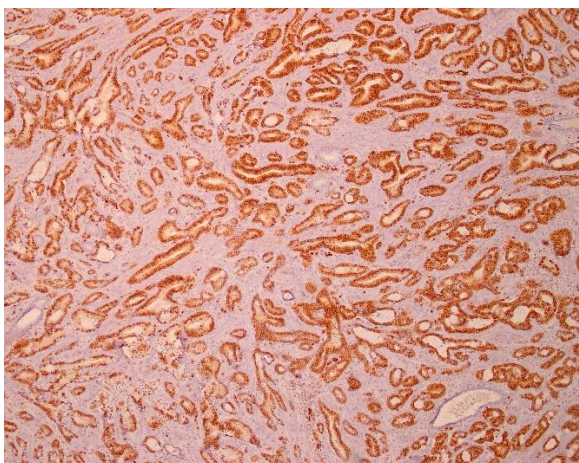
Tablica 4. Skupine gradusa za radikalnu prostatektomiju

Skupine gradusa	1	2	3	4	5
Broj bolesnika	2	33	13	0	2

Intenzitet imunohistokemijskog bojanja na ERG u uzorcima s karcinomom prostate kod iglene biopsije i prostatektomije određivani su semikvantitativno i svrstani su u tri skupine: slabo, umjereno i jako pozitivna reakcija (Slike 3 i 4).



Slika 3. IHC ekspresija ERG kod iglene biopsije (100x)



Slika 4. IHC ekspresija ERG kod prostatektomije (100x)

Rezultati dobiveni kod iglene biopsije prostate su pokazali da je imunohistokemijska ekspresija ERG u 11 bolesnika bila jako pozitivna (+++), kod 1 bolesnika slabo pozitivna (+) dok je 38 bolesnika pokazalo negativnu reakciju (0).

Rezultati dobiveni kod radikalne prostatektomije su pokazali da je imunohistokemijska ekspresija ERG u 13 bolesnika bila jako pozitivna (+++), a kod 37 bolesnika reakcija je bila negativna (0).

Bolesnici koji u maloj biopsiji pokazuju ekspresiju ERG-a ne pokazuju statistički značajnije različit Gleason gradus niti u maloj biopsiji ( $p=0,55$ , Mann-Whitney U test) niti u velikoj biopsiji tj. odstranjenoj prostati ( $p=0,53$ , Mann-Whitney U test), od onih koji ne pokazuju ekspresiju u maloj biopsiji.

Bolesnici koji u maloj biopsiji pokazuju ekspresiju ERG-a ne pokazuju statistički značajniju incidenciju kribiformnih formacija u velikoj biopsiji usporedbi sa bolesnicima koji ne pokazuju ekspresiju ERG-a u maloj biopsiji ( $p=0,83$ , Mann-Whitney U test).

Bolesnici koji u maloj biopsiji pokazuju ekspresiju ERG-a pokazuju statistički veću ekspresiju ERG-a (intenzitet i postotak) u velikoj biopsiji od onih koji ne pokazuju ekspresiju u maloj biopsiji ( $p<0,01$  korišten je t test).

Bolesnici koji u maloj biopsiji pokazuju ekspresiju ERG-a ne pokazuju statistički značajniji broj pozitivnih cilindara u biopsiji ( $p=0,76$  Mann-Whitney U test), ali pokazuju statistički značajno manji postotak karcinoma u velikoj biopsiji od onih koji ne pokazuju ekspresiju u maloj biopsiji ( $p=0,02$ , Mann-Whitney U test). Svi rezultati su prikazani u tablici br.5.

Tablica 5. Prikaz ERG ekspresije za iglenu biopsiju i prostatektomiju

	GG mala biopsija	GG velika biopsija	Kribiformne formacije velika biopsija	Ekspresija ERG-a u velikoj biopsiji	postotak karcinoma u velikoj biopsiji	broj cilindara
mala biopsija ERG -	2.16	2.37	0.47	0	13,1 %	16.1 %
mala biopsija ERG +	1.91	2.16	0.45	2.5	8,4 %	15.6 %
p	0.55	0.53	0.83	manji od 0,01	0.02	0.76

Prema podacima iz povijesti bolesti odnosno Registra za rak niti jedan od 50 bolesnika nije umro zbog karcinoma prostate u istraživanom razdoblju. Pacijenti su i dalje praćeni te će konačni ishod biti predmet daljnjeg istraživanja.

## 6. RASPRAVA

Prema podacima Hrvatskog registra za rak RH karcinom prostate je 2018. godine bio najčešći visceralni tumor u muškaraca u Hrvatskoj dijagnosticiran u 2867 bolesnika (6). Učestalost u Hrvatskoj, ali naravno i u svijetu se značajnije povećava tijekom posljednjih desetljeća nakon uvođenja određivanja PSA i biopsije iglom (31, 34, 39). Prognoza bolesti ponajviše ovisi o stupnju diferenciranosti tumora što se određuje patohistološki i klasificira pomoću Gleason zbroja i skupina gradusa koje su uvedene u rutinsku upotrebu nakon objavljivanja Klasifikacije Svjetske zdravstvene organizacije 2016. g. (32-36). Međutim, još uvijek se vide slučajevi čije biološko ponašanje odudara od većine tumora te postoji potreba za određivanjem dodatnih markera koji bi pomogli u određivanju prognoze i terapije karcinoma prostate.

Jedan od, u posljednje vrijeme istraživanih markera je i ERG. U više od 50% slučajeva adenokarcinoma prostate utvrđena je povišena izraženost gena iz obitelji ETS uključujući i *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, and *FLII*, ali nije primjećena u pacijenata s hiperplazijom prostate (45, 46). Istraživanja karcinoma prostate s prekomjernom ekspresijom ERG proteina pokazale su da gen kodira protein nazvan transmembranska proteaza, serin 2 (TMPRSS2-ERG) i ERG protein (40,41) koji su u normalnoj stanici smješteni blizu jedan drugome na 21 kromosomu. Radi različitih mutacija TMPRSS-ERG kontrolira gen sastavljen od početka TIMPRSS2 sekvence te reducirani dio ERG sekvence što rezultira nastankom skraćenog ERG proteina (40, 41). Većina tumora s prekomjernom ekspresijom ERG-a izražava TMPRSS2-ERG fuziju koja rezultira često, ali ne uvijek agresivnijim karcinomom prostate (42, 43, 44, 45).

Naši rezultati su dijelom u skladu s onima iz literature budući je pozitivna reakcija na ERG utvrđena i u tumorima s nižim Gleason zbrojem.

Neki rezultati iz literature pokazuju da je povišena ekspresija ERG-a povezana s povećanim rizikom recidiva bolesti nakon liječenja klinički lokaliziranog karcinoma prostate zbog djelovanja ERG-a na pospješivanje rasta što se zbiva pod kontrolom *TMPRSS2* gena (42, 45). Učestalost TMPRSS2:ERG je najveća u bijelaca i nalazi se u oko 50% pacijenata u odnosu na 31,3% u Afroamerikanaca i 15,9% u Japanaca (47).

Bolesnici s karcinomom prostate praćeni su tijekom ovog istraživanja i to u razdoblju od 2018. do kraja 2020. godine. U tom relativno kratkom razdoblju niti jedan od pacijenata nije umro zbog osnovne bolesti što je u skladu s previđanjima i podacima iz literature (3, 21, 34, 39).

Naši rezultati pokazuju pozitivnu reakciju na ERG u 22-26% uzoraka dobivenih biopsijom iglom odnosno nakon prostatektomije što je manje nego što se navodi u literaturi, a najvjerojatnije je posljedica relativno malog broja uzoraka i male količine tumora u uzorcima.

Kribriformne formacije koje se inače nalaze u tumorima višeg Gleason zbroja nisu bile statistički značajno povezane s ekspresijom ERG što je također najvjerojatnije uzrokovano malom količinom tumora u uzorcima.

U ovom istraživanju bolesnici koji u biopsiji iglom pokazuju ekspresiju ERG-a nisu imali statistički značajniji broj pozitivnih cilindara u biopsiji ( $p=0,76$  Mann-Whitney U test), ali su imali statistički značajno manji postotak karcinoma u preparatima prostatektomije u odnosu na one koji su imali negativnu reakciju u maloj biopsiji ( $p=0,02$ , Mann-Whitney U test). Ovi rezultati svakako zahtjevaju validaciju na većem broju uzoraka.

Osim toga je pokazano da su skoro svi uzorci biopsije iglom koji su bili pozitivni na ERG ujedno bili jako pozitivni i u uzorcima istih bolesnika nakon prostatektomije. Ovakav nalaz upućuje na moguću primjenu određivanja ekspresije ERG u potvrđivanju dijagnoze adenokarcinoma prostate na maloj biopsiji.

Svakako je potrebno provesti istraživanje na većem uzorku kako bi se potvrdili ovi rezultati što bi u konačnici proširilo spektar protutijela koja se mogu primijeniti u svrhu postavljanja dijagnoze karcinoma prostate na biopsiji iglom što je ponekad vrlo teško.

## 7. ZAKLJUČAK

1) Nije utvrđena statistički značajna razlika u Gleason zbroju niti gradusu između bolesnika s povišenom izraženosti ERG i onih s negativnom imunohistokemijskom reakcijom ( $p=0,55$ , Mann-Whitney U test).

2) Također nije utvrđena povezanost između ekspresije ERG i nazočnosti kribriformnih formacija ( $p=0,53$ , Mann-Whitney U test).

3) Bolesnici koji u maloj biopsiji pokazuju ekspresiju ERG-a imali su statistički značajno manji postotak karcinoma u velikoj biopsiji od onih koji ne pokazuju ekspresiju u maloj biopsiji ( $p=0,02$ , Mann-Whitney U test).

4) Bolesnici koji u maloj biopsiji pokazuju ekspresiju ERG-a pokazuju statistički veću ekspresiju ERG-a (intenzitet i postotak) u velikoj biopsiji od onih koji ne pokazuju ekspresiju u maloj biopsiji ( $p<0,01$  korišten je t test). Ovakav nalaz sugerira mogućnost primjene ERG u potvrdi dijagnoze karcinoma u biopsiji i glom budući su svi slučajevi pozitivni na maloj biopsiji pokazivali pozitivnu reakciju i na uzorcima prostatektomije.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti ekspresiju ERG proteina u preparatima iglene biopsije prostate bolesnika s dijagnosticiranim karcinomom prostate i usporediti s ekspresijom u uzorcima tumora nakon radikalne prostatektomije istih bolesnika.

**Ustroj studije:** Studija je ustrojena kao presječna studija s povijesnim podacima.

**Bolesnici i metode:** U ovom radu su analizirani podaci bolesnika s adenokarcinomom prostate kojima je učinjena biopsija prostate iglom i prostatektomija u razdoblju od 01. siječnja 2018. do 31. prosinca 2020. godine. Dob bolesnika uključenih u studiju bio je u rasponu od 55 do 86 godina starosti (medijan 68 godina). Imunohistokemijska reakcija na ERG određivala se semikvantitativno: do 25% pozitivnih tumorskih stanica (+), >25-50% (++), >50% (+++), te je svrstana u tri skupine; slabo, umjereno i jako pozitivna reakcija.

**Rezultati:** Nije utvrđena statistički značajna razlika u Gleason zbroju niti gradusu između bolesnika s povišenom izraženosti ERG i onih s negativnom imunohistokemijskom reakcijom ( $p=0,55$ ) kao niti utvrđena povezanost između ekspresije ERG i nazočnosti kribriformnih formacija ( $p=0,53$ ). Bolesnici koji su u biopsiji iglom pokazali ekspresiju ERG-a imali su statistički značajno manji postotak karcinoma u uzorcima prostatektomije od onih koji ne pokazuju ekspresiju u maloj biopsiji ( $p=0,02$ ). Bolesnici koji u biopsiji iglom pokazuju ekspresiju ERG-a imali su statistički veću ekspresiju ERG-a (intenzitet i postotak) u preparatima prostatektomije od onih koji ne pokazuju ekspresiju u maloj biopsiji ( $p<0,01$ ).

**Zaključak:** Na temelju rezultata ovog rada može se zaključiti da je ekspresija ERG proteina povišena u 22% bolesnika u biopsiji iglom i 26% uzoraka analiziranih tumora nakon prostatektomije.

**Ključne riječi:** karcinom prostate, ERG ekspresija, Gleason zbroj, iglena biopsija, prostatektomija

## 9. SUMMARY

Immunohistochemical expression of ERG in needle core biopsies and prostatectomy specimens of the same patients

**Study objective:** To determine the expression of ERG protein in preparations of prostate needle biopsy in patients with diagnosed prostate cancer and compare them with the expression in cancer samples after radical prostatectomy of the same patients.

**Study design:** Cross-sectional retrospective study.

**Patients and methods:** In this paper, the data were analyzed of prostate carcinoma patients who underwent needle biopsy and prostatectomy in the period from January 1<sup>st</sup> 2018 to December 31<sup>st</sup> 2020. The age of patients included in the study ranged from 55 to 86 (the average age being 68 years). Immunohistochemical reaction to the ERG protein was determined semiquantitative, up to 25% of positive tumor cells (+), >25-50% (++), >50% (+++), grouped into three groups, a weak, moderately strong and highly positive reaction.

**Results:** There was no statistically significant difference between two groups regarding Gleason score or grade groups and positive or negative expression of ERG protein ( $p=0,55$ ) as well as ERG expression and the presence of cribriform structures ( $p=0,53$ ). Patients with positive ERG staining in needle core biopsy had statistically significantly less quantity of tumor in prostatectomy specimens comparing with those with negative staining in small biopsies ( $p=0,02$ ). Patients with positive ERG staining in needle core biopsy had statistically significant stronger ERG protein expression in prostatectomy specimens comparing patients with initially negative immunostaining ( $p<0,01$ ).

**Conclusion:** Based on the results of this paper one can conclude that the expression of ERG protein is increased in 22% of patients with needle biopsy and 26% of samples of cancer analyzed after prostatectomy.

**Key words:** prostate cancer (carcinoma), ERG expression, Gleason score, needle biopsy, prostatectomy



## 10. LITERATURA (referencije)

1. Aumuller G. i grupa autora, ANATOMIJA Duale Reihe, 3., prerađeno izdanje, MEDICINSKA NAKLADA ZAGREB, 2018, str. 833-835.
2. Krmpotić-Nemanić J.: Anatomija čovjeka, 3. izdanje: JUGOSLAVENSKA MEDICINSKA NAKLADA ZAGREB, 1982, str. 869-871.
3. Šamija M. i sur.: Rak prostate- najvarijabilniji zloćudni tumor: MEDICINSKA NAKLADA 2009, str.11-12.
4. Duančić V. : Osnove embriologije čovjeka. 9. izdanje, Beograd – Zagreb: Medicinska knjiga 1985, str. 145.
5. Junqueira L. C. , Carneiro J.: Osnove histologije udžbenik i atlas prema desetom američkom izdanju; Školska knjiga, Zagreb 2005: str. 443-446
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2018, Bilten br. 43. Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2020.
7. Europski informacijski sustav za rak (ECIS). Dostupno na <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>, datum pristupa 18.6.2021.
8. Jemal A., Centar MM, Desantis C, Ward EM. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trend, August, 2010., 19(8): 1893-907.
9. Mattiuzzi C., Lippi G., Current cancer Epidemiology, J Epidemiol Glob Health, 2019 Dec, 9 (4): 217-222
10. Myers RE African American men, prostate cancer early detection examination use, and informed decision-making. Semin Oncol 1999;26:375-81
11. Jemal A. Siegel R, Xu J, Ward E, cancer statistisc, 2010 CA Cancer J Clin 2010;60:227-300
12. Jemal A, Thomas A, Murray T, ThunMJ, cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2002;52:23-47
13. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. Prostate 1990;17:337-47
14. Rodrigez C, Cale EE, Miracle – McMahill HL, i sur. Familiy history and risk of fatal prostate cancer. Epidemiology 1997;8:653-7.
15. Gittes RF. Carcinoma of the prostate. : Engl J Med 1991, 324:236-245
16. Santen RJ. Endocrine treatment of prostate cancer. J Clin Endocrinol Matab 1992;75:685-9.
17. Bentel J, Tilley WD. Androgen receptors in prostate cancer. J Endocrinol 1996;151:1-11
18. Visacorpi T. The molecular genetics of prostate cancer. Urology 2003;62:3-10
19. Klein EA. What is insignificant prostate carcinoma? Cancer 2004;101:1923-5.

20. Garfinkel L, Mushinski M. Cancer incidence, mortality and survival trends in four leading sites. *Stat Bull Metrop Insur Co* 1994;75:19-27
21. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M i sur. European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol* 2011;59 (1): 61-71
22. Kadow C, Gingell JC, Penry JB. Prostatic ultrasonography. A useful technique? *Br J Urol* 1985;57:440-443
23. Lazzeri M, Guazzoni G, Montorsi F. Total and Free PSA, PCA3, PSA Density and Velocity, <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/total-and-free-psa-pca3-psa-density-and-velocity> Datum pristupa, 18.06.2021.
24. Horwich A, Hugosson J, De Reijke T, Wiegel T, Fizazi F, Kataja K & Panel Members: Prostate cancer: ESMO Consensus Conference Guidelines 2012. *Ann Oncol* 2013; Horwich A, Hugosson J, De Reijke T, Wiegel T, Fizazi F, Kataja K & Panel Members: Prostate cancer: ESMO Consensus Conference Guidelines 2012. *Ann Oncol* 2013, 24:P1141-62
25. Mottet N, Bellmunt E, Bolla M, i sur. EAU-ESTRO-ESUR-SIOG. Guidelines on Prostate Cancer 2018. Dostupno na <https://uro-web.org/guideline/prostate-cancer/>. Datum pristupa 19.06.2021.
26. Parker C, Gillessen C, Heidenreich A i sur. Cancer of the prostate: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26(Supl.5):v69-77.
27. McNeal J, Yemoto C. Spread of adenocarcinoma within prostatic ducts and acini: morphologic and clinical correlations. *Am J Surg Pathol* 1996;20:802-14
28. Spajić B, Čupić H, Tomas D, Štimac G, Krušlin B, Kraus O. The incidence of hyperechoic prostate cancer in transrectal ultrasound guided biopsy specimens. *Urology* 2007;70:734-7
29. Fučkar Ž, Tucak A. Transrektalna sonografija prostatovezikularnog segmenta (prva iskustva). *Med Vjesn* 1985;17:25-7
30. Epstein JI. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Mod Pathol* 2004; 17:307-15
31. Krušlin B, Tomas D, Spajić B. Patohistološka dijagnostika karcinoma prostate biopsijom iglom. *Liječ Vjesn* 2010;132:155-61
32. Gleason DF Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:128-8
33. Gleason DF, Mellinger GT; The Veterans Administration Cooperative Urological research Group. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combine hystologic grading and clinical staging. *J Urol* 1974;111:58-64
34. Moch H, Humprey PA, Ulbright TM, Reuter VE; WHO Classification of tumors of the urinary system and male genital organs. 7. izd. Lyon: International Agency for Research of Cancer; 2016, str. 152-4

35. Epstein JI, An update of the Gleason grading system. *J Urol* 2010; 183:433-40
36. Epstein JI, Egevold L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humprey PA, Grading Committee. The 2014. International Society of Urological Pathology (ISUP). Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Definition of Grading Patterns and Proposals for a New Grading System. *Am J Surg Pathol* 2016;40:244-52
37. Ayala G, Frolov A, Chatterjee D, He D, Hilsenbeck SG, Ittmann M, Expression of ERG protein in prostate cancer: variability and biological correlates. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Jun; 22(3): 277–287.
38. Minner S, Gartner M, Freudenthaler F, Bauer M, Kluth M, Salomon G, Heinzer H, Graefen M, Bokemeyer C, Simon R, et al. Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. *Mod Pathol*. 2013;26(1):106–16
39. Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M. *Patologija*, 4. izdanje. Medicinska naklada: Zagreb 2014;655.
40. Furusato B, Tan SH, Young D et al. ERG oncoprotein expression in prostate cancer: clonal progression of ERG-positive tumor cells and potential for ERG-based stratification. *Prostate Cancer Prost Dis* 2010;13:228–237.
41. Miettinen M, Wang ZF, Paetau A et al. “ERG transcription factor as an immunohistochemical marker for vascular endothelial tumors and prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2011;35: 432–441.
42. Park K, Tomlins SA, Mudaliar KM et al. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia*, 2010;12:590–8.
43. Chaux A, Albadine R, Toubaji A et al. Immunohistochemistry for ERG expression as a surrogate for TMPRSS2-ERG fusion detection in prostatic adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1014–1020.
44. NordiQC. Dostupno na adresi: <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=1>. Datum pristupa 17.06.2021.
45. Kruslin B, Skara L, Vodopic T, et al. Genetics of prostate carcinoma. *Acta med acad* 2021;50:71-87
46. Network CGAR. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011-25.
47. Magi-Galluzzi C, Tsusuki T, Elson P, Simmerman K, LaFargue C, Esgueva R, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion prevalence and class are significantly different in prostate cancer of Caucasian, African-American and Japanese patients. *Prostate*. 2011;71(5):489-97.

## 11. ŽIVOTOPIS

JELENA BARAĆ ŽUTELIJA, bacc.med.lab.dijag.

Klinički zavod za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“

KBC Sestre milosrdnice

Vinogradska 29

10000 ZAGREB

Datum i mjesto rođenja:

12.srpnja 1967., Livno

Kućna adresa:

Mate Lovraka 35

10410 VELIKA GORICA

### OBRAZOVANJE:

Od 2019.: studentica II. godine Sveučilišnog diplomskog studija medicinsko laboratorijske dijagnostike Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

2012.: završeno Zdravstveno Veleučilište Zagreb, razlikovna godina - smjer baccalaurea medicinsko - laboratorijske dijagnostike.

1992. - 1993.: pripravnički staž na Kliničkom zavodu za patologiju, KBC Rebro

1987. – 1990.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, završen studij za inženjera medicinsko laboratorijske dijagnostike.

1982. – 1986.: završena srednja medicinska škola pri gimnaziji u Livnu

### RADNO ISKUSTVO:

1992. – 1996. : Klinički zavod za patologiju - KBC Rebro

1996. – 1999.: Institut Ruđer Bošković

1990. – 2017.: Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2017. – do danas.: Klinički zavod za patologiju i citologiju „Ljudevit Jurak“, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb

### ČLANSTVO I AKTIVNOSTI U STRUKOVNIM UDRUGAMA:

2003. – 2007.: članstvo u HULM-a, član Nadzornog odbora HULM-a

2003 – 2007.: predsjednica patohistološke sekcije pri HULM-u

2016. - članstvo u Hrvatskoj komori zdravstvenih radnika

### AKTIVNA SUDIONICA NA STRUČNIM SKUPOVIMA:

2008. Rovinj: Prvi kongres Hrvatske udruge laboratorijske medicine sa poster prezentacijom,

2009. Mali Lošinj: Drugi kongres Hrvatske udruge laboratorijske medicine i prva nagrada u kategoriji poster prezentacije