

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

PRAHA 2008

MUDr. JIŘÍ HERÁČEK



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. lékařská fakulta

MUDr. Jiří Heráček

**Hormonální profil u mužů s lokalizovaným a
lokálně pokročilým karcinomem prostaty**

Disertační práce

Praha, 2008

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Jiří Heráček

Název dizertační práce: Hormonální profil u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým karcinomem prostaty
Hormonal profile in men with localized and locally advanced prostate cancer

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školitel: Doc. MUDr. Michael Urban

Rok obhajoby: 2008

Klíčová slova: karcinom prostaty, benigní hyperplázie prostaty, radikální prostatektomie, hormony, androgeny, estrogeny, adiponectin, rezistin, imunohistochemie
prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, radical prostatectomy, hormones, androgens, estrogens, adiponectin, resistin, immunohistochemistry

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych touto cestou poděkoval svému školiteli doc. MUDr. Michaelu Urbanovi přednostovi Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV za to, že mi umožnil postgraduální studium a výzkum v oblasti experimentální chirurgie i za jeho metodické vedení a cenné připomínky k mé práci.

Mé poděkování patří i prof. RNDr. Richardu Hamplovi, DrSc. z Endokrinologického ústavu za cenné rady a pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Děkuji všem členům naší pracovní skupiny, především pak MUDr. Jitce Kuncové, PhD. z Urologického oddělení v Pise v Itálii, MUDr. Janě Sachové z Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, MUDr. Václavu Eisovi a MUDr. Danielu Housovi, PhD. z Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV.

Práce by nemohla vzniknout bez obětavé pomoci sestřiček z naší kliniky Jany Špálové a Jany Vlasákové.

V neposlední řadě bych rád poděkoval paní Marii Liškové za jazykovou korekturu tohoto textu.

Na závěr chci poděkovat své manželce Mirce a dětem Lucii a Adamovi za zázemí, které bylo jedním z hlavních předpokladů pro vypracování předkládané práce.

OBSAH

OBSAH	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
1. ÚVOD	6
1.1 Seznam publikací a prezentací k tématu	7
2. PŘEHLED LITERATURY	9
2.1 Prostata	9
2.2 Karcinom prostaty	10
2.2.1 <i>Epidemiologie</i>	10
2.2.2 <i>Klinické příznaky</i>	12
2.2.3 <i>Diagnóza</i>	13
2.2.4 <i>Léčba</i>	17
2.3 Hormony a karcinom prostaty	27
3. CÍLE PRÁCE	32
4. PUBLIKACE č. 1: Tkáňové a sérové koncentrace hlavních androgenů u pacientů s benigní hyperplázií prostaty a s karcinomem prostaty	33
5. PUBLIKACE č. 2: Endokrinní profil muže s lokalizovaným a lokálně pokročilým karcinomem prostaty léčeným radikální prostatektomií	36
6. PUBLIKACE č. 3: Adiponectin jako potenciální marker progresu karcinomu prostaty: studie u lokalizovaného a lokálně pokročilého karcinomu prostaty	39
7. PUBLIKACE č. 4: Sérové koncentrace rezistinu u benigní hyperplázie prostaty a non metastatického karcinomu prostaty: potenciální role v progresi karcinomu	43
8. SOUHRN	46
9. LITERATURA	48
10. PŘÍLOHY	55
10.1	Heráček, Steroids 2007
10.2	Heráček, Neuroendocrinology Letters 2007
10.3	Heráček, European Urology Supplements 2007
10.4	Heráček, European Andrology Supplement 2007
10.5	Heráček, Česká urologie 2007
10.6	Housa, Physiological Research 2008
10.7	Housa, Neoplasma 2008

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AE	androstendion
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
BMI	body mass index
BPH	benigní prostatická hyperplázie
CRP	C-reaktivní protein
DHEAS	dehydroepiandrosteron sulfát
DHT	dihydrotestosteron
ELISA	enzymová analýza s enzymem vázaným na imunosorbent (enzyme-linked immuno sorbent assay)
epiT	epitestosteron
E2	estradiol
FAI	aktivita volného testosteronu (free androgen index)
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
free T	volný testosteron
free PSA	volná frakce prostatického specifického antigenu
FSH	folikulostimulační hormon
GS	Gleasonovo skóre
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
HOMA	model homeostázy (homeostasis model assessment)
Chol	cholesterol
IGA MZ	Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví
IRMA	imunoradiometrické měření (immunoradiometric assay)
JNK	c-Jun NH ₂ -terminální kináza
KP	karcinom prostaty
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
LH	luteinizační hormon
P	progesteron
PRL	prolaktin
PSA	prostatický specifický antigen
5 α -RD	5 α -reduktáza
RIA	radioimunologická analýza (radioimmunoassay)

RRP	radikální retropubická prostatektomie
SHBG	globulin vázající sexuální hormony (sexual hormones binding globulin)
STAT 3	signální přenašeč a aktivátor transkripce 3 (signal transducer and activator of transcription 3)
SZÚ	Státní zdravotní ústav
T	testosteron
TG	triglyceridy
TNM	klasifikace zhoubných nádorů hodnotící rozsah primárního nádoru (T), postižení mízních uzlin (N) a přítomnost vzdálených metastáz (M)
TRUS	transrektální ultrasonografie prostaty
TVPE	transvezikální prostatektomie
UK	Univerzita Karlova v Praze
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
VZ	Výzkumný záměr
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

1. ÚVOD

Disertační práce je zpracována formou souboru publikací, které se zabývají hormonálním prostředím u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým karcinomem prostaty (KP) a s benigní hyperplázií prostaty (BPH).

Zahrnuje celkem 4 experimentální práce, které vznikly na pracovištích s dlouholetou zkušeností v grantových projektech a výzkumných záměrech. Práce byly podpořeny z finančních zdrojů IGA MZ (NR8096 Vztah mutací genu pro androgenní receptor a změny exprese androgenního receptoru v karcinomu prostaty k biologickým vlastnostem nádoru a hormonálnímu profilu pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty, 2004-2006, hodnocen „A“) a dvou výzkumných záměrů (MSM0021620808 Molekulárně biologické, genetické a epigenetické aspekty vzniku a rozvoje modelových tumorů dospělého věku. Význam pro epidemiologii, časnou diagnostiku a léčbu pro roky, 2007-2011 a MZOVFN2005 Diagnostika a léčba geneticky podmíněných poruch II, 2005-2011).

V publikaci číslo 1. porovnááme sérové koncentrace a koncentrace hormonů v prostatické tkáni u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP, kteří podstoupili radikální retropubickou prostatektomií (RRP) a s BPH, kteří postoupili transvezikální prostatektomií (TVPE).

Publikace číslo 2. se zabývá sérovými koncentracemi hormonů u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP po RRP.

Publikace číslo 3. a 4. vyhodnocují sérové koncentrace adiponektinu, rezistinu, imunohistochemickou expresi těchto hormonů v prostatické tkáni, histopatologické charakteristiky nádoru a další parametry u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP, kteří podstoupili RRP a u mužů s BPH, kteří podstoupili TVPE.

Práce je výsledkem spolupráce těchto pracovišť:

- Urologická klinika 3. LF UK a FNKV
- Endokrinologický ústav
- Ústav patologie 3. LF UK a FNKV
- Ústav biochemie a patobiochemie 3. LF UK a FNKV
- Urologické oddělení University v Pise v Itálii
- Oddělení biostatistiky a informatiky SZÚ
- 3. interní klinika 1. LF UK a VFN.

1.1 Seznam publikací a prezentací k tématu

Původní práce (IF; SCI, autocitace vyloučeny):

1. HERÁČEK, Jiří a HAMPL, Richard a HILL, Martin a STÁRKA, Luboslav a SACHOVÁ, Jana a KUNCOVÁ, Jitka a EIS, Václav a URBAN, Michael a MANDYS, Václav. Tissue and Serum Levels of Principal Androgens in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *Steroids*, 2007, vol. 72, no. 4, p. 375-380. ISSN 0039-128X. [Grant NR8096, **IF 2,143**, SCI 4, původní]
2. HERÁČEK, Jiří a URBAN, Michael a SACHOVÁ, Jana a KUNCOVÁ, Jitka a EIS, Václav a MANDYS, Václav a HAMPL, Richard a STÁRKA, Luboslav. The Endocrine Profiles in Men with Localized and Locally Advanced Prostate Cancer Treated with Radical Prostatectomy. *Neuroendocrinology Letters*, 2007, vol. 28, no. 1, p. 101-107. ISSN 0172-780X. [Grant NR8096, **IF 1,443**, SCI 1, původní]
3. HOUSA, Daniel a VERNEROVÁ, Zdeňka a HERÁČEK, Jiří a PROCHÁZKA, Bohumír a ČECHÁK, Petr a KUNCOVÁ, Jitka a HALUZÍK, Martin. Adiponectin as a Potential Marker of Prostate Cancer Progression: Studies in Organ-Confined and Locally Advanced Prostate Cancer. *Physiological Research*, 2008, vol. 57, no. 3, p. 451-458. ISSN 0862-8408. [Grant NR8096, VZ MSM0021620808, **IF 1,505/2007**, původní]
4. HOUSA, Daniel a VERNEROVÁ, Zdeňka a HERÁČEK, Jiří a ČECHÁK, Petr a ROSOVÁ, Blanka a KUNCOVÁ, Jitka a HALUZÍK, Martin. Serum Resistin Levels in Benign Prostate Hyperplasia and Non-Metastatic Prostate Cancer. *Neoplasma*, 2008, vol. 55, no. 5, p. 442-446. ISSN 0028-2685. [VZ MZOVFN2005, **IF 1,208/2007**, původní]

Přednášky na kongresu:

1. HERÁČEK, Jiří a HILL, Martin a HAMPL, Richard a STÁRKA, Luboslav a SACHOVÁ, Jana a KUNCOVÁ, Jitka a URBAN, Michael a EIS, Václav a MANDYS, Václav. Tissue and Serum Levels of Principal Androgens in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *European Urology Supplements*, 2007, vol. 6, no. 2, p. 45. 22nd Annual Congress of the European Association of Urology, 21-24.3.2007, Berlín, Německo. ISSN 1569-9056. [Grant NR8096, **IF 2,507**, abstrakt]
2. HERÁČEK, Jiří a HAMPL, Richard a HILL, Martin a STÁRKA, Luboslav a SACHOVÁ, Jana a KUNCOVÁ, Jitka a EIS, Václav a URBAN, Michael a

MANDYS, Václav. Tissue and Serum Levels of Principal Androgens in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. *European Andrology Supplement*, 2007, vol. 1, no. 1, p. 58. 2nd Czech and International Congress of Andrology, 3.-5.5.2007, Štířín, Česká republika. ISSN 1802-4793. [abstrakt]

3. HERÁČEK, Jiří a URBAN, Michael a SACHOVÁ, Jana a KUNCOVÁ, Jitka a EIS, Václav a MANDYS, Václav a HAMPL, Richard a STÁRKA, Luboslav. The Endocrine Profiles in Men with Localized and Locally Advanced Prostate Cancer Treated with Radical Prostatectomy. *European Andrology Supplement*, 2007, vol. 1, no. 1, p. 29. 2nd Czech and International Congress of Andrology, 3.-5.5.2007, Štířín, Česká Republika. ISSN 1802-4793. [abstrakt]
4. HERÁČEK, Jiří a URBAN, Michael a LUKEŠ, Martin a SACHOVÁ, Jana a KUNCOVÁ, Jitka a HAMPL, Richard a STÁRKA, Luboslav a HILL, Martin a EIS, Václav a MANDYS, Václav. Endokrinní profil muže s lokalizovaným a lokálně pokročilým karcinomem prostaty po radikální prostatektomii. (Hormonal Profile in Men with Localized and Locally Advanced Prostate Cancer) *Česká urologie*, 2007, vol. 11, no. 1, p. 18. Výroční konference ČUS ČLS JEP, Plzeň, 10.-12.10.2007, Česká republika. ISSN 1211- 8729. [abstrakt]

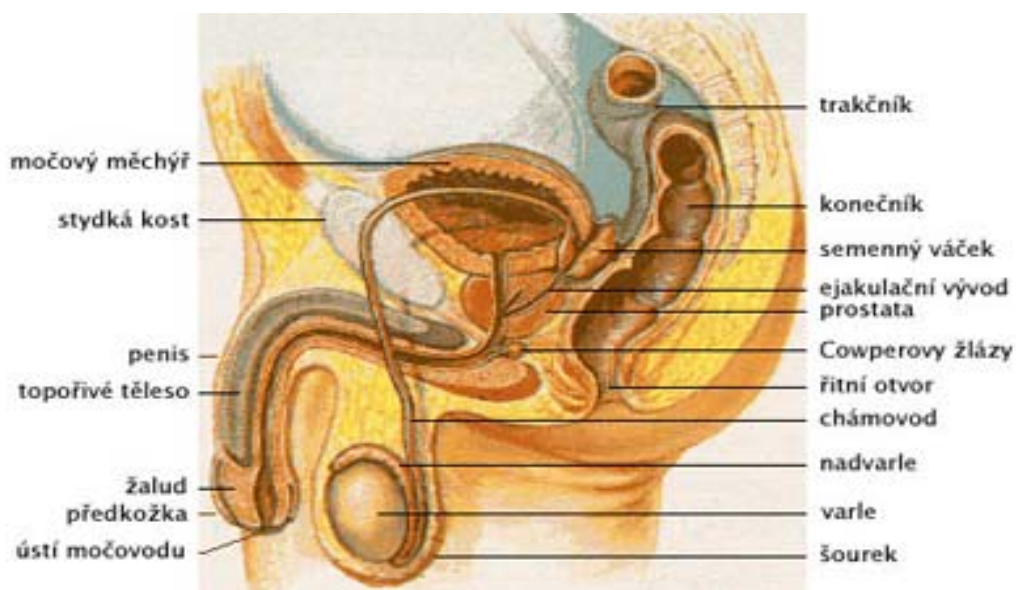
2. PŘEHLED LITERATURY

2.1 Prostata

Prostata (předstojná žláza) je přídatná mužská pohlavní žláza, která je součástí mužského reprodukčního systému. Je uložena těsně pod močovým měchýřem, kde jako prstenec obklopuje začátek močové trubice. Pod prostatou je přední stěna konečníku, na jejíž každé straně vedou důležité nervy a cévy. Prostata je tvořena dvěma laloky (pravým a levým). Část, která je nejdál od močového měchýře, se nazývá apex, část dotýkající se močového měchýře se nazývá baza. Žláza má tvar komolého, předozadně mírně oploštělého kužele, obráceného bazí vzhůru k močovému měchýři. Prostatou prochází močová trubice a ejakulární vývod. Na zadní stěně uretry ústí ejakulární dukty a také vývody žlázek prostaty.

Makroskopicky se prostata dělí na pět žlázových laloků, které jsou však zřetelné pouze během prenatálního vývoje. V dospělosti jsou tyto laloky spojeny v kompaktní žlázu. Na povrchu prostaty jsou patrné pouze laterální laloky (pravý a levý) a dále zadní lalok, kdežto dva malé laloky leží v hloubce. Střední lalok leží za uretrou, v úhlu mezi ní a ústími ejakulárních duktů. Přední lalok, v němž však převažuje vazivo a svalovina, leží před uretrou.

Prostatou prochází prostatická část močové trubice. Kaudálně od prostaty je membranózní část močové trubice obtáčena snopci svěrače z příčně pruhovaného svalstva [12].



Obrázek č. 1: Podélný řez mužskou pánví

Prostatu tvoří okolo 30-50 typických prostatických žlázek, prostor mezi nimi (stroma) je vyplněn vazivem a buňkami hladké svaloviny. Stroma je typicky uloženo okolo močové trubice, zatímco žlázy jsou na periférii prostaty. Prostata je obklopena pevným vazivovým pouzdrém.

U novorozence má prostata sotva velikost hrášku a její hmotnost se pohybuje od 3 do 5 gramů. Objem a hmotnost se nemění až do puberty, kdy působením androgenů dochází k její stimulaci a růstu. U dospělého muže ve věku 20 let prostata váží přibližně 20 gramů. Tak tomu je až do 4.-5. dekády života, pak se u naprosté většiny mužů žláza začíná zvětšovat.

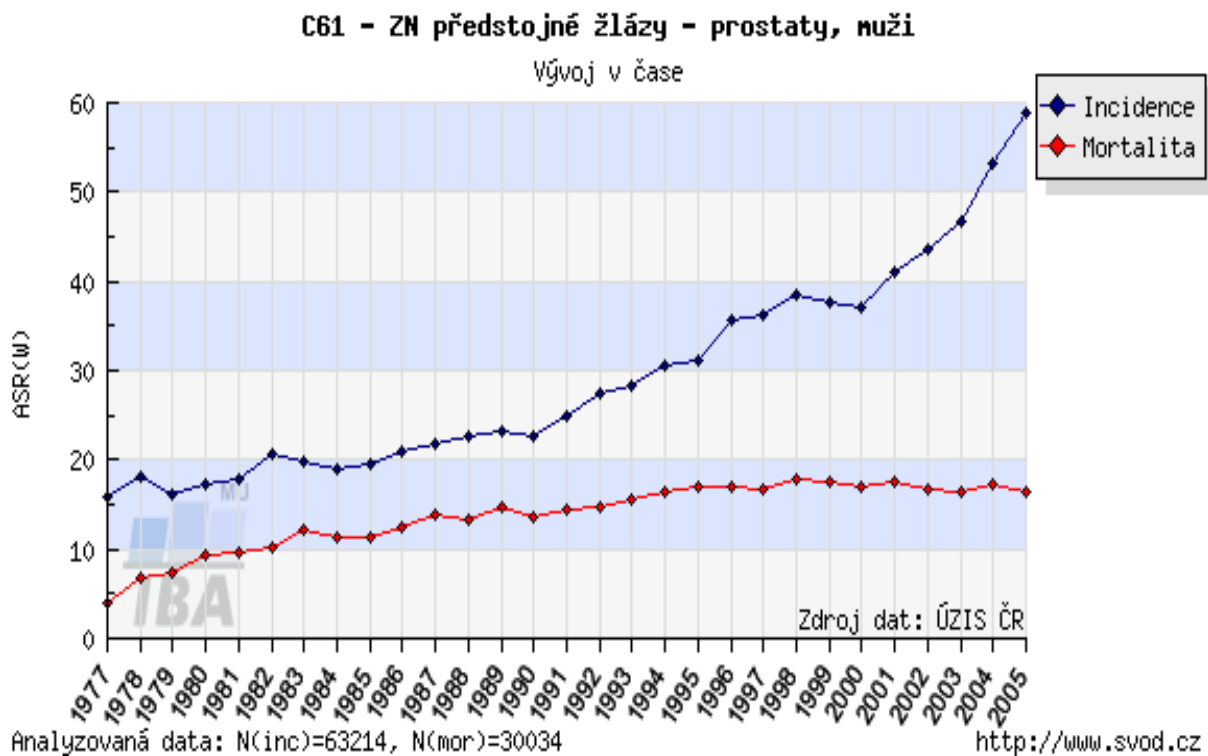
Prostata produkuje sekret, který tvoří 15-30 % objemu ejakulátu. Výměšek je tekutý, bezbarvý, kyselé reakce (pH 6,4), obsahuje zinek, kyselinu citrónovou, prostaglandiny, polyaminy - spermin a spermidin, imunoglobuliny, kyselou fosfatázu a proteázy. Zinek ovlivňuje metabolismus testosteronu (T) v prostatě, mimo to se v komplexu přikládá na buněčnou membránu spermií. Kyselina citrónová ve formě citrátů má funkci pufru, prostaglandiny stimulují svalovinu dělohy a přispívají tím k transportu spermií, spermin ovlivňuje pohyblivost spermií a jejich schopnost oplodnit vajíčko, proteázy způsobují řídnutí ejakulátu. Ke svému růstu a správné funkci potřebuje prostata androgeny, z nich pak především T [1].

2.2 Karcinom prostaty

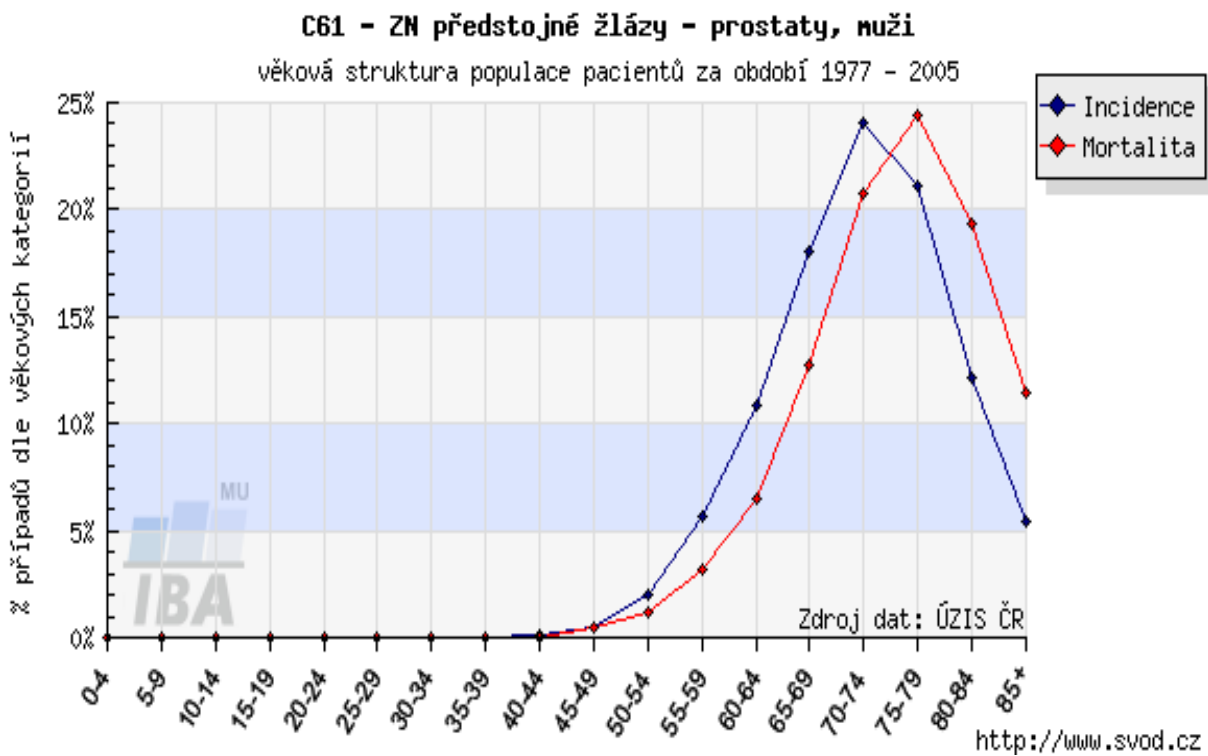
2.2.1 Epidemiologie

Karcinom prostaty (KP) je v současné době považován za jeden z hlavních medicínských problémů v mužské populaci. V Evropě každý rok diagnostikujeme 2,6 miliónu nových pacientů s KP. Jedenáct procent všech nádorů v mužské populaci tvoří právě KP, který je také zodpovědný za 9 % všech úmrtí na zhoubný nádor v zemích Evropské unie [8,9]. V roce 2005 byla v České republice incidence KP 59/100 000 mužů a mortalita 16/100 000 mužů [14].

U padesátiletého muže s životním výhledem 25 let je riziko mikroskopického nálezu KP 30 %, klinicky signifikantního nálezu 10 % a riziko úmrtí na KP 3 %. Nejnovější epidemiologické údaje svědčí o tom, že muž s lokalizovaným a dobře diferencovaným KP má 9 % riziko úmrtí na tento karcinom do 15 let. Výskyt karcinomu narůstá ve vyšším věku. Více než 75 % nově zjištěných případů KP postihuje muže starší 65 let. Narůstá však i incidence KP ve věkové skupině 50–59 let, kde v roce 2005 dosáhla incidence 124/100 000 mužů [14].

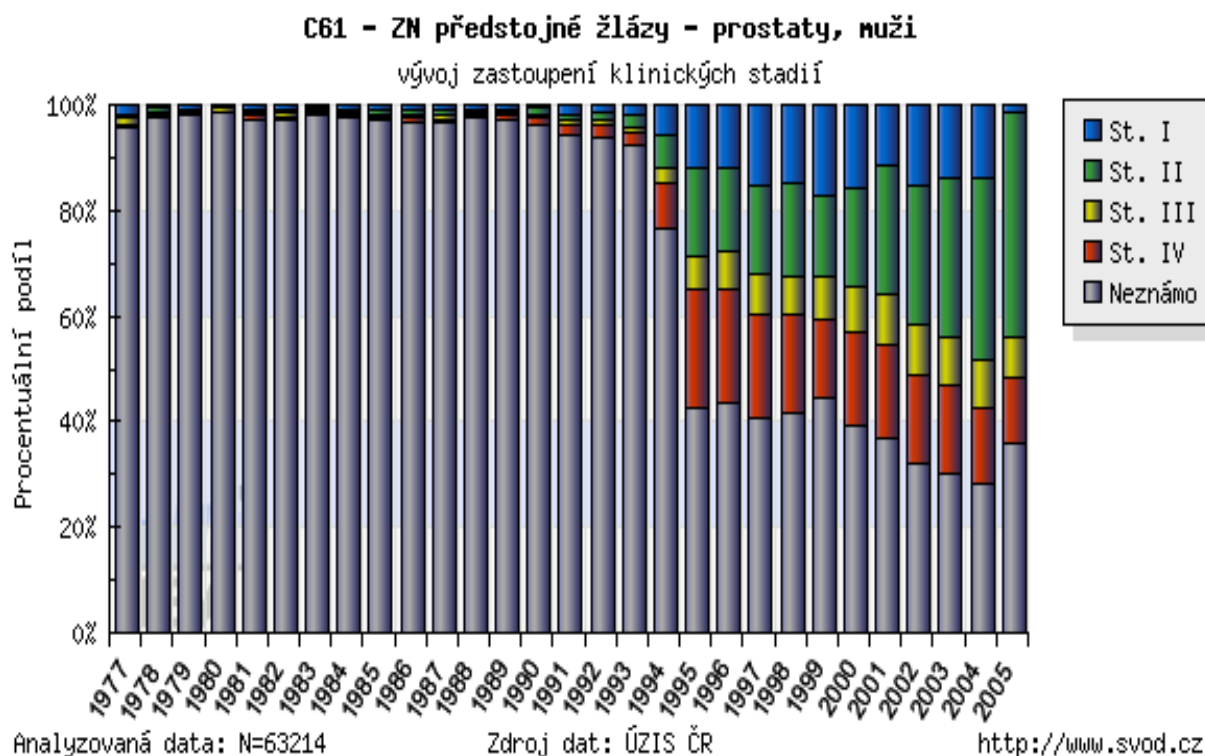


Graf č. 1: Incidence a mortalita karcinomu prostaty v České republice



Graf č. 2: Věková struktura mužů s karcinomem prostaty v letech 1977-2005

Přibližně 50 % pacientů má stanovenou diagnózu v době lokalizovaného onemocnění, necelých 20 % pak v době generalizace. Přes zavedení prostatického specifického antigenu (PSA) do diagnostiky KP zůstává v době stanovení diagnózy nepříznivě vysoký podíl pokročilého onemocnění.



Graf č. 3: Vývoj zastoupení klinických stadií karcinomu prostaty v letech 1977-2005

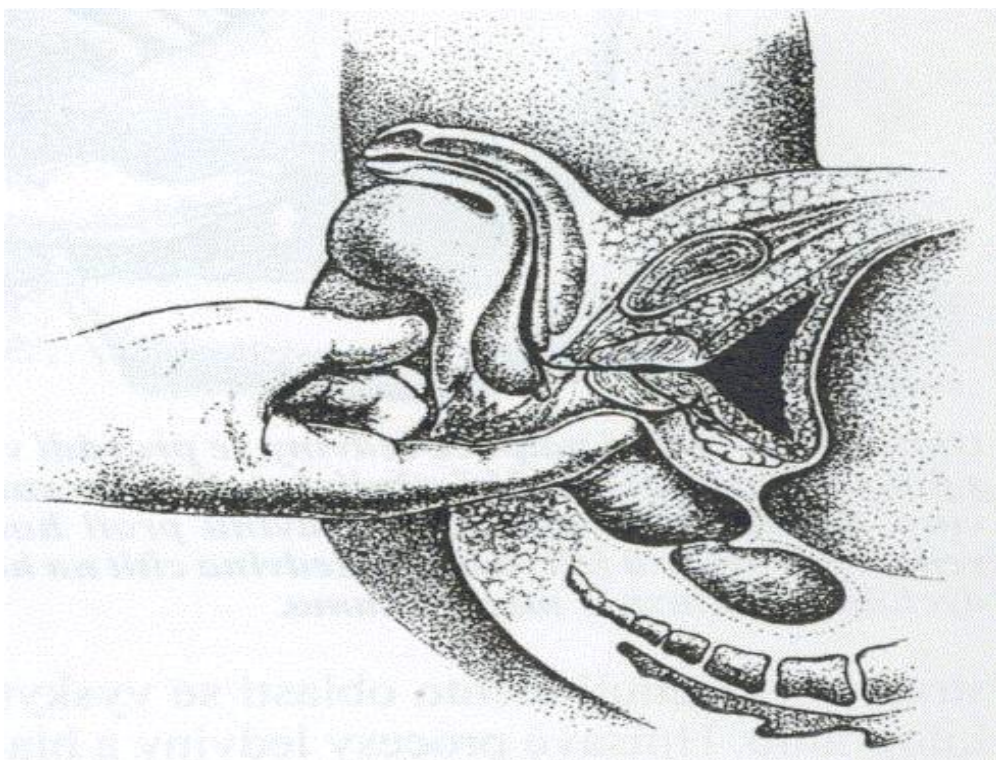
2.2.2 *Klinické příznaky*

KP ve stádiu, kdy je vyléčitelný, nevyvolává zpravidla vůbec žádné příznaky. Pokud je vyvolává, jedná se často již o pokročilý nádor, jehož vyléčitelnost je sporná. V 80 % vzniká karcinom v periferní zóně prostaty, jen ve 20 % v přechodné zóně. Šíří se zpravidla nejprve do pouzdra, později dochází následkem útlaku močové trubice k příznakům obstrukčním nebo při dráždění spodiny močového měchýře k příznakům iritačním. 30-40 % nemocných přichází k vyšetření pozdě, v době generalizace nádoru. Nádor metastazuje do regionálních uzlin v malé pánvi. Hematogenní cestou vytváří především osteoplastické metastázy v kostech pánve, páteře a hrudního koše. Lokálně může prorůstat do spodiny měchýře. KP nemusí vykazovat žádné typické příznaky řadu let. Pokud roste v prostatě, neprojevuje se většinou žádnými obtížemi, při jeho zvětšení se pak mohou objevit mikční obtíže jako u BHP. Symptomy způsobené prorůstáním nádoru do okolí zahrnují obtížné močení, hematurii, hemospermii, retenci moče, bolestivou ejakulaci (prorůstání nádoru do semenných váčků),

měštnání moče v horních močových cestách (prorůstání do baze měchýře a močovodů). Příznaky, které souvisejí s metastatickým postižením kostí a lymfatických uzlin se projevují jako bolesti v kostech, častá bolest nebo strnulost v dolní části zad, bocích nebo v horní části stehen, anémie, úbytek na váze nebo otoky dolních končetin.

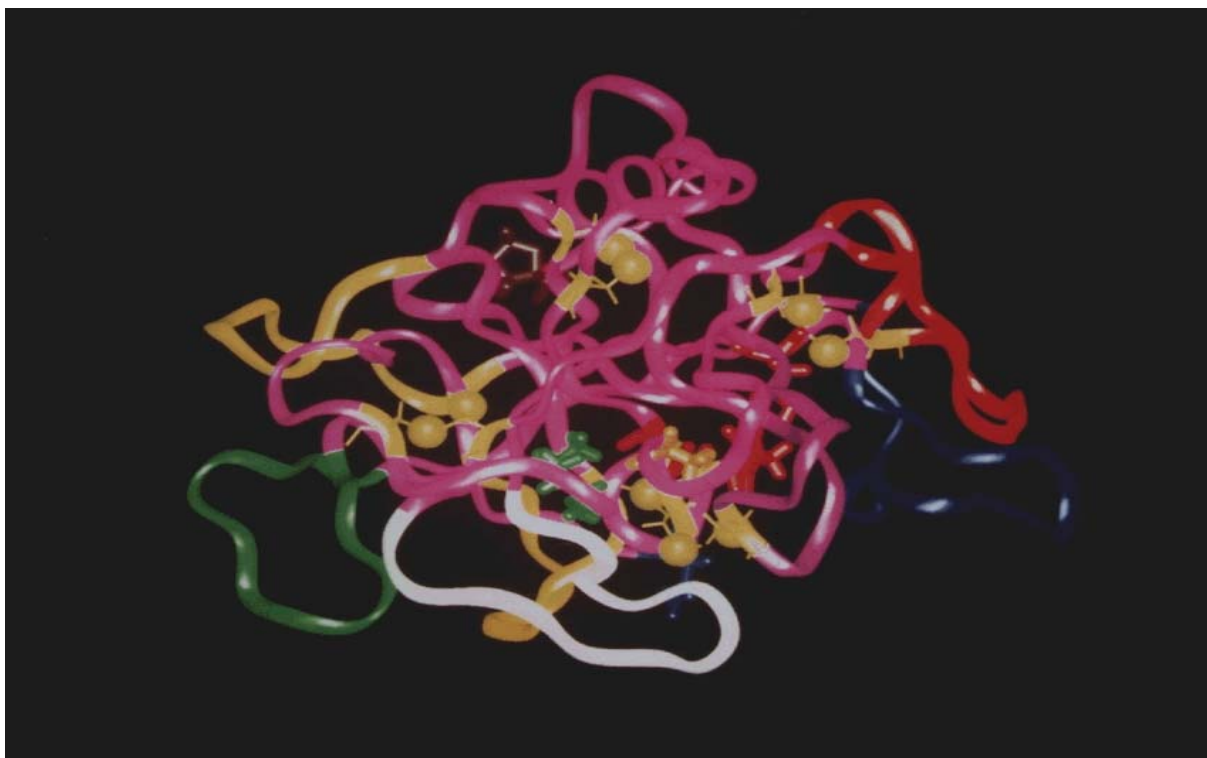
2.2.3 *Diagnóza*

Digitální rektální vyšetření by mělo být součástí rutinního fyzikálního vyšetření pacienta a má významnou úlohu zejména při vyšetřování mužů starších 50 let. Vyšetření provádíme v poloze na zádech s pokrčenými koleny nebo při ohnutí horní poloviny těla a maximálním odlehčení dolních končetin, a to zavedením ukazováku s gumovou rukavicí, jejíž povrch je potřen gelem nebo vazelínou, přes anální otvor do konečníku. Prostata je dobře dosažitelná přes stěnu konečníku a lékař může posoudit její velikost, tvar a charakter. Prostata má být velikosti kaštanu, symetrická se žlábkem uprostřed, hladká, elastická, ohraničená proti okolí, nebolestivá. Jakákoliv odchylka od elasticity, hladkosti povrchu, ohraničení žlázy či mobility sliznice konečníku je podezřelá. Je však nutné si uvědomit, že palpačně lze vyšetřit jen asi 1/3 povrchu žlázy. Vyšetření není dostatečně spolehlivé pro diagnózu KP, slouží však jako užitečná metoda v prevenci KP a pro přibližné určení velikosti prostaty.



Obrázek č. 2: Digitální rektální vyšetření prostaty

PSA je lidský kalikrein, glykoprotein o molekulové hmotnosti 33 kD s aktivitou neutrální serinové proteázy. Jeho molekulu tvoří 237 aminokyselin a jeden uhlovodíkový řetězec, navázaný na aminoskupinu asparaginu. PSA je produkován normálními i nádorovými buňkami prostaty. Jeho naprostá většina je secernována do semenné tekutiny, kde přispívá ke zkapalnění ejakulátu. V séru je přítomen ve formě volné (freePSA) nebo vázané. Součet volného a vázaného PSA se nazývá celkové PSA (totalPSA). Index % freePSA (poměr freePSA/totalPSA) umožňuje lépe odlišit nezhooubné a zhooubné onemocnění prostaty: index freePSA nad 25 % svědčí s vysokou pravděpodobností pro BPH, index freePSA pod 10 % svědčí s vysokou pravděpodobností pro KP, v zoně indexu freePSA 10-25 % se klinické nálezy překrývají.

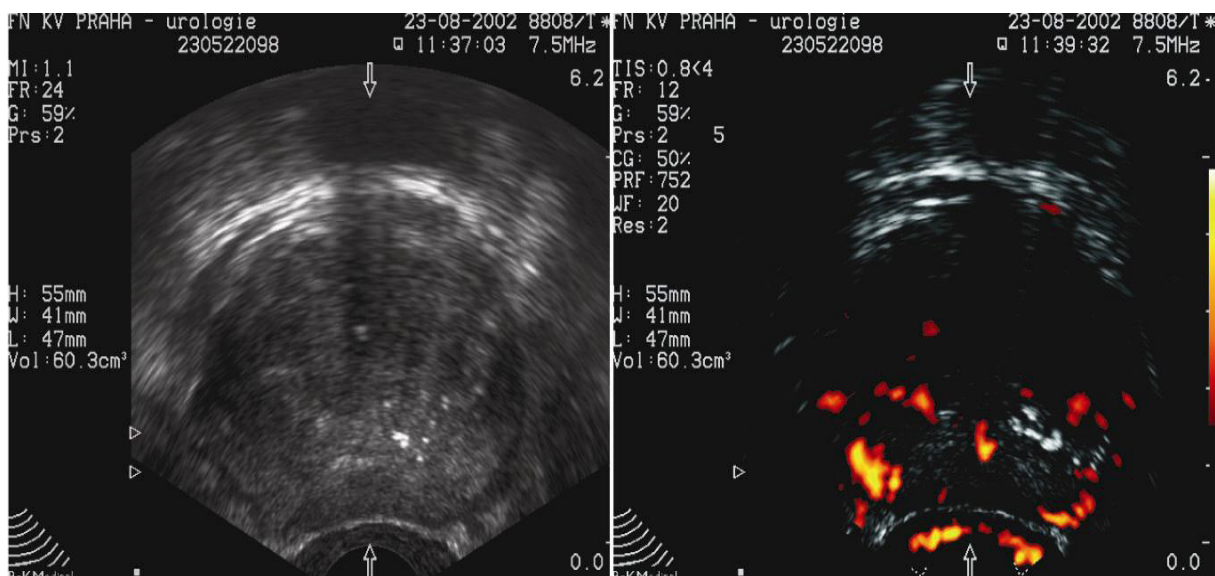


Obrázek č. 3: Prostorový model molekuly PSA

Za normálních okolností je hladina PSA v séru pod 4 ng/ml a během 24 hodin se nemění. Jeho hodnota koreluje s rasou, věkem pacienta a objemem prostaty. Zvýšení PSA v séru mohou vyvolat všechna tři nejčastější onemocnění prostaty - KP, BPH a zánět, dále pak operační výkony na prostatě, akutní retence moče, masáž nebo biopsie prostaty, méně často i ejakulace. Avšak běžné digitální rektální vyšetření, nekomplikovaná cystoskopie, zavedení cévky do močového měchýře nebo transrektální sonografie hladinu PSA v naprosté většině případů nezvyšují. Největší význam PSA spočívá v časně detekci KP. 20 % mužů

s diagnostikovaným KP má hodnotu celkového PSA v séru nižší než 4 ng/ml, v rozmezí od 4 do 10 ng/ml je pravděpodobnost výskytu KP 25 %, avšak pokud PSA přesahuje 10 ng/ml stoupá tato pravděpodobnost nad 50 %. Senzitivitu i specificitu PSA pro KP zvyšuje současná kombinace s vyšetřením konečníkem, standardizace k věku, stanovení PSA velocity (rychlost přírůstku PSA v časovém limitu), PSA denzity (PSA/objem prostaty) nebo výše zmíněné vyšetření frakce volného PSA (freePSA/totalPSA). PSA představuje nejlepší marker v současné onkologii. Zavedení rutinního měření PSA do klinické praxe na konci osmdesátých let znamenalo revoluci v diagnostice i v léčbě KP. Vyšetření PSA predikuje pravděpodobnost ohrazení karcinomu na žlázu a má mimořádný význam při dlouhodobém sledování nemocných s KP [43].

Sonografii provádíme trasrektálním přístupem (TRUS), kdy sondu zavádíme v lokální anestezii análním otvorem do konečníku. Vyšetření umožňuje velmi přesné zobrazení prostaty, semenných váčků, baze měchýře a konečníku. TRUS lze využít k výpočtu objemu prostaty, nádorového ložiska a současně k posouzení, zda tumor prorůstá do okolních struktur [83].

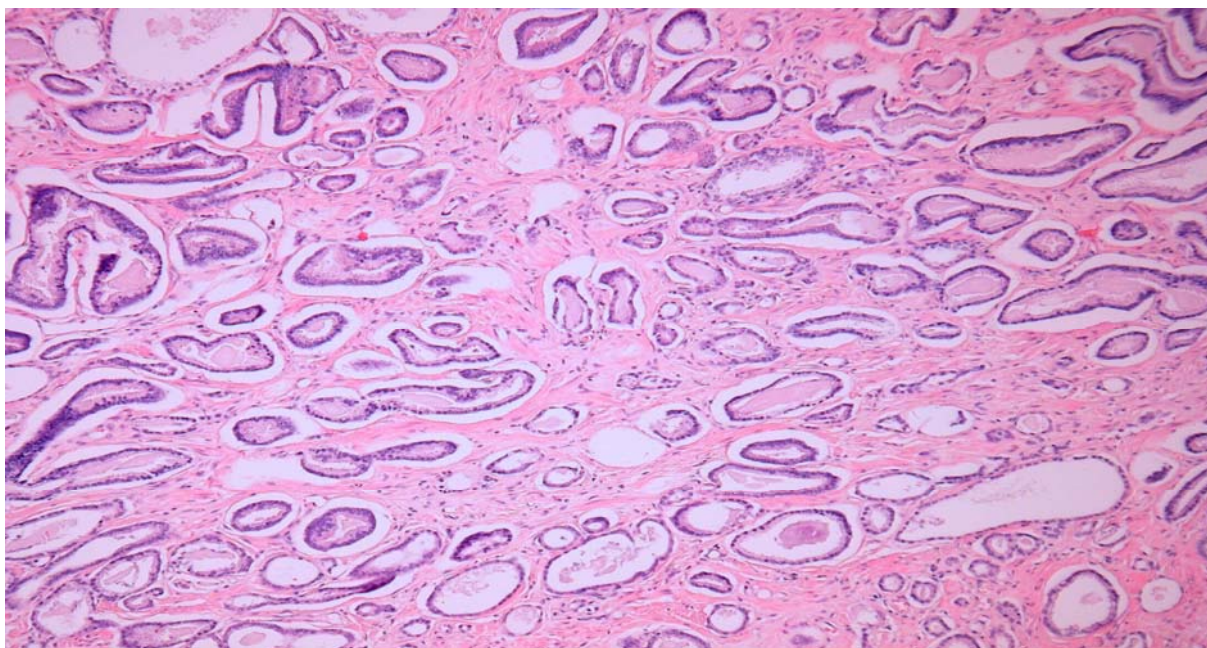


Obrázek č. 4: Ultrasonografie prostaty a power doppler k posouzení vaskularizace prostaty

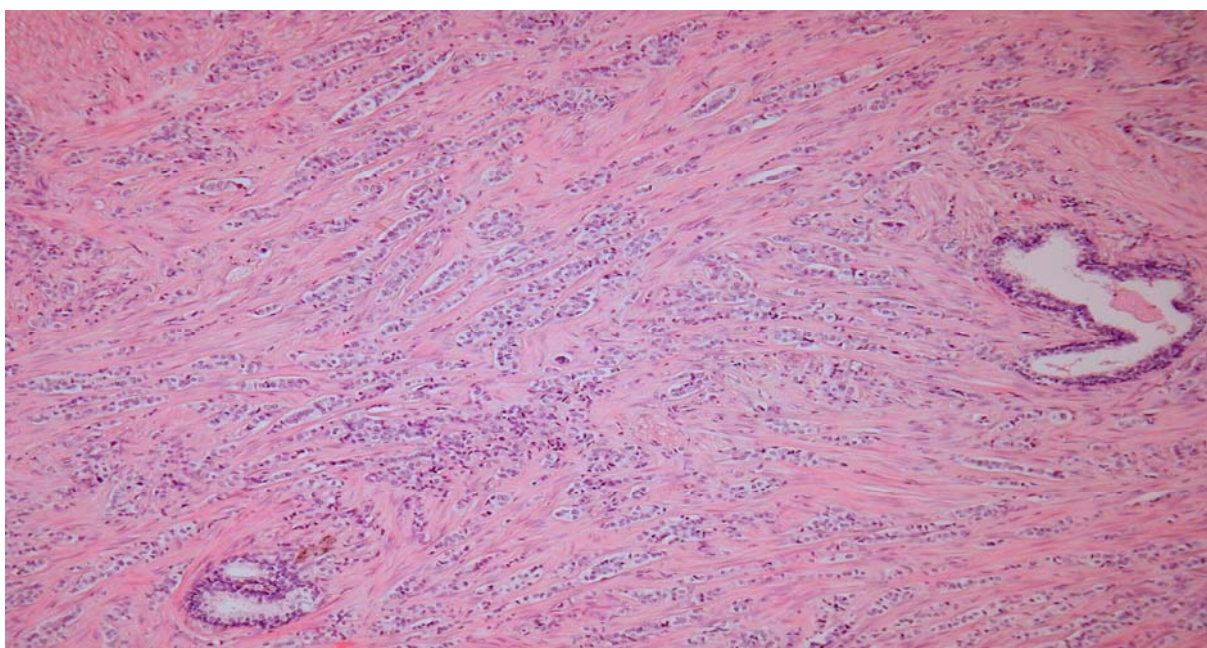
TRUS má jedinečnou roli při cíleném odběru bioptických vzorků. Biopsii prostaty provádíme, pokud máme podezření na KP – při suspektním nálezů na prostatě u rektálního vyšetření nebo při vyšší hodnotě PSA.

KP je z histopatologického hlediska nejčastěji tvořen středně velkými aciny o nepravidelných konturách, které jsou různým způsobem uspořádány i distribuovány ve

stromatu. Stupeň nádoru je spolehlivým prediktorem biologického chování KP, především pak z hlediska jeho schopnosti invaze a metastatického potenciálu. Nejčastější a nejpoužívanější je Gleasonův systém. U Gleasonova gradingového systému hodnotíme architektonické uspořádání nádorových ložisek. Stupeň jejich diferenciace se pak vyjadřuje pěti stupni od obrazu dobře diferencovaného acinárního karcinomu až po disociovaný karcinom [15].



Obrázek č. 5: Dobře diferencovaný acinární karcinom prostaty (Gleason 3)



Obrázek č. 6: Disociovaný acinární karcinom prostaty (Gleason 5)

2.2.4 Léčba

Pro zahájení léčby je nezbytně nutné znát histologický nález a klinické stádium onemocnění. Standardem v současné době je léčba chirurgická, radioterapie a hormonální léčba. Chemoterapie se využívá méně pro nepříliš uspokojivé výsledky.

Zatímco u lokalizovaného KP má operační či radiační léčba kurativní efekt, lokálně pokročilé či generalizované onemocnění zůstává léčebným problémem, bez možnosti úplného vyléčení.

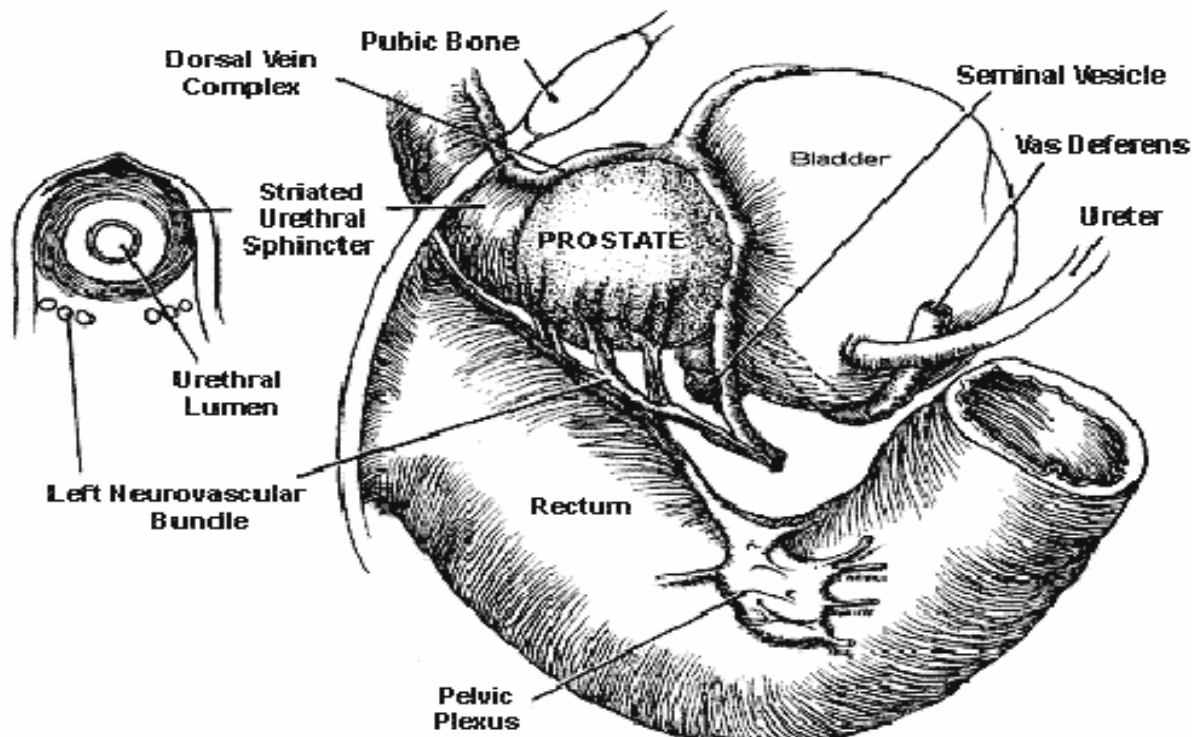
Observace (watch and wait strategie neboli smysluplné očekávání)

Vychází z poznatků, že KP, typický svou dlouhou reduplikační dobou, neohroží muže staršího věku (s kratší dobou než 10 let expektace zbytku života) ve stádiu lokalizovaném na prostatu. Monitorace PSA umožňuje nejen včas stanovit diagnózu, ale současně velmi podrobně sledovat průběh nemoci, a proto důsledná observace pacientů může být v tomto stádiu choroby větším benefitem, než snížení kvality života radikálními léčebnými postupy.

Chirurgická léčba

Chirurgickou léčbu karcinomu prostaty dělíme na kurativní a paliativní.

Při radikální prostatektomii odstraňujeme celou prostatu s kapsulou a semennými vajíčky. Při diagnostických pochybnostech jí předchází pánevní lymfadenektomie, při které se odstraňují regionální lymfatické uzliny. Detailnější poznatky chirurgické anatomie prostaty a okolních struktur a současně pokrok v chirurgických a anesteziologických metodách umožnily v posledním desetiletí podstatné snížení peroperačních a pooperačních komplikací. Mezi nejzávažnější pozdní komplikace výkonu patří inkontinence moče a erektilní dysfunkce, jejichž výskyt se naštěstí díky stále dokonalejší operační technice dále snižuje. Radikální prostatektomie je v současné době nejrozšířenější a u správně indikovaného pacienta i nejspolehlivější metodou léčby poskytující nejvyšší šanci na trvalé vyléčení. Radikální prostatektomie může být provedena otevřenou cestou, z retropubického nebo transperineálního přístupu anebo miniinvazivně laparoskopicky či roboticky.

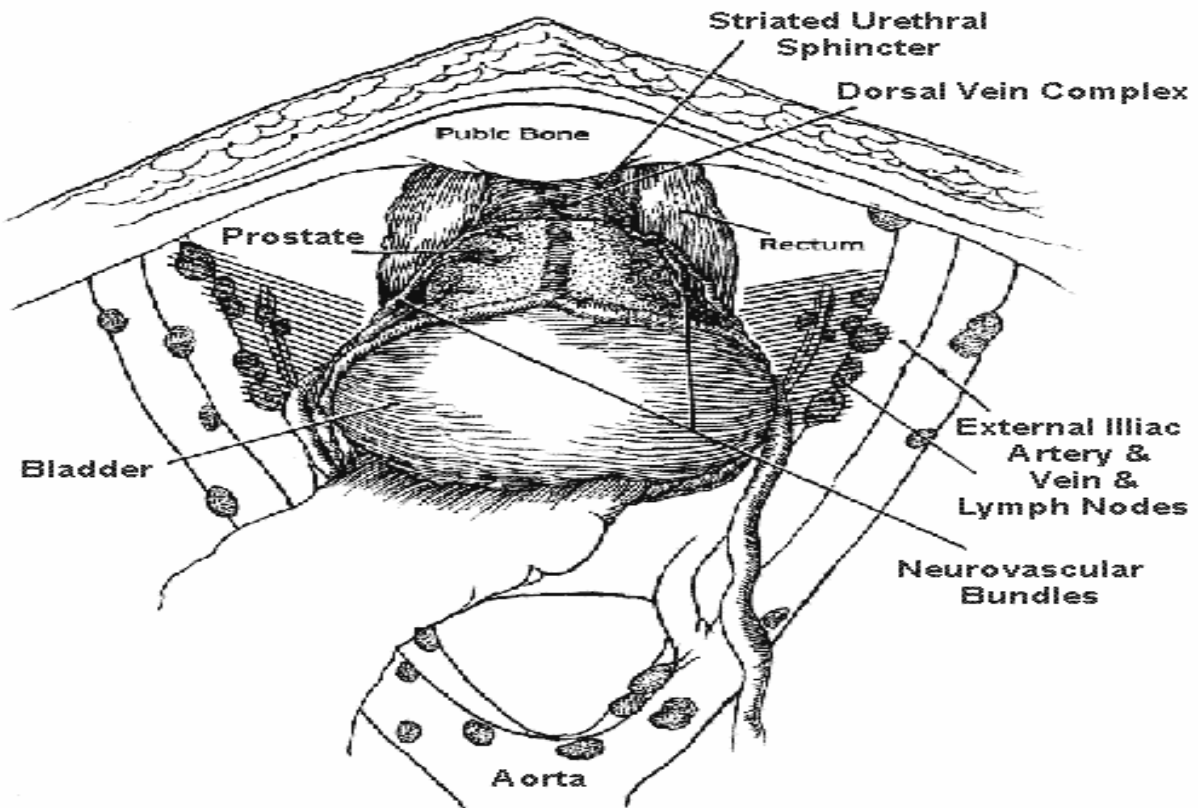


Obrázek č. 7: Syntopie prostaty a okolních struktur (převzato z knihy Walsh PC, Worthington JF. Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer, Warner Books, 2001)

Retropubická radikální prostatektomie (RRP) je odvozena od postupu, který v 40. letech popsal Millin pro léčbu BPH, a který byl později v 50. letech zaveden Chutem do léčby KP. Dříve byla RRP spojena s vysokou morbiditou, inkontinencí a erektilní dysfunkcí. Až anatomické studie Reiner a Walshe objasnily vztah prostaty k Santorinskému plexu a vedly k zavedení anatomického přístupu k prostatě, minimalizaci krevních ztrát a optimalizaci výkonu [58]. Walsh a Donker objasnili přesný průběh kavernózních nervů a popsali základní topografické údaje pro rozvoj nervy-šetřícího postupu [76]. Technické pokroky vedou k lepší přehlednosti klíčových struktur, které jsou rozhodující pro snížení peroperačních krevních ztrát, vedou ke zvýšení počtu kontinentních a potentních pacientů a přispívají tak k všeobecnému přijetí této metody. Zdokonalování chirurgických technik s precizní preparací vede k redukci pozitivních okrajů.

Nemocného přijímáme do nemocnice den před operací. Následuje standardní předoperační příprava, vyprázdnění střevního traktu, antibiotická profylaxe. Endotracheální anestezie převažuje. Její kombinace s epidurální anestézií má tu výhodu, že v pooperačním období nemocný necítí bolest v místě operace, zatímco ventilační parametry neovlivňují anodyna. Poloha pacienta je na zádech, mírná hyperextenze zlepšuje přístup do malé pánve, mírná Trendelenburgova poloha je vhodná pro zlepšený žilní návrat.

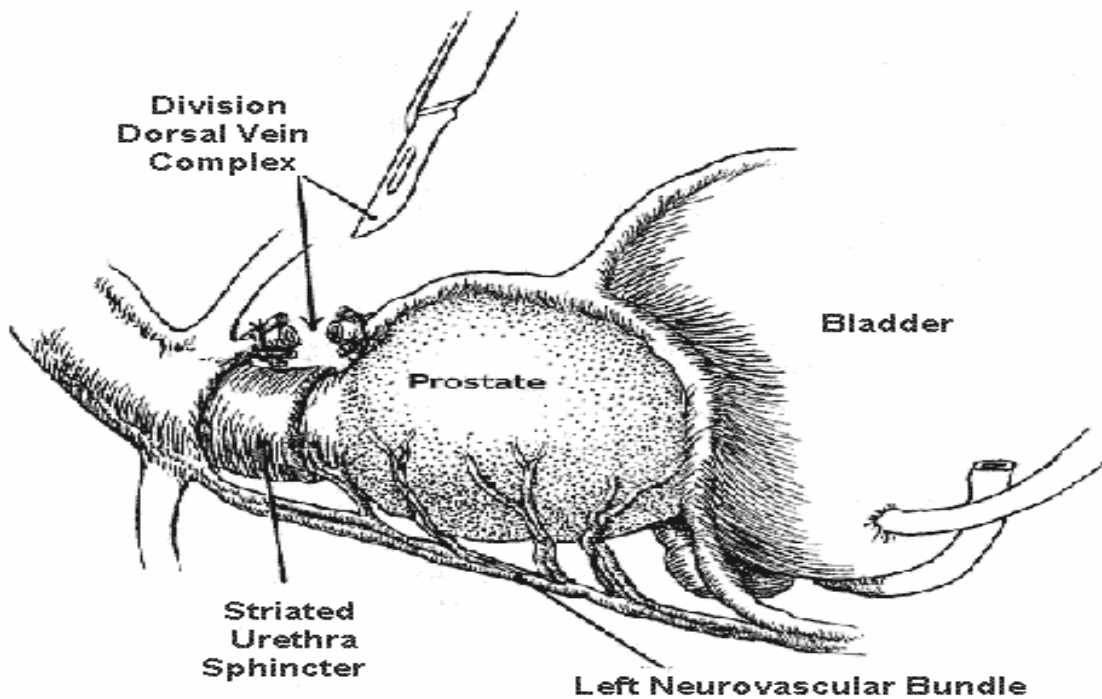
Po natření a zarouškování operačního pole zavádíme cévku do močového měchýře a naplníme její balónek. Chirurg vede řez od symfýzy pod pupek. Po otevření fascie mm. recti a jejich retrakci laterálně vytvoříme Retziův prostor.



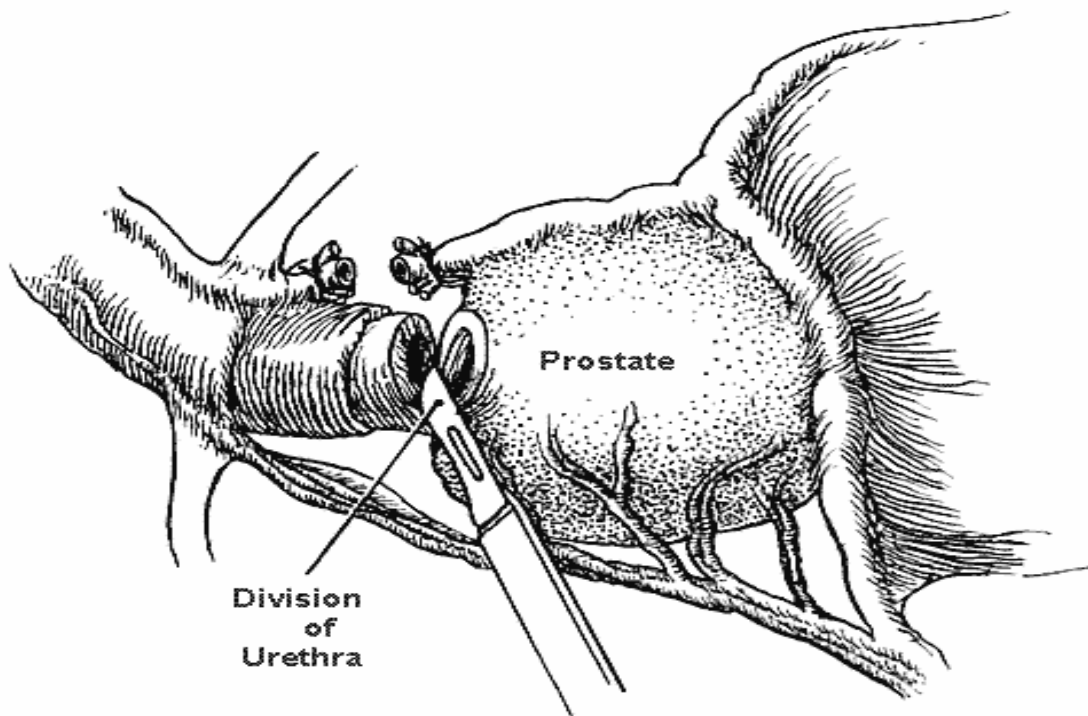
Obrázek č. 8: Syntopie prostaty a okolních struktur (převzato z knihy Walsh PC, Worthington JF. Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer, Warner Books, 2001)

K odhalení puboprostatických ligament musíme odstranit fibrozně-tukovou tkáň, která spočívá na endopelvické fascii. Poté ošetřujeme povrchovou dorzální žílu, a to elektrokauterem, ligací nebo klipem. Endopelvickou fascii otevíráme co nejbližší k prostatě, následně ošetřujeme dorzální žilní plexus. Venózní pleteň vychází ze spodní strany symfýzy a drénuje krev z vena dorsalis penis, je uložena mezi puboprostatickými ligamenty a probíhá na ventrální a laterální straně prostaty, vytváří spletitou síť jemných a dilatovaných vén s mnoha anastomózami.

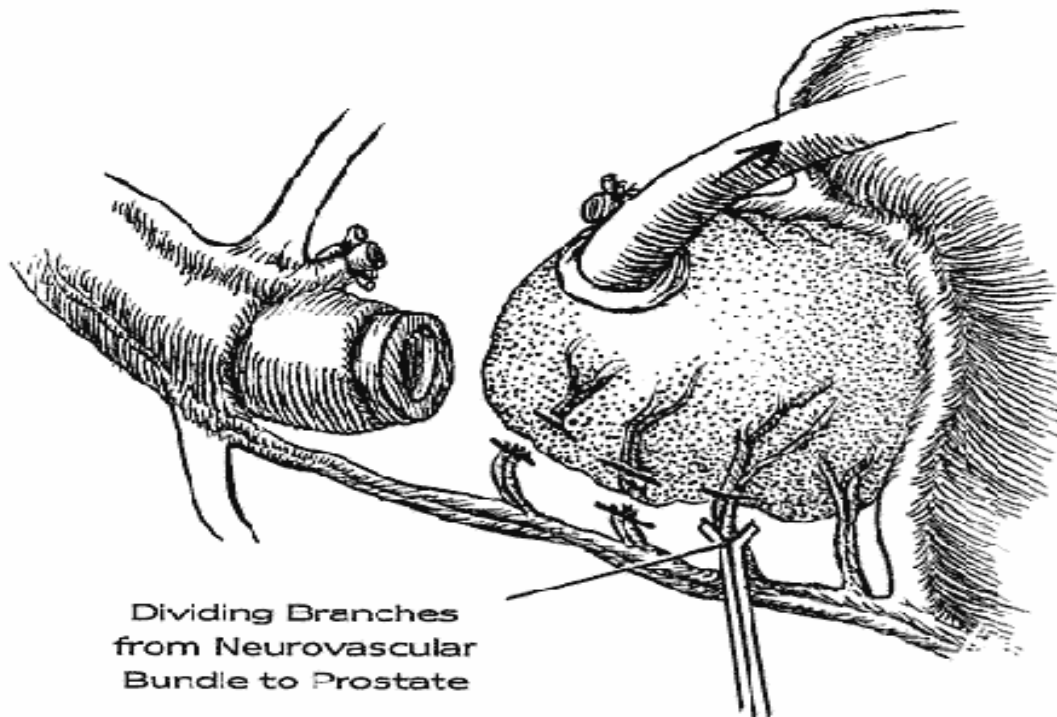
Správné ošetření tohoto komplexu je vždy výzvou pro chirurga, protože krvácení může být způsobeno i minimální manipulací a jeho zastavení je obtížné pro mnoho sinusoidních spojek mezi vénami a fragilitu stěn. Pleteň přerušujeme postupně opichovými ligaturami. Po přerušení podvázaných žil se dostáváme na uretru, kterou vzápětí otevíráme nad cévkou.



Obrázek č. 9: Přerušení dorzální žilní pleteně (převzato z knihy Walsh PC, Worthington JF. Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer, Warner Books, 2001)

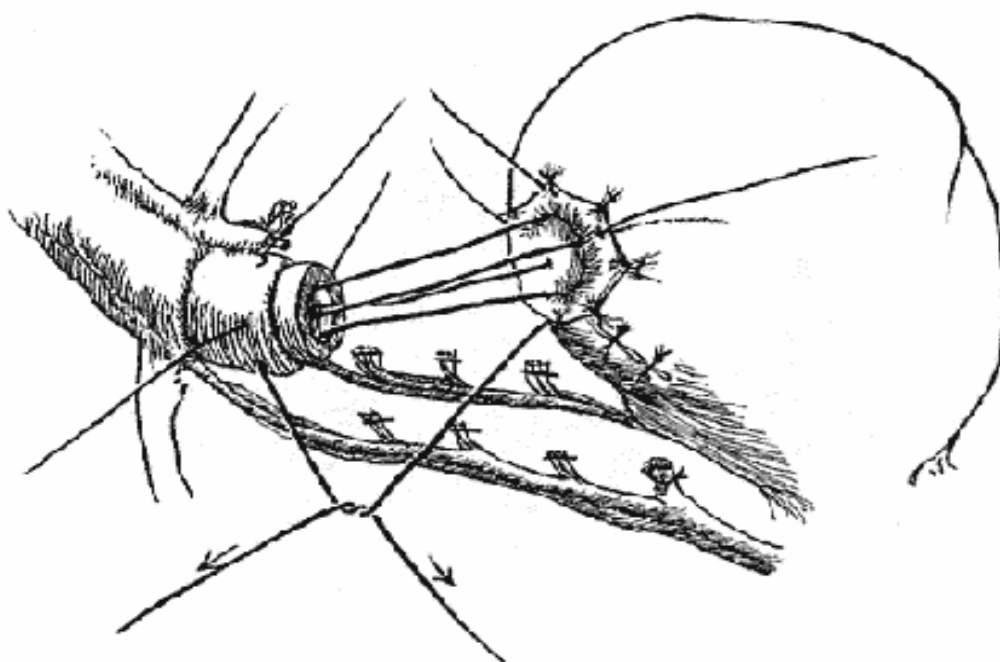


Obrázek č. 10: Přerušení močové trubice (převzato z knihy Walsh PC, Worthington JF. Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer, Warner Books, 2001)



Obrázek č. 11: Přerušení větví neurovaskulárního svazku (převzato z knihy Walsh PC, Worthington JF. Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer, Warner Books, 2001)

Po otevření předního obvodu uretry někteří chirurgové nakládají rovnou anastomotické stehy, jiní nakládají stehy po dokončení preparace a kompletní transekcii uretry. Prostatu v anatomickém pouzdru pak postupně oddělujeme od rekta až do úrovně baze. Otevřením Denonvilliersovy fascie se dostaneme přímo k deferentům, které můžeme ihned přerušit a podvázat a laterálně od nich v perirektálním tuku na spodině Douglasova prostoru vyhledat fundy obou semenných váčků. Někdy váčky lnou pevněji k rektu nebo k pediklům a při pokusu o retrogradní preparaci se trhají. Pak je vhodnější provést antegrádní uvolnění a oddělení od cévních svazků, které jsou zdrojem cévního zásobení prostaty. Vyhrmatáme balonek cévky těsně nad prostatou a oddělíme hrdlo měchýře od baze prostaty. Prostata je v tuto chvíli kompletně uvolněna a můžeme ji z rány odstranit. V této fázi operace je vhodná kontrola reziduálního krvácení kdekoli v oblasti původního lůžka prostaty. Mimořádně důležitá je pečlivá prezervace hrdla močového měchýře. Pokud je třeba, modelujeme hrdlo různými způsoby, z nichž nejčastější je „tennis racket closure“ nebo zúžení ze tří stran. Poté provádíme everzi sliznice močového měchýře a zabraňujeme tak významným způsobem strikturám v ureterovezikální anastomóze.

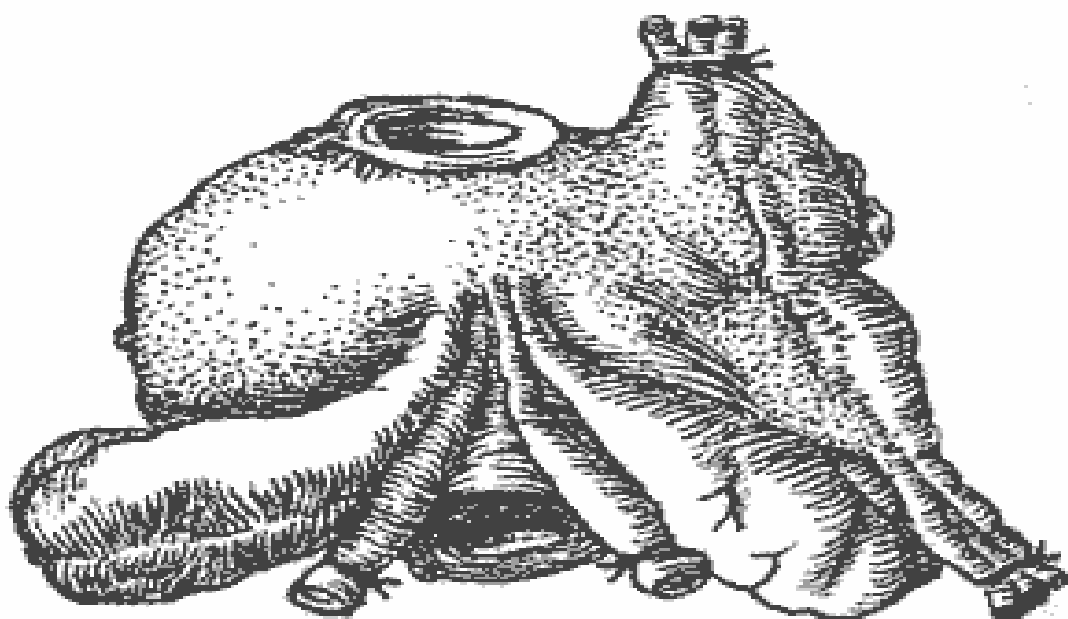


Obrázek č. 12: Ureterovezikální anastomóza (převzato z knihy Walsh PC, Worthington JF. Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer, Warner Books, 2001)

Zakládáme nejméně 4 anastomotické stehy, a to mezi pahýlem uretry a stěnou močového měchýře. Před dotažením stehů zavedeme do močového měchýře permanentní cévku. Trakcí za cévku s naplněným balonkem pomáháme správnému „dosednutí“ měchýře na uretru. Poté zakládáme Redonovu drenáž k ureterovezikální anastomóze, provádíme suturu svalů, fascie a kůže.

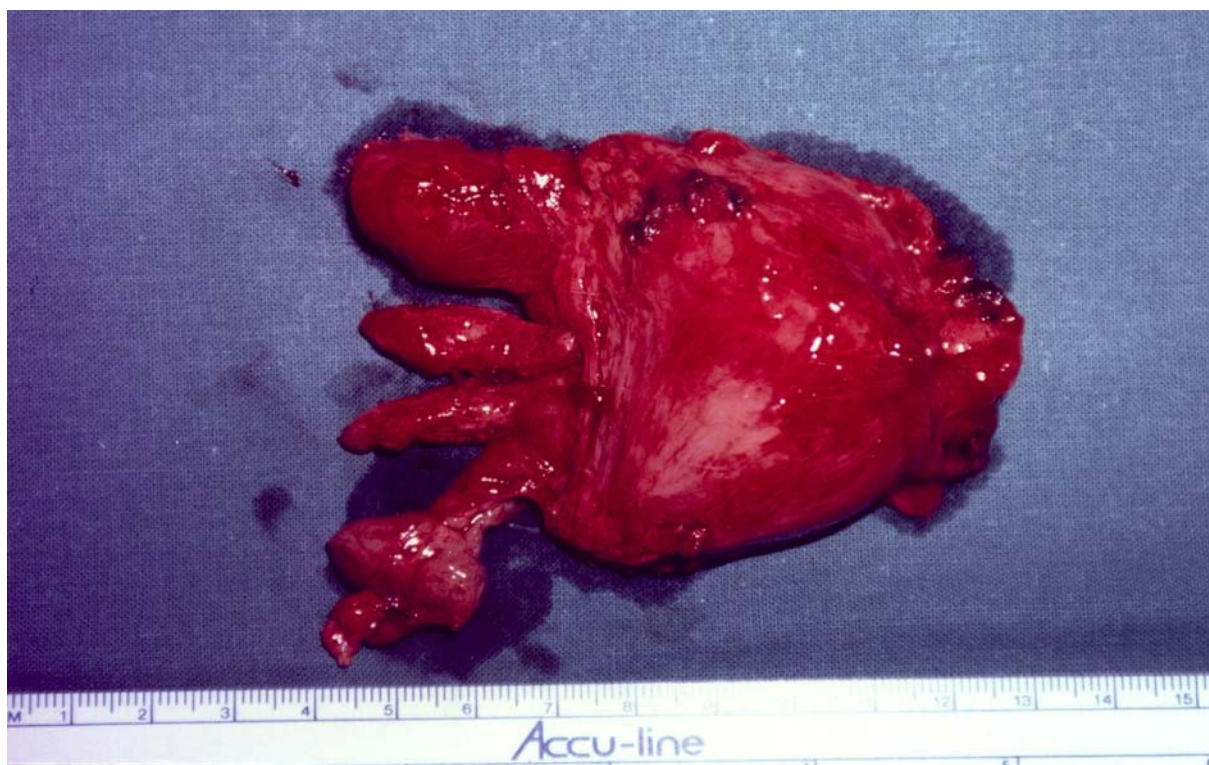
Pokud je RRP sdužena s pánevní lymfadenektomií, je rozsah lymfadenektomie ohraničen kraniálně bifurkací ilických cév, ventrálně povrchem zevní ilické žíly, kaudálně počátkem vena circumflexa ilium superficialis a dorzálně n. obturatorius.

Po operaci má pacient do močového měchýře zaveden Foleyův katetr. Redonův drén vytahujeme, jakmile ustane sekrece (zpravidla za 2-3 dny). Přítomnost katetru je naprosto nezbytná pro správné zhojení anastomózy a ponecháváme ho obvykle 2 týdny. Jeho extrakci předchází provedení cystografie k vyloučení extravazace moče z oblasti anastomózy. Pooperační bolesti jsou vnímány jako velmi mírné, protože při operaci nedochází k protěti svalových vrstev. Bez pooperačních komplikací vyžaduje zákrok pracovní neschopnost průměrně 6-8 týdnů [15].



**Specimen
(Posterior View)**

Obrázek č. 13: Preparát prostaty z radikální prostatektomie (převzato z knihy Walsh PC, Worthington JF. Dr. Patrick Walsh's Guide to Surviving Prostate Cancer, Warner Books, 2001)



Obrázek č. 14: Preparát prostaty z radikální prostatektomie

Transuretrální resekce prostaty je výkonem paliativním, sloužícím k uvolnění obstrukce prostatické uretry v případě výrazných obstrukčních nebo iritačních mikčních příznaků, případně retence moče nebo hematurie, jejichž příčinou je KP.

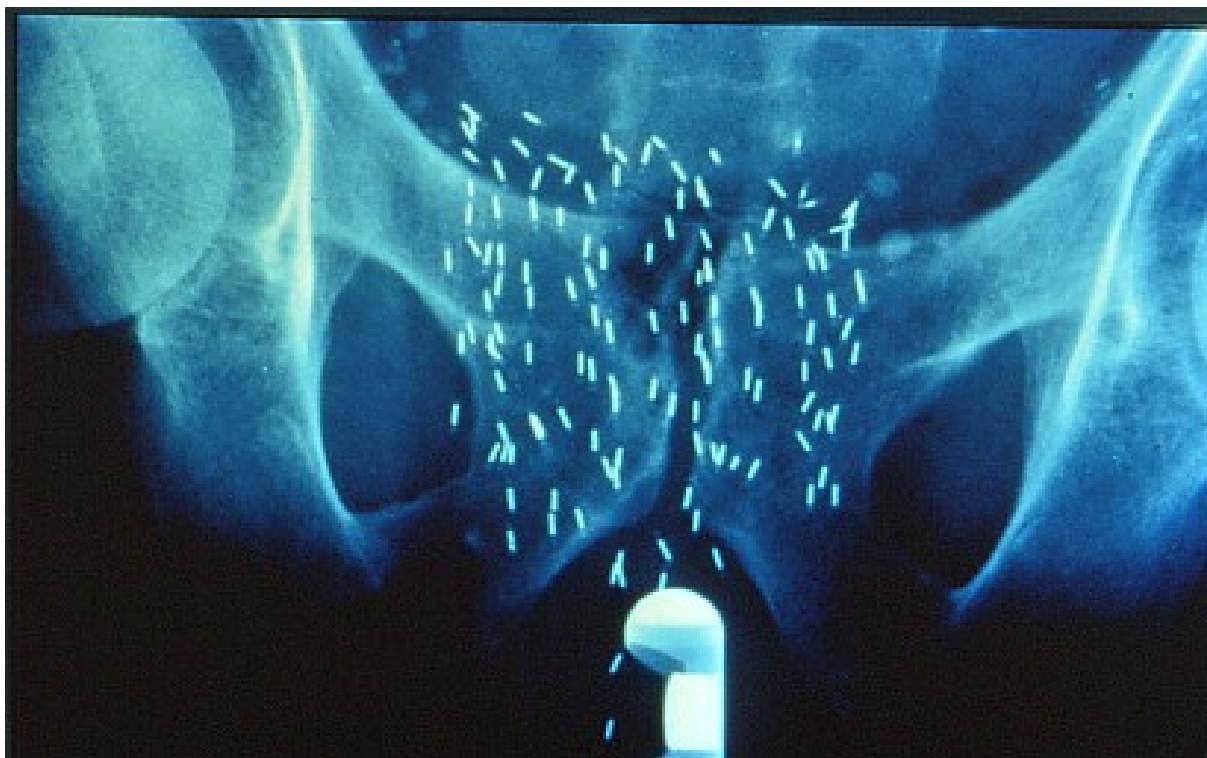
Radiační léčba

Zevní kurativní radioterapii indikujeme nejčastěji u pacientů, kteří nemohou nebo nechtějí podstoupit radikální prostatektomii. Velmi důležitým indikačním kritériem je také spíše kratší životní expektace a nádor, který je lokálně pokročilý.



Obrázek č. 15: Zevní radioterapie karcinomu prostaty

Intersticiální radioterapie (brachyterapie) je moderní metoda, která spočívá v implantaci radioaktivního zdroje do prostaty perkutánní transperineální cestou při transrektální ultrazvukové kontrole. Radioaktivní zrna jsou zaváděna do prostaty pod ultrazvukovou kontrolou. Kombinace zevní a intersticiální radioterapie je také možná a za určitých okolností zvyšuje její účinnost.



Obrázek č. 16: Brachyterapie karcinomu prostaty

Paliativní radioterapii indikujeme u lokálně pokročilého onemocnění s progresí primárního nádoru a u kostních metastáz. Cílem je dosáhnout analgetického efektu, zvýšit prevenci patologické fraktury, event. usnadnit její hojení, zlepšit mobilitu pacienta, a tím zlepšit kvalitu jeho života. Adjuvantní radioterapii indikujeme při nádorové pozitivitě resekcí okrajů po radikální prostatektomii.

Hormonální léčba

Hormonální léčba je metodou volby v léčbě metastatického KP. Skutečnost, že 80 % buněčné populace karcinomů prostaty je hormonálně dependentních, přímo předurčuje léčbu pomocí hormonálních manipulací. Současně je třeba zdůraznit, že nádor obsahuje vždy populaci buněk hormonálně independentních, a proto je tato léčba také současně pouze léčbou paliativní. T podporuje růst nádorových buněk v prostatě. Hormonální manipulace používaná při terapii spočívá v potlačení účinku nebo v eliminaci cirkulujících androgenů.

Chirurgické odstranění varlat - oboustranná orchiektomie - představuje stále zlatý a ekonomicky nejméně náročný standard léčby. Dochází k 95 % snížení hladiny T v krvi. Hladina T poklesne na kastroční hodnoty během několika hodin, bolesti od kostních metastáz mohou ustoupit velmi rychle, nádorová tkáň prostaty, která je citlivá na androgeny, se zmenšuje.

Podání LHRH analog (agonistů) působí takzvanou reverzibilní medikamentózní kastraci, která je stejně účinná jako orchiektomie. Mechanismus účinku spočívá v nadměrné stimulaci hypofýzy, která nejprve vyvolá zvýšenou sekreci LH a FSH a následně přechodný vzestup hodnot T. Po delší stimulaci však již hypofýza nereaguje, tvorba gonadotropinů se snižuje, což vede ke snížení hladiny T na stejné hodnoty, jako při odstranění varlat. Tvorba adrenálních steroidů zůstává nezměněna. Výhodou je, že pacientovi zůstávají varlata a současně podstupuje účinnou léčbu ke snížení hladiny T. Významnou výhodou je možnost přerušování léčby, tzv. intermitentní blokáda. Nežádoucí účinky poklesu hladiny androgenů zahrnují návaly horka, ztrátu libida a erekce, v řídkých případech gynekomastii (před hormonální léčbou je možno prsa ozářit, a tak těmto obtížím předejít), poruchy spánku, deprese, změny hmotnosti, nechutenství, bolesti hlavy a zcela ojediněle tromboflebitidu.

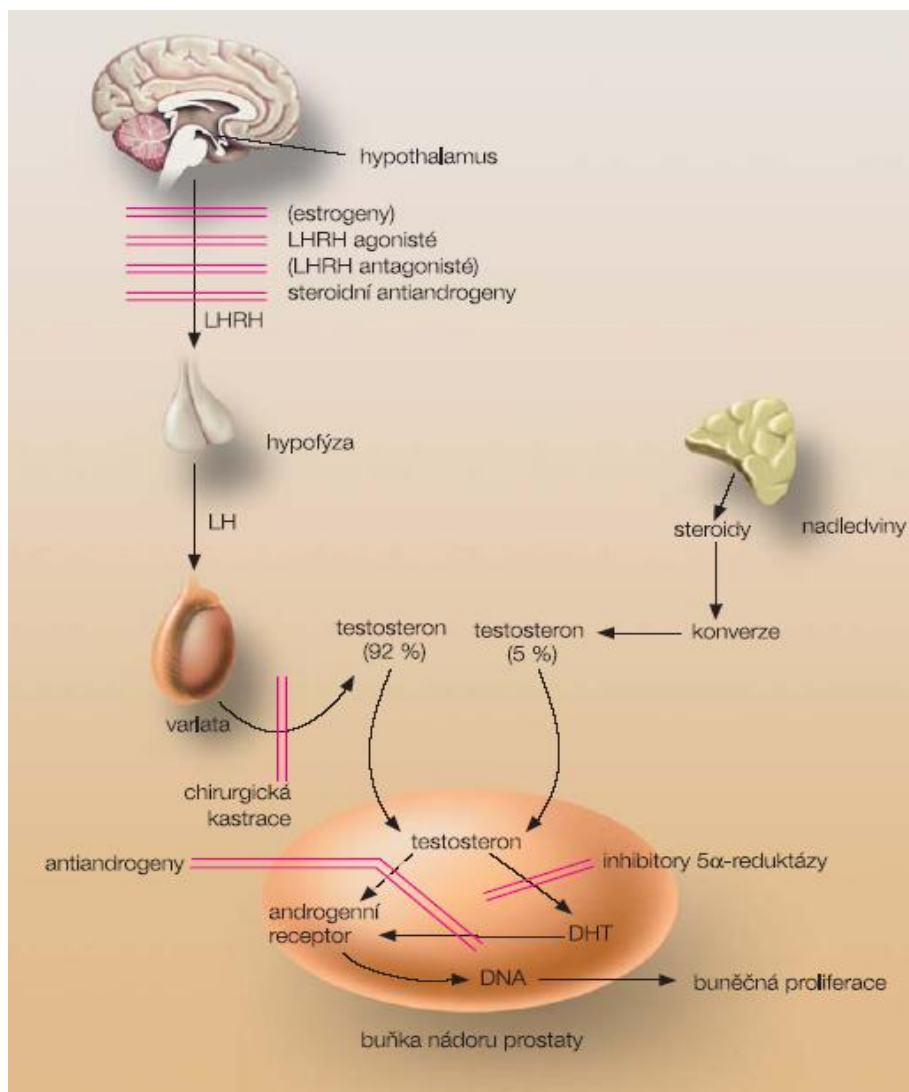
Léčba antagonisty (antiandrogeny) blokuje cestou kompetitivní inhibice vazbu T na androgenní receptor přímo v cílové tkáni, tzn. v prostatě. Dělíme je na steroidní a nesteroidní, některé látky mohou působit na více úrovních.

Při totální androgenní blokádě používáme kombinace orchiektomie + antiandrogen nebo LH-RH analog + antiandrogen.

Intermitentní androgenní blokáda vychází z předpokladu, že odstranění zdroje androgenů hraje významnou roli v selekci androgen-nezávislých buněčných klonů a že střídavé přerušování léčby selekci těchto klonů oddálí, čímž zůstane zachována hormonální závislost nádoru a sníží se toxicita léčby, stejně jako její ekonomická náročnost. Pacient je léčen, dokud hodnota PSA neklesne k normě. Pak léčbu vysadíme a znovu obnovíme, až se objeví známky progresu nádoru (tj. vzestup hodnot PSA). Intermitentní léčba oddálí ztrátu sexuálních funkcí a omezí i další negativní vlivy léčby na kvalitu pacientova života.

Chemoterapie

Chemoterapii používáme u diseminovaného, hormonálně refrakterního onemocnění. Léčba má časově omezenou odpověď a vede spíše ke zlepšení subjektivních obtíží pacienta. Přes dlouhodobě a oprávněně velmi skeptický pohled na tuto léčebnou modalitu, přináší v posledních letech (díky moderním kombinacím cytostatik) poměrně optimističtější pohled.



Obrázek č. 17: Možnosti hormonálního ovlivnění karcinomu prostaty

2.3 Hormony a KP

Hormony jsou chemické látky, které mají zásadní úlohu v životě organismů. Z chemického hlediska jsou hormony bílkoviny nebo polypeptidy, aromatické sloučeniny nebo steroidy. Úkolem hormonů je zasahovat do nitrobuněčných dějů a regulovat je podle potřeb organismu.

Normální vývoj prostaty, stejně jako uchování její struktury a funkce, je závislý na přítomnosti androgenů [80]. Endokrinní závislost prostaty byla již koncem 18. století prokázána Hunterem (1786) na experimentálně kastrováných zvířatech [31]. Androgeny prostřednictvím androgenního receptoru regulují expresi mnoha genů, které v prostatické tkáni ovlivňují zejména diferenciaci a proliferaci buněk, regulaci buněčného cyklu a buněčnou smrt – apoptózu. Zejména výrazně působí na růstové faktory. V nenádorové tkáni je

působení produktů těchto genů v rovnováze, u nádorového bujení převládá proliferace nad apoptózou.

Po kastraci prostata rychle atrofuje, ale po substituci androgeny se její funkce opět obnovuje. Androgeny ovlivňují i rozvoj hyperplázie nebo KP, protože u mužů kastrovaných před 40. rokem věku se tyto patologické stavy vyskytují jen zcela výjimečně. Atrofická je prostata také u jedinců s vrozenou nedostatečností enzymu 5 α -RD, který přeměňuje T na DHT - neúčinnější endogenní androgen v prostatě. Prostata je u těchto mužů v dospělosti atrofická, přestože jejich sérové koncentrace T jsou v normě nebo dokonce nadprůměrné. Čínští a turečtí eunuši, podobně jako členové sekty Skoptzy, jejichž pohlavní žlázy zůstaly nevyvinuté, slouží jako důkaz souvislosti mezi DHT a KP [81].

T se po vstupu do prostatické buňky mění na účinnější DHT pomocí enzymu 5 α -RD. DHT se v buňce dále mění na 3 α 17 β -androstendiol, který se může reverzibilně proměnit na DHT nebo ireverzibilně metabolizovat na inaktivní triolové steroidy [13]. Existují dva typy 5 α -RD. Typ I se nachází v potních žlázách na obličeji a v játrech, zatímco typ II se nachází nejvíce v prostatě, méně pak v játrech a ve folikulech sekundárního ochlupení a vlasů [4]. Normální koncentrace DHT ve tkáni prostaty je přibližně 5-10krát vyšší než koncentrace T [45].

Neustále se zvyšuje počet studií, které se zabývají vztahem hormonů a KP. Roste počet studií, které se zabývají vlivem gonadotropinů, estrogenů a jiných hormonů na benigní nebo nádorovou tkáň prostaty [7,22,27-28,54-55,68,71]. Nejvíce studií však zkoumá vztah T a KP. Nízká koncentrace T v séru je spojována s vyšším stádiem KP [29,64,82], s jeho agresivnější formou [59], s rozvinutějším patologickým stádiem z preparátu radikální prostatektomie [35,38,46] a s kratší celkovou dobou přežití [32,37]. Některé studie prokazují vztah mezi nízkou hladinou T a vysokým GS [50]. Zhang et al. uvádějí nižší hladiny celkového T u pacientů s vyšším stupněm KP než u pacientů se středním stupněm nádoru nebo u pacientů bez nádoru [84]. Schatzl s kolektivem prokázali výrazný rozdíl mezi střední hodnotou GS u pacientů s parciálním androgenním deficitem (T < 300 ng/dl) a u pacientů bez androgenní deficiencie (T \geq 300 ng/dl). Za zmínku rovněž stojí skutečnost, že do studie byli zahrnuti muži jak s metastatickým, tak i s lokálně pokročilým KP [64]. Studie Hoffmanna et al. prokázala, že u pacientů s nižší hladinou T bylo v mnoha případech GS \geq 8 a současně i vyšší procento pozitivních jader v biopsii. Autoři uvádějí, že nižší hladiny volného T v séru mohou být markerem pro agresivnější formy onemocnění, současně však zdůrazňují nevýrazné rozdíly v hladinách celkového T [29]. Další práce popisují vztah mezi nízkou sérovou koncentrací T a pokročilou formou onemocnění. Přes početně malou skupinu ve studii prokázali nedávno

Teloken et al. z Brazílie souvislost mezi nízkou hladinou T před operací a pozitivními chirurgickými okraji po radikální prostatektomii [70]. K podobným výsledkům došli ve své nedávné studii na větší skupině pacientů po radikální prostatektomii i Massengill et al.. Retrospektivně analyzovali velkou skupinu 879 pacientů po radikální prostatektomii na různých klinikách, u kterých po několik let sledovali různé parametry. Prokázali výrazně nižší předoperační hladiny T u pacientů s lokálně pokročilým KP než u pacientů s lokálně ohraničeným KP. Předoperační hodnoty T byly v multivariantní analýze významným prediktorem extraprostatického šíření nádoru [46]. Tento výsledek byl prokázán dalšími dvěma investigátory i u pacientů s rozdílným etnickým původem [26,52]. Podobně i Isom-Batz et al. popisují, že nízké předoperační hladiny celkového T souvisí s vyšším patologickým stádiem nemoci, nikoli však s biochemickým relapsem v multivarianční analýze [38]. Studie Massengilla, Imamota nebo Isom-Batze nepotvrdily souvislost mezi předoperační hladinou T a GS, i když do těchto studií byli zařazeni pouze pacienti s klinicky lokalizovaným KP. Avšak Massengill et al. prokázali, že hladina T byla inverzně proporcionální ke stádiu tumoru. Existuje několik hypotéz, proč se u mužů s nižší hladinou T objevuje patologicky pokročilejší stádium onemocnění. Nižší hladina T může být způsobena přidruženým chronickým onemocněním. KP může inhibovat androgeny prostřednictvím negativní zpětné vazby pomocí inhibinu, PSA nebo DHT [47,84]. Jiná teorie tvrdí, že při nízké hladině T může docházet ke změně hormonálního prostředí tím, že se naruší normální růst a výživa prostatické tkáně při kompenzační hyperplázii, ke které dochází, pokud atrofie prostaty vede k mutacím buněk a následné selekci androgen-dependentních agresivních prostatických buněk [46,56]. Mezi společné omezující faktory v těchto studiích patří velmi často jejich retrospektivní protokol nebo to, že neberou v úvahu kolísání hladin hormonů během dne. Často nejsou známy ani přesné důvody, které vedly k požadavku stanovit koncentraci jednotlivých hormonů, nejsou k dispozici hodnoty BMI a SHBG nebo není jasné, zda se studií účastnili pacienti s chronickou medikací, která může koncentraci vyšetřovaných hormonů ovlivnit.

Tuková tkáň byla až do počátku 90. let 20. století považována za tkáň s více méně statickou a pasívní funkcí, jejímž hlavním úkolem je zabezpečovat mechanickou obranu organismu a vytvářet zásobárnu energie. Tento tradiční pohled na tukovou tkáň byl narušen v polovině 90. let, kdy byl objeven první hormon produkovaný tukovou tkání – leptin. Jeho objev nastartoval výzkum endokrinní funkce tukové tkáně, díky kterému bylo doposud objeveno kolem 20 hormonů, které jsou z velké části produkovány bílou tukovou tkání [30]. V současné době víme, že tuková tkáň produkuje kolem stovky faktorů s parakrinní nebo endokrinní aktivitou, které hrají významnou úlohu při metabolických regulacích, řízení příjmu

potravy, zánětu a řadě dalších dějů. Pouze malá část z těchto hormonů je produkována výlučně tukovou tkání, většina je naopak primárně tvořena i v jiných tkáních či orgánech. Na hormonální produkci tukové tkáně se zdaleka nepodílejí pouze adipocyty, ale také imunokompetentní buňky přítomné v tukové tkáni, endoteliální buňky nebo preadipocyty.

Nadváhu a obezitu lze považovat za pandemii nového tisíciletí. Ve Spojených státech dosahuje procento obézních v populaci úctyhodných 30 % a není důvod se domnívat, že v naší populaci budou čísla jiná. Obezita představuje nezanedbatelný socio-ekonomický a zdravotnický problém; nejen proto, že je spojena s rozvojem mnoha chronických onemocnění včetně diabetu, arteriální hypertenze a koronární aterosklerózy; epidemiologické studie současně ukazují, že souvisí i s rozvojem četných zhoubných onemocnění, např. mléčné žlázy, tlustého střeva a prostaty. Obezita přináší ve srovnání s neobézní populací také zvýšené riziko úmrtí v případě již vzniklého nádorového onemocnění.

Obezita a tkáňové hormony produkované tukovou tkání (adipocytokiny) hrají důležitou roli v rozvoji různých nádorových stavů, včetně KP. Výstupy epidemiologických studií, které se zabývají souvislostmi mezi zvýšeným BMI v dospělosti a rizikem vzniku karcinomu prostaty [1], přinesly poněkud kontraverzní výsledky. Norská studie, která sledovala po dobu 21 let kohortu 950 000 mužů zjistila, že u pacientů s BMI vyšším než 30 kg/m² se riziko vzniku KP zvýšilo o pouhých 9 %, avšak ve věkové skupině 50-59 let se toto riziko zvýšilo o 58 % [17]. U Alpha-Tocoferol Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Trial bylo u pacientů v nejvyšší váhové a BMI kategorii pozorováno zvýšené riziko vzniku KP o 40 % [5]. Oproti výsledkům z předchozích studií, ve studii Health Professional Follow-up study u 50 000 zdravotnických pracovníků v USA byl vyšší BMI v mladším věku (21 let) naopak spojen se sníženým rizikem vzniku lokálně pokročilého nebo metastazujícího KP a BMI > 30 kg/m² a pozitivní rodinná anamnéza KP u mužů mladších 60 let byly rovněž spojeny s nižším rizikem vzniku KP [23]. Autoři vysvětlovali tento fakt u obézních nižšími hladinami androgenů a tedy protektivním účinkem na rozvoj KP. Nizozemská kohortová studie [65] pak neprokázala žádnou spojitost mezi BMI a rizikem vzniku KP. Studie, které se zabývaly vztahem mezi obezitou v mladším věku (10–20 let) a rizikem vzniku KP, přinesly, obdobně jako již výše zmiňované studie, rozporuplné výsledky – zatímco u některých působil zvýšený BMI jako protektivní faktor pro pozdější rozvoj KP, u jiných vedl ke zvýšenému riziku. Vyšší BMI souvisí s rizikem biochemického relapsu po radikální prostatektomii. Muži s vyšším BMI mají v době radikální prostatektomie pokročilejší stádium onemocnění a vyšší GS než muži s normálním BMI.

Silnější spojitost než mezi obezitou a rizikem vzniku KP je pozorována mezi obezitou a rizikem úmrtí na KP. Ukazuje se, že obezita má vliv spíše na progresi než na iniciaci nádorového bujení. Tato spojitost byla pozorována u Anderssonovy švédské prospektivní studie, která byla prováděna v letech 1960-1980 u Církve Adventistů Sedmého dne a které se zúčastnilo 135 000 dělníků [3]. Stejně výsledky ukazuje i nedávná Cancer Prevention Study (CPS) I a II [10,60], ve které pacienti s BMI vyšším než 30 kg/m^2 měli výrazně vyšší riziko úmrtí na karcinom prostaty – o 27 % v CPS-I a o 21 % v CPS-II. Metaanalýzou dat ze studie CPS-II pak bylo zjištěno, že u osob s $\text{BMI} > 35 \text{ kg/m}^2$ se riziko ve srovnání s neobézní populací zvýšilo dokonce o 34 %. Podobný efekt na mortalitu zaznamenala i nedávno provedená studie u adolescentů. Podle některých sdělení však nejsou výše zmiňované výsledky různých studií nutně v rozporu, ale odrážejí prostý fakt, že menší množství cirkulujících androgenů u obézních mužů na jedné straně snižuje riziko neagresivního KP a na straně druhé zvyšuje riziko agresivně se chovajícího karcinomu.

Naskytá se nutně otázka, zda vztah obezity a pokročilejších či agresivnějších forem nádoru nesouvisí spíše s opožděnou detekcí než s primárními vlastnostmi nádoru. Na tyto otázky se pokoušela odpovědět studie SABOR (San Antonio Study of Biomarkers of Risk) [73], která neprokázala žádné rozdíly v sérových hladinách PSA u obézních a neobézních pacientů. Oproti tomu studie Prestiho a kol. prokázala vyšší podíl detekce KP v jehlových biopsiích u osob s normálním BMI ve srovnání s osobami s nadváhou či obezitou a to zejména u pacientů mladších 70 let a s objemem prostaty menším než 50 cm^3 [57]. V neposlední řadě byl pozorován i vztah obezity a zvýšeného rizika biochemické PSA rekurence [2,19,20].

3. CÍLE PRÁCE

V publikaci č. 1 jsme zkoumali sérové koncentrace androgenů a koncentrace androgenů v prostatické tkáni u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP léčeným RRP a s BPH léčenou TVPE.

Publikace č. 1: Cílem práce bylo porovnat tkáňové a sérové koncentrace androgenů u pacientů s KP a s BPH.

V publikaci č. 2 jsme se zabývali sérovými koncentracemi hormonů u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP léčeným RRP.

Publikace č. 2.: Cílem práce bylo vyhodnotit sérové koncentrace hormonů u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP.

V publikacích č. 3. a 4. jsme se zabývali sérovými koncentracemi a imunohistochemickým vyšetřením adiponectinu a rezistinu u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP léčeným RRP a s BPH léčenou TVPE.

Publikace č. 3 a 4: Cílem studií bylo prozkoumat sérové koncentrace adiponectinu, rezistinu, imunohistochemickou expresi těchto hormonů v prostatické tkáni, histopatologické charakteristiky nádoru a ostatní sledované parametry u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP a s BPH.

Pracovní hypotézy:

- 1) Koncentrace androgenů ve tkáni prostaty a/nebo v séru korelují se stádiem nemoci u mužů s lokalizovaným a/nebo lokálně pokročilým KP léčeným RRP.
- 2) Sérové koncentrace hormonů korelují se stádiem nemoci a/nebo GS u pacientů s lokalizovaným a/nebo lokálně pokročilým KP léčeným RRP.
- 3) Imunohistochemická exprese adiponectinu a/nebo rezistinu v prostatické tkáni koreluje s histopatologickými charakteristikami nádoru.

4. PUBLIKACE č. 1: Tkáňové a sérové koncentrace hlavních androgenů u pacientů s benigní hyperplázií prostaty a s karcinomem prostaty

4.1 Úvod a cíle studie

Androgeny představují významný faktor v karcinogenezi KP. Přestože naše znalosti fyziologie pohlavních hormonů i výsledky experimentálních studií potvrzují zásadní význam androgenů pro vznik a progresi KP, vztah tkáňových a sérových koncentrací hormonů u různých stádií KP je stále nejasný.

Studie vznikla za finanční podpory grantu IGA MZ (NR8096) ve spolupráci čtyř pracovišť - Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, Endokrinologického ústavu, Urologického oddělení University v Pise v Itálii a Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV.

Cílem práce bylo porovnat sérové koncentrace androgenů a tkáňové koncentrace androgenů v prostatě u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP léčeným RRP a s BPH léčenou TVPE.

4.2 Materiál, metody

U 121 mužů s KP a 57 mužů s BPH, kteří podstoupili v letech 2004-2006 RRP s histopatologickým nálezem KP a TVPE s histopatologickým nálezem BPH, jsme v prostatické tkáni stanovili koncentrace T, DHT, AE a epiT. U 75 pacientů s KP a 51 pacientů s BPH jsme z ranní krve nalačno v den operace stanovili sérové koncentrace T, DHT a SHBG.

RRP jsme provedli operační technikou podle Walsche, Donkera a Reintera [58,76-78], TVPE operační technikou podle Fullera a Culpa [11,21].

Nativní preparát prostaty jsme bezprostředně po operaci doručili k patologickému zpracování. Prostatu jsme kompletně nakrájeli do bloků dle schématu publikovaného Montironim [49]. Z nádorové tkáně jsme pro další analýzu steroidů současně odebrali zhruba 150-200 mg nativní tkáně, kterou jsme zmrazili v tekutém dusíku a dále skladovali při -80 °C. Histologický vzorek odebraný ze stejného místa byl označen pro kontrolu, zda byla skutečně odebrána nádorová tkáň. Bločky jsme standardně fixovali ve 4 % pufovaném formalínu a obvyklým postupem zalili do parafinu. Řezy obarvené hematoxylinem a eosinem jsme vyhodnotili optickým mikroskopem. Hodnocení histologických řezů prováděli nezávisle dva zkušení patologové, odborníci na patologii urogenitálního traktu. U nádorové tkáně jsme

hodnotili následující parametry: histologický typ nádoru dle WHO klasifikace [16], GS s udáním nejčastějšího, druhého nejčastějšího a popřípadě terciárního stupně [18], stádium nádoru dle aktuálního vydání TNM [66], velikost nádoru, lokální invazi do periprostatické tkáně nebo semenných váčků, přítomnost perineurálního šíření, invazi do krevních či lymfatických cév a vztah nádoru k chirurgickému okraji resekátu [67,74].

Vzorky žilní krve jsme odebírali nalačno v den operace mezi 7. a 8. hodinou ránní. Po centrifugaci jsme séra uchovávali do definitivního zpracování při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sérovou koncentraci T a DHT jsme stanovili s využitím radioimunoanalýzy podle Hampla [25]. SHBG jsme určili pomocí IRMA kitu (Immunotech, Marseille, Francie). Volný T jsme určili výpočtem z hodnot koncentrace T a SHBG podle Vermeulena [75]. Sérovou koncentraci PSA jsme určili pomocí kitu pro detekci PSA (Abbott, Chicago, USA).

Pro statistickou analýzu jsme použili Mannův-Whitneyův test a Spearmanovy korelační koeficienty, data jsme zpracovali pomocí softwaru Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

Do studie jsme nezařadili pacienty, kteří podstoupili neadjuvantní léčbu před chirurgickým výkonem, pacienty s pozitivními chirurgickými okraji z histopatologického preparátu RRP, pacienty s endokrinním onemocněním, ledvinovou nebo jaterní poruchou a také pacienty s chronickou medikací, která by mohla ovlivnit hodnoty měřených hormonů.

4.3 Výsledky

U pacientů s KP jsme oproti mužům s BPH prokázali statisticky významně vyšší koncentrace T, DHT a epiT ve tkáni prostaty ($8,85 \pm 6,77$ vs. $6,44 \pm 6,43$ pmol/g, $p < 0,01$ pro DHT a $4,61 \pm 7,02$ vs. $3,44 \pm 4,53$ pmol/g, $p < 0,05$ pro T, $2,96 \pm 2,92$ vs. $2,39 \pm 3,04$ pmol/g, $p < 0,05$ pro epiT). Nenalezli jsme odpovídající korelace v sérových koncentracích těchto hormonů ani u jedné skupiny pacientů. Zjistili jsme statisticky významné korelace mezi koncentracemi intraprostatických androgenů a epitestosteronem a také mezi sérovými koncentracemi T a DHT ($p < 0,001$) a to jak ve skupině pacientů s BPH, tak i ve skupině pacientů s KP. Ani u jedné skupiny nebyla však nalezena žádná korelace mezi tkáňovými a sérovými koncentracemi T a DHT.

4.4 Diskuze

Výsledky studií, které se zabývají významem intraprostatických koncentrací androgenů ve vztahu ke KP a k BPH, jsou rozporuplné. Tento poznatek vyplývá i z klinické studie III. fáze Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT), která byla zahájena v roce 1993 a

trvala necelých 6 let. 18 862 mužů ve věku nad 55 let s normálním digitálním rektálním vyšetřením a s hladinou PSA < 3,0 ng/ml bylo randomizováno k užívání 5 mg/den finasteridu nebo placebo. Studie zkoumala hypotézu, zda muži léčení finasteridem, inhibítorem 5 α -RD, který tlumí přeměnu T na DHT, mají nižší riziko vzniku KP. Výsledky studie potvrdily nižší míru rizika vzniku KP u těchto pacientů, ale také zvýšené riziko výskytu KP vyššího stupně [72]. Příčinou vyššího GS může být vliv finasteridu na vzhled tumoru při patologickém vyšetření, podobně jako je tomu u LHRH agonistů [41], nebo fakt, že snížení objemu žlázy o 25 % vede ke zvýšení poměru žlázy, ze které je odebrán vzorek biopsie [34,72]. Finasterid ale také může nižší koncentrací intraprostatického T vytvářet prostředí pro nádory vyššího stupně, které jsou v růstu méně závislé na androgenech [50,62]. Komplexní vyhodnocení příčin vyššího záchyty agresivnějších forem KP u mužů léčených finasteridem v této největší studii, která byla zaměřená na chemoprevenci KP, nás však teprve čeká. Nishiyama et al. uvádějí, že intraprostatické koncentrace DHT jsou významně nižší u mužů s KP a s GS 7-10, než u mužů s GS \leq 6 [51]. Tento fakt může nejlépe vysvětlovat vyšší výskyt nádorů s vyšším GS, který uvádí studie PCPT. Nishiyama et al. navíc nezjistili žádnou korelaci mezi hladinou T nebo DHT v séru a koncentrací DHT ve tkáni [51]. Výše uvedená zjištění vedou k závěru, že biologicky agresivní KP může existovat v prostředí s nízkou hladinou DHT. Z těchto studií pramení hypotéza, že KP je v prostředí s nízkou hladinou T stimulován k dediferenciaci, která vede k agresivnější formě nádoru [36].

V nejbližší budoucnosti bude další zkoumání vztahu mezi androgeny a rizikem nebo prognózou KP nezbytně vyžadovat měření hladin hormonů jak v séru, tak i v prostatické tkáni.

4.5 Závěr

Výsledky studie ukazují, že oproti sérovým koncentracím mají intraprostatické koncentrace androgenů významně vyšší význam v posouzení celkového androgenního stavu pacientů s KP. Další výzkum ukáže, zda mohou být pomocným prognostickým markerem biologického chování KP.

5. PUBLIKACE č. 2: Endokrinní profil mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým karcinomem prostaty léčeným radikální prostatektomií

5.1 Úvod a cíle studie

Jedním ze směrů, kterým se uroonkologický výzkum KP v současnosti ubírá, je hledání prognostických markerů, které by pomohly předoperačně predikovat stádium onemocnění. Klinické stádium časných forem KP se ve 20-50 % liší od definitivní patologické klasifikace [15,40]. Sérové koncentrace hormonů, které prostatu ovlivňují, mohou být jedním z možných předoperačních markerů.

Studie vznikla za finanční podpory grantu IGA MZ (NR8096) ve spolupráci čtyř pracovišť - Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, Urologického oddělení University v Pise v Itálii, Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV a Endokrinologického ústavu.

Cílem práce bylo porovnat sérové koncentrace hormonů u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP, kteří podstoupili RRP.

5.2 Materiál a metody

U 250 mužů, kteří podstoupili v letech 2004-2006 RRP s histopatologickým nálezem KP (128 mužů s lokalizovaným a 122 s lokálně pokročilým KP), jsme z ranní krve nalačno v den operace stanovili sérové koncentrace T, DHEAS, E2, P, PRL, kortisolu, SHBG, FSH a LH.

RRP jsme provedli operační technikou podle Walsche, Donkera a Reintera [58,76-78], TVPE operační technikou podle Fullera a Culpa [11,21].

Nativní preparát prostaty jsme bezprostředně po operaci doručili k patologickému zpracování. Prostatu jsme kompletně nakrájeli do bloků dle schématu publikovaného Montironim [49]. Bločky jsme standardně fixovali ve 4 % pufovaném formalínu a obvyklým postupem zalili do parafínu. Řezy obarvené hematoxylinem a eosinem jsme vyhodnotili optickým mikroskopem. Hodnocení histologických řezů prováděli nezávisle dva zkušení patologové, odborníci na patologii urogenitálního traktu. U nádorové tkáně jsme hodnotili následující parametry: histologický typ nádoru dle WHO klasifikace [16], GS s udáním nejčastějšího, druhého nejčastějšího a popřípadě terciárního stupně [18], stádium nádoru dle aktuálního vydání TNM [66], velikost nádoru, lokální invazi do periprostatické tkáně nebo semenných váčků, přítomnost perineurálního šíření, invazi do krevních či lymfatických cév a vztah nádoru k chirurgickému okraji resektátu [67,74].

Vzorky žilní krve jsme odebírali nalačno v den operace mezi 7. a 8. hodinou ranní a bezprostředně poté centrifugovali 20 minut při 2000 otáčkách za minutu. Séra jsme uchovávali do definitivního zpracování při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sérovou koncentraci T jsme stanovili s využitím radioimunoanalýzy metodou podle Hampla [25]. DHEAS, E2, P, kortizol a PRL jsme určili pomocí RIA kitu (Immunotech, Marseille, Francie), SHBG, FSH, LH pak s využitím IRMA kitu (Immunotech, Marseille, Francie). Volný T jsme určili výpočtem z hodnot koncentrace T a SHBG podle Vermeulena [75]. Sérovou koncentraci PSA jsme určili pomocí kitu pro detekci PSA (Abbott, Chicago, USA).

Pro statistickou analýzu jsme použili párový t-test a Spearmanovy korelační koeficienty, data jsme zpracovali pomocí softwaru Medcalc 9.0.1.0 (Medcalc Software, Belgie).

Do studie jsme nezařadili pacienty, kteří podstoupili neadjuvantní léčbu před chirurgickým výkonem, pacienty s pozitivními chirurgickými okraji z histopatologického preparátu RRP, pacienty s endokrinním onemocněním, ledvinovou nebo jaterní poruchou a také pacienty s chronickou medikací, která by mohla ovlivnit hodnoty měřených hormonů.

5.3 Výsledky

U pacientů s lokalizovaným KP jsme oproti pacientům s lokálně pokročilým KP prokázali statisticky významně nižší koncentrace FSH v séru ($5,63 \pm 0,31$ vs. $7,07 \pm 0,65$ U/l; $p < 0,05$). Signifikantní korelace jsme podle očekávání našli mezi prekurzory a metabolity androgenů, estrogenů a metabolitů hypotalamo-hypofyzární osy. Nalezli jsme významnou korelaci mezi sérovými koncentracemi DHEAS a kortisolu u obou skupin pacientů ($p < 0,02$), mezi estradiolem a prolaktinem a mezi LH a prolaktinem ($p < 0,05$) u pacientů s lokálně pokročilým KP. U ostatních sledovaných parametrů jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl ani u jedné skupiny pacientů s KP.

5.4 Diskuze

KP je multihormonální onemocnění. Četné studie publikované v posledních letech se zabývají vztahem mezi sérovými koncentracemi různých hormonů a KP. V květnu 2008 byla uveřejněna metaanalýza, která se zabývá vztahem endogenních sexuálních hormonů a rizikem KP [79]. Pracovní skupina (The Endogenous Hormones and Prostate Cancer Collaborative Group) vyhodnotila 18 prospektivních studií, do kterých bylo zařazeno 3886 pacientů s KP a 6438 kontrol, od kterých byly k dispozici sérové koncentrace T. Podobné množství údajů se týkalo hodnot SHBG, což umožnilo vypočítat koncentraci volného T u 3550 pacientů a 5815

kontrol. Údaje o sérové koncentraci E2 byly získány od 2186 pacientů a 3039 kontrol, o androstendiolu od 2453 pacientů a 3035 kontrol. Nejméně od 1000 pacientů byly k dispozici hodnoty sérových koncentrací DHT, DHEAS a AE. Metaanalýza nenalezla signifikantní korelace mezi sérovými koncentracemi endogenních hormonů a rizikem KP.

Ve vztahu ke KP jsou gonadotropiny stálým předmětem zájmu [7,22,28,54]. Miller et al. odhalili, že hladiny T a gonadotropinů jsou po radikální prostatektomii výrazně zvýšeny [47]. Podle Lukkarinena et al. nebyly tyto endokrinní změny pozorovány po otevřené prostatektomii pro BHP [42]. Předchozí studie však prokázaly, že hladiny T, LH a FSH se zvyšují po radikální prostatektomii, ne však po transuretrální resekci prostaty (TURP) [44,47]. Autoři spekulují, že samotná prostata (nebo tranzitorní zóna při BPH) neinterferuje s hormonální osou hypotalamus-hypofýza, pokud se týká hladiny hormonů v séru. Tyto výsledky vedou k závěru, že jeden nebo více faktorů z normální nebo maligní prostaty může na ose hypotalamus-hypofýza vyvolat negativní zpětnou vazbu. Za kandidáta na takový inhibiční faktor můžeme považovat inhibin. Miller et al. předpokládají, že inhibin produkovaný buňkami KP potlačuje reakci osy hypotalamus-hypofýza, což vede k nižší hladině T. Poklesem produkce inhibinu v prostatě po radikální prostatektomii můžeme vysvětlit endokrinní změny po operaci [36]. Jedna ze studií prokázala pokles hladiny inhibinu po otevřené prostatektomii [53]. Můžeme se domnívat, že tento efekt je specifický pro KP, protože po TURP pro BPH se endokrinní hladiny v séru nezměnily a výrazně korelovaly se stupněm nádoru. V modelu u zvířat a buněčných kultur může inhibin produkovaný ve varlatech a v prostatě omezovat produkci a sekreci gonadotropinů v hypofýze [39,63].

5.5 Závěr

Výsledky studie ukazují, že sérové koncentrace hormonů nejsou přesvědčivým a spolehlivým prognostickým markerem k určení stádia nemoci u pacientů s KP. K upřesnění významu jednotlivých hormonů v patogenezi KP je nutný další základní výzkum.

6. PUBLIKACE č. 3: Adiponectin jako potenciální marker progresse karcinomu prostaty: studie u lokalizovaného a lokálně pokročilého karcinomu prostaty

6.1 Úvod a cíl studie

Na tukovou tkáň v současné době nahlížíme jako na velmi potentní endokrinní orgán, který produkovanými hormony zasahuje do řady dějů celého organismu. Adipocyty produkují hormony, bioaktivní peptidy a cytokiny. Tyto látky ovlivňují buněčnou diferenciaci, apoptózu, proliferaci či angiogenezi. Závěry některých studií poukazují na fakt, že viscerální tuk může být rizikovým faktorem vzniku KP či faktorem určujícím jeho progresi [1,10,60]. Adiponectin, jako významný hormon tukové tkáně, se tedy může spolupodílet na progresi latentních či mikroskopických KP do signifikantního či metastatického stádia.

Studie vznikla za finanční podpory VZ 3. LF UK (MSM0021620808) a grantu IGA MZ (NR8096) ve spolupráci pěti pracovišť - Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV, Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, Oddělení biostatistiky a informatiky SZÚ, Ústavu biochemie a patobiochemie 3. LF UK a FNKV a 3. interní kliniky 1. LF UK a VFN.

Cílem práce bylo vyhodnotit sérové koncentrace adiponectinu, imunohistochemickou expresi adiponectinu v prostatické tkáni, histopatologické charakteristiky nádoru a ostatní sledované parametry u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP, kteří podstoupili RRP a u mužů s BPH, kteří podstoupili TVPE.

6.2 Materiál a metody

U 43 mužů s KP a 25 mužů s BPH, kteří podstoupili v letech 2004-2005 RRP s histopatologickým nálezem KP (17 mužů s lokalizovaným a 26 s lokálně pokročilým KP) a TVPE s histopatologickým nálezem BPH, jsme z ranní krve nalačno v den operace stanovili sérové koncentrace adiponectinu, PSA, free PSA, kortizolu, PRL, T, SHBG, DHEAS, E2, P, LH, FSH, inzulínu, glukózy, TG, HDL, LDL a celkového Chol.

RRP jsme provedli operační technikou podle Walsche, Donkera a Reinera [58,76-78], TVPE operační technikou podle Fullera a Culpa [11,21].

U všech pacientů jsme určili tělesnou výšku, váhu a také BMI, který se vypočítá jako váha v kilogramech dělená druhou mocninou výšky v metrech (kg/m^2). HOMA index jsme stanovili podle vzorce: inzulín nalačno ($\mu\text{U/ml}$) x glukosa (mmol/l)/22,5. Aterogenní index

jsme určili výpočtem jako podíl sérových koncentrací celkového Chol a HDL. FAI jsme vypočítali podle vzorce $100 \times T/SHBG$ (nmol/l).

Nativní preparát prostaty jsme bezprostředně po operaci doručili k patologickému zpracování. Prostatu jsme kompletně nakrájeli do bloků dle schématu publikovaného Montironim [49]. Bločky jsme standardně fixovali ve 4 % pufovaném formalínu a obvyklým postupem zalili do parafínu. Řezy obarvené hematoxylinem a eosinem jsme vyhodnotili optickým mikroskopem. Hodnocení histologických řezů prováděli nezávisle dva zkušení patologové, odborníci na patologii urogenitálního traktu. U nádorové tkáně jsme hodnotili následující parametry: histologický typ nádoru dle WHO klasifikace [16], GS s udáním nejčastějšího, druhého nejčastějšího a popřípadě terciárního stupně [18], stádium nádoru dle aktuálního vydání TNM [66], velikost nádoru, lokální invazi do periprostatické tkáně nebo semenných váčků, přítomnost perineurálního šíření, invazi do krevních či lymfatických cév a vztah nádoru k chirurgickému okraji resektátu [67,74].

Vzorky žilní krve jsme odebírali nalačno v den operace mezi 7. a 8. hodinou ranní a bezprostředně poté centrifugovali 20 minut při 2000 otáčkách za minutu. Séra jsme uchovávali do definitivního zpracování při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sérovou koncentraci adiponektinu jsme určili s využitím RIA kitu (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). Ostatní sledované parametry jsme stanovili standardními laboratorními metodami Ústavu biochemie a patobiochemie 3. LF UK a FNKV.

Z každé skupiny nemocných jsme vybrali 10 pacientů, u kterých jsme imunohistochemickým vyšetřením s využitím protilátky Arcp30 (Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko) vyhodnotili expresi adiponektinu v prostatické tkáni. Intenzitu exprese jsme klasifikovali 4-stupňovou škálou (0-3).

Pro statistickou analýzu jsme použili Mannův-Whitneyův a Kruskalův-Wallisův test s modifikací podle Dunneta, Spearmanovy korelační koeficienty a ROC analýzu. Data jsme zpracovali pomocí softwaru SigmaStat (Jandel Scientific, USA) a SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA).

Do studie jsme nezařadili pacienty, kteří podstoupili neadjuvantní léčbu před chirurgickým výkonem, pacienty s pozitivními chirurgickými okraji z histopatologického preparátu RRP, pacienty s endokrinním onemocněním, ledvinovou nebo jaterní poruchou a také pacienty s chronickou medikací, která by mohla ovlivnit hodnoty měřených hormonů.

6.3 Výsledky

Nezjistili jsme signifikantní rozdíly v sérových koncentracích adiponectinu u pacientů s KP a BPH ($18,68 \pm 7,75$ vs. $20,47 \pm 10,13$ ng/ml; $p = 0,64$). U pacientů s lokálně pokročilým KP jsme oproti pacientům s lokalizovaným KP prokázali statisticky významně vyšší koncentrace adiponectinu v séru ($21,41 \pm 8,12$ vs. $14,51 \pm 4,92$ ng/ml; $p = 0,003$). Prokázali jsme pozitivní korelaci mezi BMI a GS ($26,61 \pm 2,64$ vs. $28,80 \pm 3,40$; $GS \leq 6$ vs. $GS \geq 7$, $p < 0,02$). U pacientů s lokalizovaným KP jsme pozorovali negativní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a BMI ($p = 0,07$), pozitivní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a prolaktinu ($p = 0,05$) a negativní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a T ($p = 0,009$), DHEAS ($p = 0,02$) a SHBG ($p = 0,004$). U pacientů s lokálně pokročilým KP jsme pozorovali negativní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a BMI ($p = 0,05$), pozitivní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a prolaktinu ($p = 0,03$) a negativní korelaci mezi hladinou adiponectinu a inzulínu ($p = 0,05$). Imunohistochemické vyšetření prokázalo oproti benigní tkáni prostaty vyšší intenzitu adiponectinu ve tkáni prostaty s nádorem a také s intraepiteliální neoplázií. V ostatních sledovaných parametrech jsme nenalezli signifikantní rozdíly.

6.4 Diskuze

Adiponectin je protein o hmotnosti 30 kDa produkovaný převážně adipocyty v bílé tukové tkáni. U lidí byl adiponectin v tukové tkáni nazván APM1 (AdiPose Most abundant gene transcript 1). Gen pro lidský adiponectin je na 27. chromosomu (3q27). V séru cirkuluje buď ve formě celé molekuly a nebo v podobě kratších fragmentů [30]. Význam krátkých forem není ještě zcela objasněn, ale předpokládá se jejich biologická funkce, protože tyto krátké fragmenty často vykazují vyšší biologický účinek než molekula běžné délky. Adiponectin, stejně jako jiné hormony tukové tkáně, působí pomocí specifických receptorů. Obě biologické formy adiponectinu – fibrilární a globulární (f-adiponectin a g-adiponectin) – působí na nádorové buněčné linie DU145, PC-3 a LNCaP-FCG stimulací JNK a fosforylací c-Fos, v případě linie DU145 ještě inhibicí aktivace STAT3 [48]. Adiponectin tak ovlivňuje chování nádorových buněk modulací aktivity JNK a STAT3. Ve výše zmiňovaných buněčných liniích byly identifikovány i oba typy adiponectinových receptorů AdipoR1 a AdipoR2, ale vlastní adiponectin nebyl překvapivě v liniích LNCaP a PC-3 popsán. Na inhibici nádorového růstu v androgen-dependentních a independentních buněčných liniích se podílí zejména vysokomolekulární komplex f-adiponectinu. F-adiponectin může také

pravděpodobně potlačovat proliferaci neuroendokrinních buněk prostaty, jak bylo popsáno u buněčné linie LNCaP-FCG, která exprimuje receptory pro adiponectin [48].

Doposud byly publikovány čtyři studie zabývající se vztahem sérových hladin adiponectinu a KP [6,19-20,24]. Byla popsána negativní korelace sérových hladin adiponectinu s pokročilostí a stupněm diferenciací nádoru [19-20]. U pokročilého nádorového onemocnění byly zjištěny tyto hladiny nižší než u BPH a KP stádia T2 [24]. Z výsledků těchto studií můžeme usuzovat, že adiponectin souvisí s agresivitou nádorového onemocnění. V rozporu s výsledky předchozích studií jsou výsledky studie nedávno provedené Baillargeonem, při které byli vyšetřováni pacienti ze studie SABOR (San Antonio Study of Biomarkers of Risk). Tato studie neprokázala žádné rozdíly v sérových hladinách adiponectinu mezi pacienty s BPH a KP [6]. Nicméně sami autoři připouštějí možnost, že někteří z pacientů v této prospektivní studii měli v době vstupu do studie okultní KP, což vysvětluje poměrně krátký čas mezi odběrem krevních vzorků a detekcí karcinomu (1,43 roku).

6.5 Závěr

Výsledky naší studie ukázaly vyšší sérové hladiny adiponectinu u lokálně pokročilého KP při srovnání s lokalizovaným KP. Tomuto nálezu odpovídaly i výsledky imunohistochemického barvení tkáně karcinomu, PIN a BPH. Adipokiny a obezita hrají bezpochyby důležitou, nicméně v současnosti ne zcela objasněnou úlohu při vzniku a progresi KP. Na rozdíl od klasických témat urologie tak mohou určovat další možné zaměření budoucího výzkumu.

7. PUBLIKACE č. 4: Sérové koncentrace rezistinu u benigní hyperplázie prostaty a non-metastatického karcinomu prostaty: potenciální role v progresi karcinomu

7.1 Úvod a cíl studie

Tuková tkáň byla až do počátku 90. let 20. století považována za tkáň s více méně statickou a pasivní funkcí, jejímž hlavním úkolem je zabezpečovat mechanickou obranu organismu a vytvářet zásobárnu energie. Tento tradiční pohled na tukovou tkáň byl narušen v polovině 90. let, kdy byl objeven první hormon produkovaný tukovou tkání. Jeho objev nastartoval výzkum endokrinní funkce tukové tkáně, díky kterému bylo doposud objeveno okolo 20 hormonů, které jsou z velké části produkovány bílou tukovou tkání [30]. Rezistin je proteinový hormon původně objevený jako předpokládané pojítko mezi obezitou a inzulínovou rezistencí [69].

Studie vznikla za finanční podpory VZ 1. LF UK (MZOVFN2005) ve spolupráci pěti pracovišť - Ústavu patologie 3. LF UK a FNKV, Urologické kliniky 3. LF UK a FNKV, Oddělení biostatistiky a informatiky SZÚ, Ústavu biochemie a patobiochemie 3. LF UK a FNKV a 3. interní kliniky 1. LF UK a VFN.

Cílem práce bylo porovnat sérové koncentrace rezistinu, imunohistochemickou expresi rezistinu v prostatické tkáni, histopatologické charakteristiky nádoru a ostatní sledované parametry u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP, kteří podstoupili RRP a u mužů s BPH, kteří se podrobili TVPE.

7.2 Materiál a metody

U 26 mužů s BPH a 43 mužů s KP, kteří podstoupili v letech 2004-2005 RRP s histopatologickým nálezem KP (18 mužů s lokalizovaným a 24 s lokálně pokročilým KP) a TVPE s histopatologickým nálezem BPH, jsme z ranní krve nalačno v den operace stanovili sérové koncentrace rezistinu, PSA, free PSA, kortisolu, CRP, PRL, T, SHBG, DHEAS, E2, P, LH, FSH, inzulínu, glukózy, TG, HDL, LDL a celkového Chol.

RRP jsme provedli operační technikou podle Walsche, Donkera a Reinera [58,76-78], TVPE operační technikou podle Fullera a Culpa [11,21].

U všech pacientů jsme určili tělesnou výšku, váhu a také BMI, který se vypočítá jako váha v kilogramech dělená druhou mocninou výšky v metrech (kg/m^2). HOMA index jsme stanovili podle vzorce: inzulín nalačno ($\mu\text{U/ml}$) x glukosa (mmol/l)/22,5. Aterogenní index

jsme určili výpočtem jako podíl sérových koncentrací celkového Chol a HDL. FAI jsme vypočítali podle vzorce $100 \times T/SHBG$ (nmol/l).

Nativní preparát prostaty jsme bezprostředně po operaci doručili k patologickému zpracování. Prostatu jsme kompletně nakrájeli do bloků dle schématu publikovaného Montironim [49]. Bločky jsme standardně fixovali ve 4 % pufovaném formalínu a obvyklým postupem zalili do parafínu. Řezy obarvené hematoxylinem a eosinem jsme vyhodnotili optickým mikroskopem. Hodnocení histologických řezů prováděli nezávisle dva zkušení patologové, odborníci na patologii urogenitálního traktu. U nádorové tkáně jsme hodnotili následující parametry: histologický typ nádoru dle WHO klasifikace [16], GS s udáním nejčastějšího, druhého nejčastějšího a popřípadě terciárního stupně [18], stádium nádoru dle aktuálního vydání TNM [66], velikost nádoru, lokální invazi do periprostatické tkáně nebo semenných váčků, přítomnost perineurálního šíření, invazi do krevních či lymfatických cév a vztah nádoru k chirurgickému okraji resektátu [67,74].

Vzorky žilní krve jsme odebírali nalačno v den operace mezi 7. a 8. hodinou ranní a bezprostředně poté centrifugovali 20 minut při 2000 otáčkách za minutu. Séra jsme uchovávali do definitivního zpracování při teplotě -80°C . Sérovou koncentraci rezistinu jsme určili s využitím ELISA kitu (Biovendor, Brno, Česká republika). Ostatní sledované parametry jsme stanovili standardními laboratorními metodami Ústavu biochemie a patobiochemie 3. LF UK a FNKV.

U všech pacientů jsme imunohistochemickým vyšetřením s využitím králičí protilátky (Phoenix Pharmaceuticals, Kalifornie, USA) vyhodnotili expresi rezistinu v prostatické tkáni.

Pro statistickou analýzu jsme použili párový t-test, ANOVA metodu a Spearmanovy korelační koeficienty, data jsme zpracovali pomocí softwaru SigmaStat (Jandel Scientific, USA).

Do studie jsme nezařadili pacienty, kteří podstoupili neadjuvantní léčbu před chirurgickým výkonem, pacienty s pozitivními chirurgickými okraji z histopatologického preparátu RRP, pacienty s endokrinním onemocněním, ledvinovou nebo jaterní poruchou a také pacienty s chronickou medikací, která by mohla ovlivnit hodnoty měřených hormonů.

7.3 Výsledky

Neprokázali jsme statistické rozdíly v sérových koncentracích rezistinu u pacientů s BPH a KP. Nenalezli jsme rozdíly v koncentracích rezistinu ani po stratifikaci pacientů dle stádia nemoci, agresivity onemocnění nebo vaskulární invaze. U pacientů s lokálně pokročilým KP bez invazí nádoru do semenných váčků jsme oproti pacientům s invazí nádoru

do semenných váčků prokázali statisticky významně vyšší koncentrace rezistinu v séru ($6,91 \pm 2,79$ vs. $5,04 \pm 2,03$ ng/ml; $p = 0,049$). V ostatních sledovaných parametrech jsme nenalezli signifikantní rozdíly.

7.4 Diskuze

Rezistin je proteinový hormon jehož hladiny jsou v experimentu obvykle zvýšeny u obézních zvířat [69]. Objeven byl jako jeden z faktorů, které byly v tukové tkáni nejvýrazněji sníženy po podávání inzulín-senzitizujících léků thiazolidindionů. Na rozdíl od hlodavců je rezistin u lidí produkován převážně makrofágy, a to pravděpodobně více makrofágy mimo tukovou tkáň než přímo v tukové tkáni [61]. Produkce rezistinu lidskými adipocyty je podstatně nižší a některé studie tuto produkci dokonce vůbec neprokázaly. Pokud jde o sérové hladiny rezistinu u lidí, i zde jsou výsledky relativně kontroverzní. Hlavním regulačním faktorem produkce rezistinu je aktivace zánětlivé reakce, která vede k významnému zvýšení hladin rezistinu. Hladiny i lokální produkce rezistinu jsou tak výrazně zvýšeny u pacientů s akutním zánětem (například kriticky nemocní pacienti) nebo některými chronickými zánětlivými nemocemi (např. revmatoidní artritida). Klinické využití modulace hladin rezistinu zatím není jasné a nejsou k dispozici ani způsoby jak hladiny rezistinu přímo ovlivnit.

Zvýšené sérové koncentrace rezistinu byly popsány u pacientek s nádory prsu [33]. V literatuře nebyla prozatím publikována studie, která by se zabývala sérovými koncentracemi rezistinu u pacientů s BPH nebo KP.

7.5 Závěr

Metabolismus tukové tkáně a procesy na molekulární úrovni nám mohou pomoci pochopit vztah obesity a KP. Úloha rezistinu v procesech metabolismu, stresu a zánětu je nejasná. Tak jako ostatní hormony tukové tkáně, i rezistin se může spolupodílet na progresi maligních buněk KP. K upřesnění jeho významu v patogenezi KP je nutný další základní výzkum.

8. SOUHRN

Cílem této disertační práce je přispět k pochopení mechanismů a regulačních pochodů, kterými ovlivňují hormony prostatickou tkáň. Zahrnuje celkem 4 experimentální práce, které se zabývají hormonálním prostředím u mužů s KP a s BPH.

V publikaci číslo 1. jsme porovnávali sérové koncentrace a koncentrace hormonů v prostatické tkáni u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP, kteří podstoupili RRP a s BPH, kteří postoupili TVPE. U pacientů s KP jsme oproti mužům s BPH prokázali statisticky významně vyšší koncentrace T, DHT a epiT ve tkáni prostaty, nenalezli jsme odpovídající korelace v sérových koncentracích těchto hormonů ani u jedné skupiny pacientů. Zjistili jsme statisticky významné korelace mezi koncentracemi intraprostatických androgenů a epitestosteronem a také mezi sérovými koncentracemi T a DHT, a to jak ve skupině pacientů s BPH, tak i ve skupině pacientů s KP. Ani u jedné skupiny nebyla však nalezena korelace mezi tkáňovými a sérovými koncentracemi T a DHT. Výsledky studie ukazují, že oproti sérovým koncentracím mají intraprostatické koncentrace androgenů významně vyšší význam v posouzení celkového androgenního stavu pacientů s KP.

Publikace číslo 2. se zabývá sérovými koncentracemi hormonů u pacientů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP po RRP. U pacientů s lokalizovaným KP jsme oproti mužům s lokálně pokročilým KP prokázali statisticky významně nižší koncentrace FSH v séru. Signifikantní korelace jsme podle očekávání našli mezi prekurzory a metabolity androgenů, estrogenů a metabolitů hypotalamo-hypofyzární osy. Nalezli jsme významnou korelaci mezi sérovými koncentracemi DHEAS a kortisolu u obou skupin pacientů, mezi estradiolem a prolaktinem a mezi LH a prolaktinem u pacientů s lokálně pokročilým KP. Výsledky naší studie jen potvrzují výsledky publikace číslo 1. a ukazují, že sérové koncentrace hormonů nejsou přesvědčivým a spolehlivým prognostickým markerem k určení stádia nemoci u pacientů s KP.

Publikace číslo 3. a 4. vyhodnocují sérové koncentrace adiponektinu, rezistinu, imunohistochemickou expresi těchto hormonů v prostatické tkáni, histopatologické charakteristiky nádoru a další parametry u mužů s lokalizovaným a lokálně pokročilým KP, kteří podstoupili RRP a u mužů s BPH, kteří podstoupili TVPE. V publikaci číslo 3. jsme nezjistili signifikantní rozdíly v sérových koncentracích adiponektinu u pacientů s KP a BPH. U pacientů s lokálně pokročilým KP jsme oproti pacientům s lokalizovaným KP prokázali statisticky významně vyšší koncentrace adiponektinu v séru. Prokázali jsme pozitivní korelaci

mezi BMI a GS. U pacientů s lokalizovaným KP jsme pozorovali negativní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a BMI, pozitivní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a prolaktinu a negativní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a T, DHEAS a SHBG. U pacientů s lokálně pokročilým KP jsme pozorovali negativní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a BMI, pozitivní korelaci mezi sérovou koncentrací adiponectinu a prolaktinu a negativní korelaci mezi hladinou adiponectinu a inzulinu. Imunohistochemické vyšetření prokázalo oproti benigní tkáni prostaty vyšší intenzitu adiponectinu ve tkáni prostaty s nádorem a také s intraepiteliální neoplázií. V publikaci číslo 4. jsme neprokázali statistické rozdíly v sérových koncentracích rezistinu u pacientů s BPH a KP. Nenalezli jsme rozdíly v koncentracích rezistinu ani po stratifikaci pacientů dle stádia nemoci, agresivity onemocnění nebo vaskulární invaze. U pacientů s lokálně pokročilým KP bez invazí nádoru do semenných váčků jsme oproti pacientům s invazí nádoru do semenných váčků prokázali statisticky významně vyšší koncentrace rezistinu v séru. Výsledky těchto dvou studií ukazují, že hormony tukové tkáně hrají bezpochyby důležitou, nicméně v současnosti ne zcela objasněnou úlohu v karcinogenezi KP. Na rozdíl od klasických témat urologie tak mohou určovat další možné zaměření budoucího výzkumu.

9. LITERATURA

1. Amling CL. Relationship between obesity and prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2005;15(3):167-171.
2. Amling CL, Riffenburgh RH, Sun L, et al. Pathologic variables and recurrence rates as related to obesity and race in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2004;22(3):439-445.
3. Andersson SO, Wolk A, Bergstrom R, et al. Body size and prostate cancer: a 20-year follow-up study among 135006 Swedish construction workers. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(5):385-389.
4. Andriole G, Bruchovsky N, Chung LW. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 2004;172:1399-1403.
5. Aziz N, Hartman T, Barrett M, et al. Weight and prostate cancer in the Alpha-Tocopherol. Beta-Carotene Cancer Prevention (ATBC) Trial [Abstract]. *ASCO* 2000:19.
6. Baillargeon J, Platz EA, Rose DP, et al. Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(7):1331-1335.
7. Ben-Josef E, Yang SY, Ji TH, et al. Hormone refractory prostate cancer cells express functional follicle-stimulating hormone receptor (FSHR). *J Urol* 1999;161:970-976.
8. Black RJ, Bray F, Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997;33:1075-1107.
9. Bray F, Sankila R, Ferlay J, et al. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002;38:99-166.
10. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003;348(17):1625-1638.
11. Culp DA. Benign prostatic hyperplasia: Early recognition and management. *Urol Clin North Am* 1975;2:29-48.
12. Čihák R. Prostata, in: *Anatomie 2 - Splanchnologia*. Avicenum 1987:289-293.

13. Debes JD, Tindall DJ. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Letters* 2002;187:1-7.
14. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita, [2005] , 12.8.2008 [cit. 2008-8-12]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>.
15. Dvořáček J, Povýšil C, Šafařík L, et al. Nádory prostaty, in. *Onkourologie*. Galén 2005:225-433.
16. Eble JN, Kauter G, Epstein JI, et al. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs (IARC/World Health Organization Classification of Tumours). Lyon, France: IARC Press; 2003.
17. Engeland A, Tretli S, Bjorge T. Height, body mass index, and prostate cancer: a follow-up of 950000 Norwegian men. *Br J Cancer* 2003;89(7):1237-1242.
18. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, et al. ISUP Grading Committee: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1228-1242.
19. Freedland SJ, Aronson WJ, Kane CJ, et al. Impact of obesity on biochemical control after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: a report by the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital database study group. *J Clin Oncol* 2004;22(3):446-453.
20. Freedland SJ, Sokoll LJ, Platz EA, et al. Association between serum adiponectin, and pathological stage and grade in men undergoing radical prostatectomy. *J Urol* 2005;174:1266-1270.
21. Fuller E. Six successful and successive cases of prostatectomy. *J Cutan Genitourin Dis* 1895;13:229-239.
22. Garde SV, Sheth AR, Shah MG, et al. Prostate - an extrapituitary source of follicle-stimulating hormone (FSH): occurrence, localization, and de novo biosynthesis and its hormonal modulation in primates and rodents. *Prostate* 1991;18:271-287.
23. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, et al. Body mass index and risk of prostate cancer in U.S. health professionals. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(16):1240-1244.
24. Goktas S, Yilmaz MI, Caglar K, et al. Prostate cancer and adiponectin. *Urology* 2005;65(6):1168-1172.
25. Hampl R, Putz Z, Stárka L. Radioimunologické stanovení dihydrotestosteronu a jeho význam pro laboratorní diagnostiku. *Biochem Clin Bohemoslov* 1990;19:157-163.

26. Han M, Partin AW, Pound CR, et al. Long-term biochemical disease-free and cancer specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* 2001;28:555-565.
27. Hill M, Petrik R, Hampl R, Starka L. The concentrations of the endogenous C19-steroids in hyperplastic prostatic tissue and the effect of finasteride treatment. *Horm Metab Res* 1996;28:562-564.
28. Hilz H, Graefen M, Noldus J, et al. Advanced prostate cancer is associated with a decrease in serum luteinizing hormone. *Eur Urol* 2000;38:243-249.
29. Hoffman MA, DeWolf WC, Morgentaler A. Is low serum free testosterone a marker for high grade prostate cancer? *J Urol* 2000;163:824-827.
30. Housa D, Housova J, Vernerova Z, et al. Adipocytokines and cancer. *Physiol Res* 2006;55(3):233-244.
31. Hunter J. Observations on the flanda situated between the rektum and bladder, called vesicuae seminales. *Coll. Works of J. Hunter, Vol. 4, J.F. Palmer, Londoin* 1786:31.
32. Chodak GW, Vogelzang NJ, Caplan RJ, et al. Independent prognostic factors in patients with metastatic (stage D2) prostate cancer. *JAMA* 1991;265:618-621.
33. Kang JH, Yu BY, Youn DS. Relationship of serum adiponectin and resistin levels with breast cancer risk. *J Korean Med Sci* 2007;22:117-121.
34. Kulkarni GS, Al-Azab R, Lockwood G, et al. Evidence for a biopsy derived grade artifact among larger prostate glands. *J Urol* 2006;175(2):505-509.
35. Imamoto T, Suzuki H, Fukasawa S, et al. Pretreatment serum testosterone level as a predictive factor of pathological stage in localized prostate cancer patiens treated with radical prostatectomy. *Eur Urol* 2005;47:308-312.
36. Imamoto T, Suzuki H, Yano M, et al. The role of testosterone in the pathogenesis of prostate cancer. *Int J Urol* 2008;15(6):472-480.
37. Imamoto T, Suzuki H, Akakura K, et al. Pretreatment serum level of testosterone as a prognostic factor in Japanese men with hormonally treated stage D2 prostate cancer. *Endocr J* 2001;48:573-578.
38. Isom-Batz G, Bianco FJ Jr, Kattan MW, et al. Testosterone as a predictor of pathological stage in clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2005;173:1935-1937.
39. Lokeshwar BL, Hurkadli KS, Sheth AR, et al. Human prostatic inhibin suppresses tumor growth and inhibits clonogenic cell survival of a model prostatic adenocarcinoma, the Dunning R3327G rat tumor. *Cancer Res* 1993;53:4855-4859.

40. Lu-Yao GL, Potosky AL, Albertsen PC, et al. Follow-up prostate cancer treatments after radical prostatectomy: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:166.
41. Lucia MS, Epstein JI, Goodman PJ, et al. Finasteride and high-grade prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(18):1375-1383.
42. Lukkarinen O, Hammond GL, Kontturi M. Peripheral and prostatic vein steroid concentrations in benign prostatic hypertrophy patients before and after removal of the adenoma. *Scand J Urol Nephrol* 1980;14:225-227.
43. Lukes M, Urban M, Zalesky M, et al. Prostate-Specific Antigen: Current Status. *Folia Biol (Praha)* 2001;45:41-49.
44. Madersbacher S, Schatzl G, Bieglmayer C. Impact of radical prostatectomy and TURP on the hypothalamic-pituitary-gonadal hormone axis. *Urology* 2002;60:869-874.
45. Marks LS, Mostaghel EA, Nelson PS. Prostate tissue androgens: history and current clinical relevance. *Urology* 2008;72(2):247-254.
46. Massengill JC, Sun L, Moul JW, et al. Pretreatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol* 2003;169:1670-1675.
47. Miller LR, Partin AW, Chan DW. Influence of radical prostatectomy on serum hormone levels. *J Urol* 1998;160:449-453.
48. Miyazaki T, Bub JD, Uzuki M, et al. Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:79-87.
49. Montironi R, van der Kwast T, Boccon-Gibod L, et al. Handling and pathology reporting of radical prostatectomy specimens. *Eur Urol* 2003;44:626-636.
50. Morgentaler A, Bruning CO III, DeWolf WC. Incidence of occult prostate cancer among men with low total or free serum testosterone. *JAMA* 1996;276:1904-1906.
51. Nishiyama T, Ikarashi T, Hashimoto Y, et al. Association between the dihydrotestosterone level in the prostate and prostate cancer aggressiveness using the Gleason score. *J Urol* 2006;176:1387-1391.
52. Partin AW, Pound CR, Clemens JQ, et al. Serum PSA after anatomic radical retropubic prostatectomy. The Johns Hopkins experience after 10 years. *Urol Clin North Am* 1993;20:713-725.
53. Phadke MA, Vanage GR, Sheth AR. Circulating levels of inhibin, prolactin, TSH, LH, and FSH in benign prostatic hypertrophy before and after tumor resection. *Prostate* 1987;10:115-122.

54. Porter AT, Ben-Josef E. Humoral mechanism in prostate cancer: A role for FSH. *Urol Oncol* 2001;6:131-138.
55. Precioso D, Denis JL, Klocker H, Sciarra A, Reis M, Naber K, et al. Estrogens and aspects of prostate disease. *Int J Urol* 2007;14:1-16.
56. Prehn RT. On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Res* 1999;59:4161-4164.
57. Presti JC Jr, Lee U, Brooks JD, et al. Lower body mass index is associated with a higher prostate cancer detection rate and less favorable pathological features in a biopsy population. *J Urol* 2004;171:2199-2202.
58. Reiner WG, Walsh PC. An anatomical approach to the surgical management of the dorsal vein and Santorini's plexus during radical retropubic surgery. *J Urol* 1979;121:198-200.
59. Ribeiro M, Ruff P, Falkson G. Low serum testosterone and a younger age predict for a poor outcome in metastatic prostate cancer. *Am J Clin Oncol* 1997;20:605-608.
60. Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, et al. Body mass index, height, and prostate cancer mortality in two large cohorts of adult men in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(4):345-353.
61. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, et al. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001;50:2199-2202.
62. Scardino PT. The prevention of prostate cancer - the dilemma continues. *N Engl J Med* 2003;349:297-299.
63. Sheth AR, Garde SV, Mehta MK, et al. Hormonal modulation of biosynthesis of prostatic specific antigen, prostate specific acid phosphatase and prostatic inhibin peptide. *Indian J Exp Biol* 1992;30:157-161.
64. Schatzl G, Madersbacher S, Thurnidl T, et al. High-grade prostate cancer is associated with low serum testosterone levels. *Prostate* 2001;47:52-58.
65. Schuurman AG, Goldbohm RA, Dorant E, et al. Anthropometry in relation to prostate cancer risk in the Netherlands Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2000;151(6):541-549.
66. Sobin LH, Wittekind CH. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th Edition. Wiley; 2002.
67. Srigley JR, Amin MB, Bostwick DG, et al. Updated protocol for the examination of specimen from patients with carcinomas of the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):1034-1039.

68. Starka L, Hampl R, Hill M, et al. Epitestosterone in human blood and prostatic tissue. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:469-473.
69. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312.
70. Teloken C, Da Ros CT, Caraver F, et al. Low serum testosterone levels are associated with positive surgical margins in radical retropubic prostatectomy: hypogonadism represents bad prognosis in prostate cancer. *J Urol* 2005;176:2178-2880.
71. Thompson IM. Chemoprevention of prostate cancer: agents and study designs. *J Urol* 2007;178:S9-S13.
72. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349(3):215-224.
73. Thompson IM, Leach R, Troyer D, et al. Relationship of body mass index and prostate specific antigen in a population-based study. *Urol Oncol* 2004;22(2):127-131.
74. van der Kwast TH, Collette L, Van Poppel H, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Genito-Urinary Cancer Groups. Impact of pathology review of stage and margin status of radical prostatectomy specimens (EORTC trial 22911). *Virchows Arch* 2006;449:428-434.
75. Vermeulen A, Kaufman JM. Diagnosis of hypogonadism in the aging male. *Aging Male* 2002;5:170-176.
76. Walsh PC, Donker PJ. Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol* 1982;128:492-497.
77. Walsh PC. Anatomic radical retropubic prostatectomy. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ eds, *Campbell's Urology*, Vol. 4, Chapt. 90, 8th edn. Philadelphia: WB Saunders Co, 2002:3107-3129.
78. Walsh PC. Anatomic radical prostatectomy. Evolution of the surgical technique. *J Urol* 1998;160:2418-2424.
79. Weiss JM, Huang WY, Rinaldi S, et al. Endogenous sex hormones and the risk of prostate cancer: a prospective study. *Int J Cancer* 2008;122(10):2345-2350.
80. Wilding G. Endocrine control of prostate cancer. *Cancer Surv* 1995;23:43-62.
81. Wilson JD, Roehrbom C. Long-term consequences of castration in men lessons from the Skoptzy and the eunuchs of the Chinese and Ottoman courts. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999;84(12):4324-4331.

82. Yano M, Imamoto T, Suzuki H, et al. The clinical potential of pretreatment serum testosterone level to improve the efficiency of prostate cancer screening. *Eur Urol* 2007;51:293-295.
83. Zalesky M, Urban M, Smerhovský Z, et al. Value of power Doppler sonography with 3D reconstruction in preoperative diagnostics of extraprostatic tumor extension in clinically localized prostate cancer. *Int J Urol* 2008;15(1):68-75.
84. Zhang PL, Rosen S, Veeramachaneni R, et al. Association between prostate cancer and serum testosterone levels. *Prostate* 2002;53:179-182.

10. PŘÍLOHY

- 10.1 Heráček, Steroids 2007
- 10.2 Heráček, Neuroendocrinology Letters 2007
- 10.3 Heráček, European Urology Supplements 2007
- 10.4 Heráček, European Andrology Supplement 2007
- 10.5 Heráček, Česká urologie 2007
- 10.6 Housa, Physiological Research 2008
- 10.7 Housa, Neoplasma 2008



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids

Tissue and serum levels of principal androgens in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

Jiri Heracek^{a,*}, Hampl Richard^b, Hill Martin^b, Starka Luboslav^b, Sachova Jana^a, Kuncova Jitka^c, Eis Vaclav^d, Urban Michael^a, Mandys Vaclav^d

^a Department of Urology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Ruska 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic

^b Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

^c Department of Surgery, Division of Urology, St. Chiara Hospital, University of Pisa Italy

^d Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2006

Received in revised form

29 January 2007

Accepted 31 January 2007

Published on line 13 February 2007

Keywords:

Prostate cancer

Benign prostatic hyperplasia

Serum androgens

Tissue androgens

Epitestosterone

SHBG

ABSTRACT

Androgens are considered to play a substantial role in pathogenesis of both benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer. The importance of determination of androgen levels in tissue and serum for cancer progression and prognosis has been poorly understood. The aim of study was to find out hormonal differences in both diseases, their correlations between intraprostatic and serum levels and predictory value of their investigation. Testosterone, dihydrotestosterone, androstenedione and also epitestosterone were determined in prostate tissue from 57 patients who underwent transvesical prostatectomy for BPH and 121 patients after radical prostatectomy for prostate cancer. In 75 subjects with cancer and 51 with BPH the serum samples were analyzed for testosterone, dihydrotestosterone and SHBG. Significantly higher intraprostatic androgen concentrations, i.e. 8.85 ± 6.77 versus 6.44 ± 6.43 pmol/g, $p < 0.01$ for dihydrotestosterone, and 4.61 ± 7.02 versus 3.44 ± 4.53 pmol/g, $p < 0.05$ for testosterone, respectively, were found in patients with prostate cancer than in BPH. Higher levels in cancer tissue were found also for epitestosterone. However, no differences were found in serum levels. Highly significant correlations occurred between all pairs of intraprostatic androgens and also epitestosterone as well as between serum testosterone and dihydrotestosterone ($p < 0.001$) in both BPH and cancer groups. Correlation was not found between corresponding tissue and serum testosterone and dihydrotestosterone, either in benign or cancer samples. The results point to importance of intraprostatic hormone levels for evaluation of androgen status of patients, contrasting to a low value of serum hormone measurement.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer is the second most common cause of cancer death among men in industrialized countries. Androgens are considered to play a substantial role in pathogenesis of both benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer. However, the importance of determination of androgen levels in

tissue and serum for cancer progression and prognosis has been poorly understood.

The first data on androgen contents in sera and prostate tissue from patients with BPH [1–3] and prostate cancer [4–7] appeared since early seventies. In contrast to plasma levels the most abundant tissue androgen was dihydrotestosterone, the concentration of which exceeded that of testosterone

* Corresponding author.

E-mail address: heracekj@seznam.cz (J. Heracek).

0039-128X/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.steroids.2007.01.004

several times. No correlation was found between plasma and tissue androgens [2] but the number of subjects was low for serious statistical evaluation. From the same reasons, often inconsistent results were obtained as concerns the differences between BPH and cancer.

The literature concerning this issue until 1993 has been reviewed in 1994 [8]. Since that time several papers appeared including those from our group on androgen and other steroid levels in normal, hyperplastic as well as cancer prostatic tissues, obtained by surgery or by transrectal biopsy [9-16]. The effect of various treatment approaches including chemical or surgical castration [11] and pre-treatment with finasteride were studied [16]. Mostly the number of analyzed samples did not exceed 36 subjects. Two recent papers provided data from larger groups, both focusing on possible race differences among black and white populations [12,13]. Mohler et al. [12] measured testosterone, dihydrotestosterone, androstenedione, their precursors and sex hormone binding globulin (SHBG) in cancer tissue from 36 black and 59 white Americans. The only differences they found were higher androstenedione and SHBG in Afro-Americans. In a more recent study Marks et al. [13] measured testosterone and dihydrotestosterone in bioptic samples from normal prostatic tissue and in blood from 25 black and 36 white American males, without finding significant race differences.

In general, these previous reports demonstrated that intraprostatic androgens need not correlate with serum levels which, in addition, may differ considerably in response to treatment modalities.

Here we report concentrations of major androgens (and epitestosterone as potential antiandrogen) in tissue and serum samples from two large and statistically representative groups of patients who underwent surgery for BPH or prostate cancer. The aim of this study was to find out whether the above mentioned hormones differ significantly in both diseases, and if any correlation does exist between their intraprostatic and serum levels.

2. Experimental

2.1. Patients

The subjects were 178 patients with prostate cancer or benign prostatic hyperplasia who were treated at the Department of Urology of 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague in the period 2004-2006. Prostatic tissues were obtained from 57 patients aged 54-87 years who underwent simple suprapubic prostatectomy for BPH and from 121 patients aged 50-79 years with retropubic radical prostatectomy for carcinoma. The diagnosis was in both groups confirmed histologically. The samples of venous blood were obtained simultaneously. Patients who received neoadjuvant treatment for prostate cancer before surgery and with cancer positive prostate margins from radical prostatectomy were excluded from the study. Table 1 shows patients baseline characteristics. Tumor grade and progression in patients with prostate cancer are summarized in Table 2.

Written informed consent was obtained from all participants and was approved by the Ethical Committee of the 3rd

Table 1 – Overall pretreatment characteristics of patients

Variable	Patient group	
	BPH	PC
BMI (kg/m ²)	27.65 ± 2.25	28.14 ± 2.18
Age (years)		
<60	6 (10.5)	34 (28.1)
60-64	10 (17.6)	44 (36.4)
65-69	7 (12.3)	28 (23.1)
70-74	12 (21.1)	14 (11.6)
>74	22 (38.5)	1 (0.8)
Mean/median	70.5/71.0	62.9/62.0
PSA (ng/ml)		
0-4	23 (40.4)	15 (12.4)
4.1-10	21 (36.8)	76 (62.9)
10.1-20	9 (15.8)	28 (23.1)
>20	4 (7.0)	2 (1.6)
Mean/median	6.1/4.2	7.9/6.7

BPH = benign prostatic hyperplasia, PC = prostate cancer, PSA = prostatic specific antigen, Percentage in each age group is in parentheses.

Medical Faculty of Charles University and the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health.

2.2. Tissue samples

The prostates were delivered immediately after surgery to the Department of Pathology to further processing. The representative native tissue samples from both lobes of prostate were cut in cases of BPH. Extensive prostatic sampling of the whole prostate in accordance with scheme published by True in 1994 [17] was performed in the case of prostatic carcinoma. Simultaneously, approximately 150-200 mg of the fresh

Table 2 – Tumor grade and progression in 121 patients with prostate cancer

Variable	n
Pathological Gleason score	
≤4	20 (16.5)
5-6	76 (62.8)
≥7	25 (20.7)
Pathological stage	
pT2a	12 (9.9)
pT2b	50 (41.3)
pT2c	28 (23.1)
pT3a	14 (11.6)
pT3b	17 (14.1)
Seminal vesicle status	
Positive	17 (14.1)
Negative	104 (85.9)
Lymph node status	
Positive	2 (1.7)
Negative	119 (98.3)

Gleason score is grading of cancer. Pathological stage, seminal vesicle and lymph node status are extension assessments of prostate cancer. Percentage in each group is in parentheses.

tissue from each prostate were immediately snap frozen in liquid nitrogen and later transferred to a -80°C freezer. Tissue specimens were fixed with formalin, embedded in paraffin and processed by routine histological technique. Microscopic slides were stained with hematoxylin and eosin and evaluated under an optical microscope.

2.3. Morphological evaluation

Two pathologists experienced in urogenital pathology performed independently microscopic evaluation of microscopic slides. Morphological parameters were recorded as follows: histological type of cancer (based on WHO classification [18]), Gleason score with primary, secondary and tertiary, if appropriate, grades (finally revisited according to 2005 ISUP Consensus Conference [19]), pathological stage (according to TNM Classification of Malignant Tumours, 6th Edition, 2002 [20]), evaluation of tumor extension, local invasion into periprostatic tissue or seminal vesicle, perineural spread, venous/lymphatic vessel invasion and surgical margin status [21,22].

2.4. Steroid determination

Peripheral venous blood was obtained after an overnight fasting between 7 and 8 a.m. the day of surgery and sera were stored at -80°C until analyzed. Testosterone, dihydrotestosterone, androstenedione and epitestosterone concentrations in prostatic tissue were determined as described previously [9]. In brief, tissues were homogenized in saline, extracted with diethyl ether, and following evaporation partitioned between *n*-hexane-methanol-water to remove the excessive fat. Steroids in methanolic-aqueous phase were then separated by reverse-phase high performance liquid chromatography and in the respective fractions they were determined by specific radioimmunoassays. Serum testosterone and DHT were determined by radioimmunoassays using in the laboratory developed methods [23,24]. SHBG was measured by immunoradiometric kit from Immunotech (Marseille, France). Assay validation criteria were determined as follows: intra- and interassay coefficients of variation for end-point immunoassays (in percents) were 8.2 and 10.7 (testosterone), 8.7 and 12.1 (dihydrotestosterone), 7.7 and 10.9 (epitestosterone), 5.8 and 11.6 (androstenedione), and 6.1 and 7.4 for SHBG, respectively. Sensitivity, as an amount of steroid distinguishable with 95% probability from steroid free serum, or, in the case of tissue, blank samples (homogenization buffer processed as sample, i.e. after extraction, solvent partition and HPLC, followed by RIA in the respective fraction) were 0.012, 0.018, 0.020 and 0.015 pmol/sample for testosterone, dihydrotestosterone, epitestosterone and androstenedione, respectively. Free testosterone content was calculated from total testosterone and SHBG concentrations according to Vermeulen and Kaufman [25].

2.5. Statistical analysis

Mann–Whitney test was used for statistical evaluation of differences between BPH and prostate cancer samples. Sperman

Table 3 – Survey of hormone concentrations in tissue and serum from patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

	Tissue (pmol/g)		Serum (nmol/l)	
	BPH	PC	BPH	PC
Testosterone				
Mean	3.44	4.61*	15.83	14.75
S.E.M.	4.53	7.02	7.59	6.87
Median	1.74	2.80	14.40	13.59
n	57	121	52	105
DHT				
Mean	6.44	8.85**	2.12	2.03
S.E.M.	6.43	6.77	0.70	0.74
Median	4.50	6.98	2.04	1.98
n	57	121	51	75
Androstenedione				
Mean	4.01	4.97**		
S.E.M.	5.35	4.46		
Median	1.79	3.73		
n	57	121		
Epitestosterone				
Mean	2.39	2.96*		
S.E.M.	3.04	2.92		
Median	1.42	2.14		
n	57	120		
SHBG				
Mean			70.2	57.4
S.E.M.			37.8	31.9
Median			62.7	52.7
n			51	75
Free testosterone (pmol/l)				
Mean			256	220
S.E.M.			118	94
Median			236	209
n			51	75

BPH = benign prostatic hyperplasia, PC = prostate cancer, S.E.M. = standard error of the mean.
 * Significant at 95% level.
 ** Significant at 99% level.

correlation analysis was applied for evaluation of mutual relationship between laboratory data. A *p* value <0.05 was considered to indicate significance.

3. Results

The survey of hormone concentrations in prostatic tissue and in serum is shown in Table 3. Significantly higher intraprostatic androgen concentrations were found in samples from patients with prostate cancer than in BPH. Higher content in cancer tissue was found also for epitestosterone. On the other hand, no differences were observed in serum levels.

Correlation matrices showing relations among investigated parameters in benign hyperplastic and cancer samples are shown in Table 4. As expected, significant correlations occurred between all pairs of intraprostatic

Table 4 – Spearman's correlations between tissue and serum data in the BPH and PC groups

		BPH						
PC	Tissue testosterone	0.460	0.695	0.548	0.235	-0.333	-0.188	0.440
		0.000	0.000	0.000	0.093	0.017	0.187	0.001
		57	57	57	52	51	51	51
	0.689	Tissue DHT	0.633	0.557	0.133	-0.158	-0.250	0.350
	0.000		0.000	0.000	0.346	0.267	0.077	0.012
	121		57	57	52	51	51	51
	0.838	0.688	Tissue androstenedione	0.621	0.126	-0.356	-0.146	0.239
	0.000	0.000		0.000	0.372	0.010	0.308	0.092
	121	121		57	52	51	51	51
	0.432	0.637	0.542	Tissue epitestosterone	0.115	-0.346	-0.024	0.150
0.000	0.000	0.000		0.416	0.013	0.865	0.292	
120	120	120		52	51	51	51	
-0.183	-0.169	-0.080	-0.151	Serum testosterone	0.483	0.446	0.753	
0.062	0.085	0.418	0.126		0.000	0.001	0.000	
105	105	105	104		51	51	51	
-0.282	-0.117	-0.079	0.000	0.734	Serum DHT	0.476	0.167	
0.014	0.316	0.500	0.997	0.000		0.000	0.242	
75	75	75	75	75		51	51	
-0.405	-0.366	-0.294	-0.138	0.719	0.662	Serum SHBG	-0.162	
0.000	0.001	0.010	0.238	0.000	0.000		0.256	
75	75	75	75	75	75		51	
0.093	0.062	0.123	0.064	0.628	0.309	-0.026	Serum free testosterone	
0.429	0.600	0.292	0.588	0.000	0.007	0.825		
75	75	75	75	75	75	75		

The data in the upper right part from the diagonal show correlations in samples from patients with benign prostate hyperplasia (BPH), the data in the lower left part from the diagonale those from patients with prostate cancer (PC). The values in each cell from above represent correlation coefficient (r), its significance (p values) and number of correlated pairs (n). Significant correlations are in bold letters.

androgens and epitestosterone. Similarly, close correlation was found between serum testosterone and its metabolite dihydrotestosterone in both benign and cancer samples. No correlation, however, was found between corresponding tissue and serum androgens—testosterone and dihydrotestosterone, either in benign or cancer samples. The only exception was a significant correlation between tissue testosterone and its free form in serum in BPH subgroup. On the other hand, in BPH tissue testosterone as well as its precursor androstenedione and even epitestosterone negatively correlated with serum dihydrotestosterone. Tissue testosterone negatively correlated with serum dihydrotestosterone also in the cancer group. In contrast to BPH, in cancer samples a strong negative correlation was found between all three tissue androgens and serum SHBG. No correlation with age was found for any of the

investigated parameter in both BPH as well as cancer group.

4. Discussion

There is a general consensus that androgens play an important role in development of prostate diseases. Ricke et al. [26] showed in sophisticated animal model based on tissue recombinants from human prostate epithelial cell line and mouse urogenital mesenchyme grown in athymic mice that androgens and also estrogens can mediate interactions between stromal and epithelial prostate cells resulting in tumorigenesis. However, there is a lack of convincing information on possible significance of determination of serum and/or tissue androgens in prostate carcinogenesis.

Prostate specific antigen (PSA) remains the most valuable marker for an early clinical diagnosis and consequent monitoring of prostate cancer [27]. Since introduction of PSA monitoring, both incidence of prostate cancer and radical prostatectomy increased dramatically. Clearly combining PSA, clinical stage, and tumor grade evaluated by biopsy increases the preoperative ability to predict cancer stage. However, urologists are still limited in their preoperative ability to estimate stage of the disease in a reliable manner. Yet it has been documented that 30–40% of men who undergo radical prostatectomy for clinically organ-confined localized prostate cancer will have extraprostatic disease or experience disease recurrence [28]. Thus, the need for additional prognostic markers for patients with clinically localized disease is evident.

Intraprostatic androgen levels might be used in the future assessment and management of prostate cancer. Since the data on the significance of intraprostatic and serum androgen determination in subjects with and without prostate cancer are still insufficient and often controversial, we measured major serum and tissue androgens in specimens from a large group of patients who underwent surgery for both BPH and prostate cancer. Analysis of our data discovered significant differences in intraprostatic androgens and surprisingly, also epitestosterone, believed to act as an endogenous antiandrogen [29], between BPH and prostate cancer. The most remarkable finding were higher levels of DHT in cancer prostatic tissues. Of interest may be a negative correlation of tissue testosterone and also tissue androstenedione with serum DHT in BPH group. Tissue testosterone negatively correlated with its 5 α -reduced metabolite in serum also in the cancer group. Even though tissue samples may be contaminated with blood, their DHT concentrations were about four times higher than in serum, in accordance with previous findings [9–16]. It indicates accumulation of testosterone and its precursor in prostatic tissue, followed by its metabolism to 5 α -saturated metabolites. A negative correlation between tissue testosterone and androstenedione with serum DHT may thus reflect the uptake and metabolism of DHT in the prostatic tissue.

Our data on intraprostatic androgen concentrations are generally consistent with early reports from seventies and eighties [1–7] but it should be taken in account that surgery techniques differed considerably from those used nowadays. The more recent studies [10,11,13,15,16] on androgen analysis in patients with BPH or prostate cancer were performed on tissue samples obtained by transrectal ultrasound-guided biopsy or transurethral resection of prostate. This approach could be less precise in terms of histopathological determination of tumor stage and grade as well as of steroid analysis than examination of samples obtained by simple or radical prostatectomy used in our study.

The results point out significance of determination of intraprostatic hormonal levels for evaluation of androgen status of patients, in contrast to lower significance of serum hormone measurement. Determination of intraprostatic androgens may thus be helpful as additional prognostic markers for assessment of further biological behaviour of prostate cancer. More sensitive HPLC equipment should enable us to work up less amount of prostatic tissue and thus reduce the bias of the matrix in assay.

Acknowledgment

This work was supported by Grant number NR 8096-3 from the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health.

REFERENCES

- [1] Siiteri PK, Wilson JD. Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J Clin Invest* 1970;49:1737–45.
- [2] Krieg M, Bartsch W, Herzer S, Becker H, Voigt KD. Quantification of androgen binding, androgen tissue levels, and sex hormone-binding globulin in prostate, muscle and plasma of patients with benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1977;86:200–15.
- [3] Bartsch W, Krieg M, Becker H, Mohrmann J, Voigt KD. Endogenous androgen levels in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia and normal prostate. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982;100:634–40.
- [4] Farnsworth WE, Brown JR. Androgen of the human prostate. *Endocr Res Commun* 1976;3:105–17.
- [5] Habib FK, Lee IR, Stich SR, Smith PH. Androgen levels in the plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate. *J Endocrinol* 1976;71:99–107.
- [6] Hammond GL. Endogenous steroid levels in the human prostate from birth to old age: a comparison of normal and diseased tissues. *J Endocrinol* 1978;78:7–19.
- [7] Geller J, Albert JD. DHT in prostate cancer tissue—a guide to management and therapy. *Prostate* 1985;6:19–25.
- [8] Montie JE, Pienta KJ. Review on the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology* 1994;43:892–9.
- [9] Hill M, Hampl R, Petrik R, Starka L. Concentration of the endogenous antiandrogen epitestosterone and androgenic C19-steroids in hyperplastic prostatic tissue. *Prostate* 1996;28:347–51.
- [10] Titus MA, Schell MJ, Lih FB, Tomer KB, Mohler JL. Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4653–7.
- [11] Page ST, Lin DW, Mostaghel EA, Hess DL, True LD, Amory JK, Nelson PS, Matsumoto AM, Bremner WJ. Persistent intraprostatic androgen concentrations after medical castration in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3850–6.
- [12] Mohler JL, Gaston KE, Moore DT, Schell MJ, Cohen BL, Weaver C, Petrusz P. Racial differences in prostate androgen levels in men with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2004;171:2277–80.
- [13] Marks LS, Hess DL, Dorey FJ, Macairan ML. Prostatic tissue testosterone and dihydrotestosterone in African-American and white men. *Urology* 2006;68:337–41.
- [14] Hill M, Petrik R, Hampl R, Starka L. The concentrations of the endogenous C19-steroids in hyperplastic prostatic tissue and the effect of finasteride treatment. *Horm Metab Res* 1996;28:562–4.
- [15] Starka L, Hampl R, Hill M, Lapcik O, Bilek R, Petrik R. Epitestosterone in human blood and prostatic tissue. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:469–73.
- [16] Habib FK, Ross M, Tate R, Chisholm GD. Differential effect of finasteride on the tissue androgen concentrations in benign prostatic hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:137–44.
- [17] True LD. Surgical pathology examination of the prostate gland. Practice survey by American society of clinical pathologists. *Am J Clin Pathol* 1994;102(5):572–9.

- [18] Eble JN, Kauter G, Epstein JI, Sesterhenn I. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. IARC/World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2003.
- [19] Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL. ISUP Grading Committee, The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29(9):1228-42.
- [20] Sobin LH, Wittekind CH. TNM classification of malignant tumours. 6th ed. Wiley; 2002.
- [21] van der Kwast TH, Collette L, Van Poppel H, Van Cangh P, Vekemans K, DaPozzo L, Bosset JF, Kurth KH, Schröder FH, Bolla M. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy and Genito-Urinary Cancer Groups. Impact of pathology review of stage and margin status of radical prostatectomy specimens (EORTC trial 22911). *Virchows Arch* 2006;449:428-34.
- [22] Srigley JR, Amin MB, Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond EH. Updated protocol for the examination of specimen from patients with carcinomas of the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):1034-9.
- [23] Hampl R. Comparison of three immunoassays for testosterone determination. In Görög S, editor. *Advances in steroid analysis '93*. Budapest: Akadémiai Kiadó; 1994. p. 163-9.
- [24] Hampl R, Putz Z, Starka L. Radioimmunological determination of dihydrotestosterone and its importance for laboratory diagnostics (in Czech). *Biochem Clin Bohemoslov* 1990;19:157-63.
- [25] Vermeulen A, Kaufman JM. Diagnosis of hypogonadism in the aging male. *Aging Male* 2002;5:170-6.
- [26] Ricke WA, Ishii K, Ricke A, Simko J, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR. Steroid hormones stimulate human prostate cancer progression and metastasis. *Int J Cancer* 2006;118:2123-31.
- [27] Stenman UH, Abrahamsson PA, Aus G, Lilja H, Bangma C, Hamdy FC, Boccon-Gibod L, Ekman P. Prognostic value of serum markers for prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2005;216:64-81.
- [28] Lu-Yao GL, Potosky AL, Albertsen PC, Wasson JH, Barry MJ, Wennberg JE. Follow-up prostate cancer treatments after radical prostatectomy: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:166.
- [29] Starka L, Bickova M, Hampl R. Epitestosterone. an endogenous antiandrogen? *J Steroid Biochem* 1989;33:1019-21.

The endocrine profiles in men with localized and locally advanced prostate cancer treated with radical prostatectomy

Jiri HERACEK¹, Michael URBAN¹, Jana SACHOVA¹, Jitka KUNCOVA², Vaclav EIS³, Vaclav MANDYS³, Richard HAMPL⁴ & Luboslav STARKA⁴

1. Department of Urology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic
2. Department of Surgery, Division of Urology, St. Chiara Hospital, University of Pisa, Italy
3. Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic
4. Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Correspondence to: Heracek Jiri, MD.
Department of Urology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague
Ruska 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic
EMAIL: heracekj@seznam.cz

Submitted: December 24, 2006

Accepted: January 15, 2007

Key words: prostate cancer; radical prostatectomy; androgens; estrogens; follicle stimulating hormone; luteinizing hormone; prolactin; testosterone; prostate-specific antigen; Gleason score

Neuroendocrinol Lett 2007; 28(1):45–51 PMID: 17277727 NEL280107A08 ©2007 Neuroendocrinology Letters www.nel.edu

Abstract

OBJECTIVE: Prostate cancer is now recognized as one of the principal medical problems facing male population and the commonest cancer in males in developed countries. The aim of this study was to find out whether serum hormone levels differ significantly in localized (pT2) and locally advanced (pT3-pT4 or N1) prostate cancer.

METHODS: In 250 men (mean age±SEM: 63.8±0.4) who underwent radical retropubic prostatectomy for histologically confirmed prostate cancer were analyzed serum samples for total testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, estradiol, progesterone, prolactin, cortisol, sex hormone-binding globulin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. Free testosterone content was calculated from total testosterone and SHBG concentrations.

RESULTS: Significantly lower serum level of FSH, i.e. 5.63±0.31 vs. 7.07±0.65 U/L was found in patients with localized prostate cancer than in locally advanced (p<0.05). Significant correlation was found between serum levels of DHEAS and cortisol in both groups (p<0.02), estradiol and prolactin in patients with locally advanced prostate cancer, as well between LH and prolactin (p<0.05). No differences were found in other observed hormones.

CONCLUSION: The results point to importance of hormone status as possible additional prognostic marker for patients with prostate cancer. Considerable research is needed to further understand influence of hormones on prostate cancer.

Introduction

Cancer of the prostate (CaP) is now recognized as one of the principal medical problems facing male population. The incidence of CaP has increased dramatically during the last 10–15 years and it is now the commonest cancer in males in developed countries. In Europe, an estimated 2.6 million new cases of cancer are diagnosed each year. CaP constitutes about 11% of all male cancers in Europe and accounts for 9% of all cancer deaths among men within the European Union [3,2]. Patients with organ-confined CaP can be effectively treated through radical retropubic prostatectomy (RRP) or radical radiotherapy. A number of clinical, endocrinological and pathological prognostic factors for CaP have been reported. However, urologists are still limited in their preoperative ability to estimate stage of the disease in a reliable manner. Yet it has been documented that 30–45% of men who undergo radical prostatectomy for clinically organ-confined CaP will have extraprostatic disease or experience disease recurrence [27].

The prostate has also some endocrine functions, and CaP is considered as a multihormonal disease. It has been discovered that prostate is the target for various hypothalamic-pituitary and adrenal hormones. Among them, androgens are considered to play a substantial role in growth, maintenance and secretory function of the prostate. The prostate itself synthesizes numerous peptide hormones [9,42], growth factors [4,14] and neuropeptides [5,41] that influence its function through autocrine and paracrine control mechanisms.

In our study we report hormonal profiles in serum samples from two large and statistically representative groups of patients who underwent radical prostatectomy for prostate cancer. The aim of this study was to find out whether hormone levels differ significantly in localized and locally advanced prostate cancer.

Material and methods

Patients

The subjects were 250 men with histologically confirmed CaP treated with RRP at the Department of Urology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague in the period 2003–2006. Patients who received neo-adjuvant treatment before surgery, men with histologically positive prostate margins from surgery or men suffering endocrine disorders, chronic alcoholism, renal or hepatic dysfunctions were excluded from the study. Intake of any medication known to effect concentrations of examined serum hormone was also a criterion for exclusion. Written informed consent was obtained from all participants.

Tissue processing

The prostates were delivered immediately after surgery to the Department of Pathology for further processing. Unfixed prostates obtained by RRP were dissected in ac-

cordance with previously described protocols [12,30,48]. Briefly, we painted entire external surface of the prostate with an ink to sign surgical margins. Seminal vesicles were cut off and dissected separately. Thereafter, apical and bladder neck margins were cut off, sectioned parallel to the urethra and submitted to examine margins. The remaining prostate tissue was thinly sliced (3–4 mm) perpendicularly to the urethra and submitted. The tissue from pelvic lymph node dissection was totally embedded, if delivered. Tissue specimens were fixed with formalin, embedded in paraffin and processed by routine histological technique. Microscopic slides were stained with hematoxylin and eosin and evaluated under an optical microscope Nikon Eclipse E400.

Morphological evaluation

Two pathologists experienced in urogenital pathology performed independently microscopic evaluation of microscopic slides. Morphological parameters were recorded as follows: histological type of cancer based on WHO classification [7], Gleason score with primary, secondary and tertiary, if appropriate, grades (finally revised according to 2005 ISUP Consensus Conference [8]), pathological stage according to TNM Classification of Malignant Tumours, 6th Edition, 2002 [43], quantity of tumor, local invasion into periprostatic tissue or seminal vesicle(s), perineural invasion and venous/lymphatic vessel invasion and surgical margin status. Organ-confined prostate cancer (pT2) was defined as a cancer showing neither extraprostatic extension nor pelvic lymph node involvement. Extraprostatic extension was defined by either infiltration of cancer into the direct vicinity or beyond adipose tissue or within neurovascular bundle beyond the outer contour of adjacent capsule. In absence of periprostatic adipose tissue, the extraprostatic extension was determined when tumour extended beyond normal glandular contour assessed on scanning magnification [30,44]. Positive margin status was recorded in case of the presence of tumour cells within the inked margin. Non-organ confined cancer (pT3–T4, N1; extraprostatic disease) was defined as cancer with capsular penetration or involvement of seminal vesicles, massive bladder neck invasion or with pelvic lymph node metastases.

Hormonal analysis

Peripheral venous blood was obtained after an overnight fasting between 7–8 a.m. at the day of surgery and sera were stored at –80°C until analyzed. Serum total testosterone (T) was determined by radioimmunoassay using in the laboratory developed methods [13], dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), estradiol, progesterone, cortisol and prolactin were determined by RIA kits (Immunotech, Marseille, France). Sex hormone-binding globulin (SHBG), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were measured by IRMA kits (Immunotech, Marseille, France). Free testosterone content was calculated from total testosterone and SHBG concentrations according to Vermeulen and Kaufman [52].

Serum total prostate specific antigen (PSA) and free PSA levels were measured with the use of the PSA kit (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). F/t PSA was calculated from the ratio of free/total PSA.

Statistics

The mean values of the various parameters studied were calculated and compared between groups using a two-tailed independent sample *t*-test. The correlations among variables were analysed using Spearman's correlation coefficients (*r*). Statistical analyses were carried out using Medcalc[®], release 9.0.1.0 (Medcalc Software, Belgium) under the Microsoft[®] Windows[™] XP operating system. Statistical significance was defined as a two-sided *p*<0.05 and data were reported as mean ± SEM.

Results

Table 1 shows patients baseline characteristics. The study was performed on 250 men aged 46–79 years (mean±SEM: 63.8±0.4). Men with localized and locally advanced CaP were aged 46–79 (mean±SEM: 62.6±0.6) and 51–76 (mean±SEM: 65.0±0.5) years, respectively. There was no significant difference between mean age of both groups (*p*=0.100). Preoperative total PSA up to 10 ng/mL was in 158 (63.2%) patients. The mean

pretreatment PSA level was significantly lower in patients with organ-confined disease than in patients with non-organ-confined CaP (mean±SEM: 7.9±0.4 vs. 11.0±0.8; *p*=0.002).

Tumor grade and progression are summarized in Table 2. Gleason score was significantly lower in patients with localized CaP than in patients with locally advanced disease (*p*=0.049). Organ-confined disease was in 128 men (51.2%). Locally advanced CaP was in 122 patients (49.8%), out of these patients 69 men (56.6%) displayed extracapsular extension, 53 (43.4%) showed extraprostatic extension with seminal vesicle or other structures involvement and 5 (2.0%) pelvic node involvement.

The survey of hormones levels is shown in Table 3. Significantly lower serum level of FSH was found in patients with localized than in locally advanced CaP (mean±SEM: 5.63±0.31 vs. 7.07±0.65; *p*=0.045), differences are at the edge of significance. No differences were found in other observed hormones.

Correlation matrices showing relations among investigated parameters in localized and locally advanced CaP samples are shown in Table 4. As expected, significant correlations occurred between precursors and products of androgens, estrogens and products of hypothalamic-

Table 1. Overall pretreatment characteristics of 250 patients.

Variable	Patient group	
	pT2 (n=128)	pT3-pT4 or N1 (n=122)
BMI (kg/m²)	27.5±3.4	28.1±3.2
Age (years)		
<54	11 (8.6)	5 (4.1)
55–59	30 (23.4)	14 (11.5)
60–64	40 (31.3)	41 (33.6)
65–69	33 (25.8)	35 (28.7)
70–74	10 (7.8)	24 (19.6)
>74	4 (3.1)	3 (2.5)
Mean/Median	62.6/62.0	65.0/65.0
PSA (ng/mL)		
0–4	18 (14.1)	11 (9.0)
4.1–10	76 (59.4)	53 (43.4)
10.1–20	32 (25.0)	45 (36.9)
>20	2 (1.5)	13 (10.7)
Mean/Median	7.9/7.0*	11.0/9.6

BMI presented as mean ± SD

Percentage in each group is in parentheses

*Between group differences significant at 99% level

Table 2. Tumor grade and progression in 250 patients.

Variable	Patient group	
	pT2 (n=128)	pT3-T4 or N1 (n=122)
Pathological Gleason score		
≤4	41 (32.0)	2 (1.6)
5–6	76 (59.4)	64 (52.5)
≥7	11 (8.6)	56 (45.9)
Mean/Median	4.9 / 5.0*	6.3 / 6.0
Pathological stage		
pT2a	19 (14.9)	
pT2b	3 (2.3)	
pT2c	106 (82.8)	
pT3a		69 (56.6)
pT3b		48 (39.3)
pT4		5 (4.1)
Seminal vesicle status		
Positive		53 (21.2)
Negative	197 (78.8)	
Lymph node status		
Positive		5 (2.0)
Negative	245 (98.0)	

Percentage in each group is in parentheses

*Between group differences significant at 95% level

Table 3. Survey of serum hormone levels.

Variable		Patient group	
		pT2 (n=128)	pT3-T4 or N1 (n=122)
Total Testosterone nmol/L	Mean	16.00	15.68
	SEM	0.69	0.69
	Median	14.15	14.00
DHEAS µmol/L	Mean	55.76	46.08
	SEM	7.33	7.82
	Median	6.82	4.64
SHBG nmol/L	Mean	34.72	35.45
	SEM	1.52	1.42
	Median	32.30	33.35
Free Testosterone pmol/L	Mean	1127	1167
	SEM	47.66	48.70
	Median	1068	1052
FSH U/L	Mean	5.63*	7.07
	SEM	0.31	0.65
	Median	5.00	5.60
LH U/L	Mean	3.66	4.12
	SEM	0.17	0.33
	Median	3.38	3.40
Prolactin µg/L	Mean	13.53	14.90
	SEM	0.91	1.36
	Median	10.65	10.75
Estradiol pmol/L	Mean	90.49	90.91
	SEM	3.71	4.21
	Median	83.20	81.79
Progesterone nmol/L	Mean	4.67	4.10
	SEM	0.66	0.26
	Median	3.35	3.70
Cortisol nmol/L	Mean	536.53	509.65
	SEM	19.28	15.07
	Median	527.00	499.00

*Between group differences significant at 95% level
SEM = standard error of the mean

pituitary axis. Significant correlation was found between serum levels of DHEAS and cortisol in both groups ($p < 0.02$), estradiol and prolactin in patients with locally advanced CaP ($p = 0.041$), as well between LH and prolactin ($p = 0.039$).

Discussion

Generally, the majority of studies focusing on hormonal profiles compare patients with CaP and benign prostatic hyperplasia (BPH). Studies comparing patients with various CaP stages from RRP are sporadic and confine mainly to testosterone [16,18,22,23,29,47].

In our study we found positive correlation of FSH serum levels between organ-confined and non-confined disease. Garde and colleagues compared localization, biosynthesis, and hormonal modulation of FSH in BPH

and CaP [11]. In human prostatic tissue (normal, malignant, and BPH), as well as in metastatic lymph nodes from patients with CaP, they observed presence of FSH in cytoplasm of epithelial cells, stromal cells, and secretory material from the lumen of all tissue specimens. Furthermore, immunoreactive staining revealed FSH in prostatic epithelium of castrated men, suggesting that FSH synthesis occurs even in absence of androgens. Ben-Josef and colleagues described presence of FSH receptors in prostate gland [1]. The presence of FSH and its receptors in CaP cells and ability of FSH to stimulate proliferation of CaP cells in vitro suggest an autocrine/paracrine regulatory mechanism for prostate tissue growth [36]. The marginal differences in FSH between localized and advanced CaP may be associated with widespread biological actions of inhibins and related peptides [6]. The finding of this additional influence on CaP growth directs us to consider CaP to be a multihormonally effected disease, in opposition to traditional androgen-specific focus that has dominated in the literature.

We observed no correlation between serum total testosterone levels with different CaP stages. The relationship of testosterone to subsequent CaP has been studied in many population-based longitudinal studies [19,21,34,35,45]. They have not shown a direct correlation between total testosterone levels and CaP, only the largest study of this type noted an increased CaP risk with low testosterone levels [45]. In patients undergoing RRP, low total and free testosterone levels were found to be predictive for pathological stage [22,23,29], positive surgical margins [47] and Gleason score, respectively [18].

PSA is the most widely used oncological biomarker in medicine today and the most valuable marker for an early clinical diagnosis and consequent monitoring of CaP [28]. Our study proved consensus that combination of PSA, clinical stage and tumor grade increases preoperative ability to predict cancer stage.

In patients with locally advanced cancer we noted positive correlations between prolactin and LH and estradiol, respectively. Prolactin receptors are present on membranes of prostatic epithelial cells, and their concentration is particularly high in pre-cancerous epithelial lesions [26]. Experimental studies have demonstrated that hyperprolactinaemia stimulates growth of normal mouse prostate [54] and prostate tumour implants [24]. Studies by several teams have shown that PRL is one of the non-steroidal factors involved both in prostate cell proliferation [33,49] and in development of BPH and CaP [50,51]. No association was found between prolactin and CaP risk [10,20,46]. The absence of an association between CaP risk and circulating prolactin does not entirely rule out possibility that prolactin may be involved in pathogenesis of CaP. The autocrine and paracrine effects of locally produced prolactin may be more important than the effects of circulating prolactin.

It is well-known that LH, by stimulating testicular steroidogenesis, plays a major role in prostate physiology.

Table 4. Spearman's correlations between serum data in both groups.

		pT2								
pT3-pT4 or N1	Total T	0.163	0.612	0.472	-0.02	0.182	-0.185	0.427	0.049	0.089
		0.098	0.000	0.000	0.870	0.055	0.053	0.000	0.783	0.351
		128	128	128	128	128	128	128	128	128
	0.125		-0.060	-0.100	-0.150	-0.091	-0.121	0.256	0.264	0.249
	0.246	DHEAS	0.519	0.322	0.129	0.363	0.226	0.009	0.141	0.013
	122		128	128	128	128	128	128	128	128
	0.579	0.053		0.979	-0.026	0.141	-0.059	0.220	-0.095	0.083
	0.000	0.625	SHBG	0.000	0.782	0.136	0.537	0.019	0.590	0.385
	122	122		128	128	128	128	128	128	128
	0.405	0.025	0.971		-0.014	0.116	-0.048	0.142	-0.134	0.071
	0.000	0.816	0.000	Free T	0.880	0.220	0.618	0.132	0.448	0.456
	122	122	122		128	128	128	128	128	128
	-0.036	0.048	-0.020	0.036		0.559	-0.025	-0.164	-0.299	-0.037
	0.720	0.658	0.847	0.723	FSH	0.000	0.789	0.082	0.086	0.694
	122	122	122	122		128	128	128	128	128
	0.209	-0.046	0.076	0.087	0.667		0.137	0.111	-0.206	-0.023
	0.042	0.676	0.463	0.402	0.000	LH	0.154	0.241	0.245	0.810
	122	122	122	122	122		128	128	128	128
	0.176	-0.009	0.090	0.059	0.127	0.215		0.049	0.326	-0.138
	0.086	0.931	0.387	0.568	0.217	0.039	Prolactin	0.608	0.061	0.151
122	122	122	122	122	122		128	128	128	
0.373	0.253	0.014	-0.070	-0.094	0.075	0.200		0.124	0.133	
0.000	0.019	0.888	0.471	0.356	0.465	0.041	Estradiol	0.477	0.160	
122	122	122	122	122	122	122		128	128	
0.020	0.574	-0.030	-0.014	0.211	0.064	-0.125	-0.011		0.308	
0.899	0.000	0.833	0.932	0.177	0.685	0.423	0.945	Progesterone	0.081	
122	122	122	122	122	122	122	122		128	
0.110	0.254	0.158	0.170	0.099	0.033	-0.010	0.011	0.484		
0.281	0.019	0.126	0.099	0.334	0.750	0.925	0.915	0.002	Cortisol	
122	122	122	122	122	122	122	122	122		

The data in the upper right part from the diagonale show correlations in samples from patients with localized prostate cancer (pT2), the data in the lower left part from the diagonale correlations from patients with locally advanced prostate cancer (pT3-pT4 or N1). The values in each cell from above represent correlation coefficient (r), its significance (p-values) and number of correlated pairs (n). Significant correlations are in bold letters.

Lower level of circulating LH was observed in patients after RRP with advanced CaP forms [16].

The timing and duration of estrogens exposure that lead to dysplasia or malignancy are controversial. Most studies report that the consequential effect of neonatal estrogen imprinting on prostate results in altered size of mature gland [32,38,53], altered response to androgens [32,39], and epithelial dysplasia with aging [40]. In adults, administration of elevated levels of estrogen with androgen induces aberrant growth and malignant lesions [17,25]. It is concluded that estrogens exert dual actions on the prostate gland, triggering aberrant growth and/or suppressing androgen-induced hyperplasia [31]. The timing and mechanism of estrogen action in triggering prostate malignancy need further investigation [37].

Similarly to our previous study [15] we examined samples obtained by RRP. This approach is precise in terms of histopathological determination of tumor stage

and grade. We revised all prostate specimens according to The 2002 TNM classification and updated pathological protocol from 2005 [43,8]. Thus, many previous pT2b stages were shifted to pT2c stages. Previous studies and their results are based on The 1997 TNM classification [15,16,18,22,23,27,29,47].

In spite of criticism of some authors concerning the value of serum hormone determination, our results bring new data on complex hormonal profiles in patients differing according to severity of malignant process. Nevertheless, considerable research is needed to further understand influence of hormones on prostate cancer.

Acknowledgment

This work was supported by Grant NR 8096-3 from the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health.

REFERENCES

- 1 Ben-Josef E, Yang SY, Ji TH, Bidart JM, Garde SV, Chopra DP, et al. Hormone-refractory prostate cancer cells express functional follicle-stimulating hormone receptor (FSHR). *J Urol.* 1999; **161**: 970–6.
- 2 Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer.* 1997; **33**: 1075–1107.
- 3 Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer.* 2002; **38**: 99–166.
- 4 Crabb JW, Armes LG, Carr SA, Johnson CM, Roberts GD, Bordoli RS, et al. Complete primary structure of prostatropin, a prostate epithelial cell growth factor. *Biochemistry.* 1986; **25**: 4988–93.
- 5 Di Saint Agnese PA, deMesej Jensen KL. Somatostatin and/or somatostatin like immunoreactive endocrine/paracrine cells in the human prostate gland. *Arch Pathol Lab Med.* 1984; **108**: 693–6.
- 6 Dowling CR, Risbridger GP. The role of inhibins and activins in prostate cancer pathogenesis. *Endocr Relat Cancer.* 2000; **7**: 243–56.
- 7 Eble JN, Kauter G, Epstein JI, Sesterhenn I. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs (IARC/World Health Organization Classification of Tumours). Lyon, France: IARC Press; 2003.
- 8 Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL. ISUP Grading Committee: The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2005; **29**: 1228–42.
- 9 Farnsworth WE. A proposed physiological role of prostaglandin F₂ alpha in prostatic function. *Prog Clin Biol Res.* 1981; **75A**: 225–30.
- 10 Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996; **88**: 1118–26.
- 11 Garde SV, Sheth AR, Shah MG, Kulkarni SA. Prostate – an extrapituitary source of follicle-stimulating hormone (FSH): occurrence, localization, and de novo biosynthesis and its hormonal modulation in primates and rodents. *Prostate.* 1991; **18**: 271–87.
- 12 Hall GS, Kramer CE, Epstein JI. Evaluation of radical prostatectomy specimens. A comparative analysis of sampling methods. *Am J Surg Pathol.* 1992; **16**: 315–24.
- 13 Hampl R. Comparison of three immunoassays for testosterone determination. In: Görög S, editor. *Advances in Steroid Analysis '93*. Budapest: Akadémiai Kiadó; 1994. 163–9.
- 14 Harper GP, Barde YA, Burnstock G, Carstairs JR, Dennison ME, Suda K, et al. Guinea pig prostate is a rich source of nerve growth factor. *Nature.* 1979; **279**: 160–2.
- 15 Heracek J, Lukes M, Grill R, Kuncova J, Zachoval R, Zalesky M, et al. Endokrinní profil muže s lokalizovaným karcinomem prostaty ve vztahu k pT a Gleason skóre. [(Endocrine profile in men with localized prostate cancer related to pT and Gleason score.) (In Czech)] *Czech Urol.* 2002; **6**: 68.
- 16 Hilz H, Graefen M, Noldus J, Hammerer P, Knabbe C, Huland E, et al. Advanced prostate cancer is associated with a decrease in serum luteinizing hormone. *Eur Urol.* 2000; **38**: 243–9.
- 17 Ho S, Leav I, Merk F, Yu M, Kwan P, Ziar J. Induction of atypical hyperplasia, apoptosis, and type II estrogen-binding sites in the ventral prostates of Noble rats treated with testosterone and pharmacologic doses of estradiol-17β. *Lab Invest.* 1995; **73**: 356–65.
- 18 Hoffman MA, DeWolf WC, Morgentaler A. Is low serum free testosterone a marker for high grade prostate cancer? *J Urol.* 2000; **163**: 824–7.
- 19 Hsing AW. Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev.* 2001; **23**: 42–58.
- 20 Hsing AW, Comstock GW. Serological precursors of cancer: serum hormones and risk of subsequent prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993; **2**: 27–32.
- 21 Chen C, Weiss NS, Stanczyk FZ, Lewis SK, DiTommaso D, Etzioni R, et al. Endogenous sex hormones and prostate cancer risk: a case-control study nested within the Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; **12**: 1410–6.
- 22 Imamoto T, Suzuki H, Fukasawa S, Shimbo M, Inahara M, Komiya A, et al. Pretreatment serum testosterone level as a predictive factor of pathological stage in localized prostate cancer patients treated with radical prostatectomy. *Eur Urol.* 2005; **47**: 308–12.
- 23 Isom-Batz G, Bianco FJ Jr, Kattan MW, Mulhall JP, Lilja H, Eastham JA. Testosterone as a predictor of pathological stage in clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 2005; **173**: 1935–7.
- 24 Johnson MP, Thompson SA, Lubaroff DM. Differential effects of prolactin on rat dorsolateral prostate and R3327 prostatic tumor sublines. *J Urol.* 1985; **133**: 1112–20.
- 25 Lau KM, Leav I, Ho SM. Rat estrogen receptor-α and -β, and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected normal and dysplastic epithelial tissues of the Noble rats. *Endocrinology.* 1998; **139**: 424–7.
- 26 Leav I, Merk FB, Lee KF, Loda M, Mandoki M, McNeal JE, et al. Prolactin receptor expression in the developing human prostate and in hyperplastic, dysplastic, and neoplastic lesions. *Am J Pathol.* 1999; **154**: 863–70.
- 27 Lu-Yao GL, Potosky AL, Albertsen PC, Wasson JH, Barry MJ, Wennberg JE. Follow-up prostate cancer treatments after radical prostatectomy: a population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 1996; **88**: 166.
- 28 Lukes M, Urban M, Zalesky M, Zachoval R, Heracek J, Zdarsky E. Prostate-Specific Antigen: Current Status. *Folia Biol (Praha).* 2001; **45**: 41–9.
- 29 Massengill JC, Sun L, Moul JW, Wu H, McLeod DG, Amling CH, et al. Pretreatment total testosterone level predicts pathological stage in patients with localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol.* 2003; **169**: 1670–5.
- 30 Montironi R, van der Kwast T, Boccon-Gibod L, Bono AV, Boccon-Gibod L. Handling and pathology reporting of radical prostatectomy specimens. *Eur Urol.* 2003; **44**: 626–36.
- 31 McPherson SJ, Wang H, Jones ME, Pedersen J, Ilismaa PT, Wreford N, et al. Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology.* 2001; **142**: 2458–67.
- 32 Naslund MJ, Coffey DS. The differential effects of neonatal androgen, estrogen and progesterone on adult rat prostate growth. *J Urol.* 1986; **136**: 1136–40.
- 33 Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest.* 1997; **99**: 618–27.
- 34 Parsons JK, Carter HB, Platz EA, Wright EJ, Landis P, Metter EJ. Serum testosterone and the risk of prostate cancer: potential implications for testosterone therapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; **14**: 2257–60.
- 35 Platz EA, Leitzmann MF, Rifai N, Kantoff PW, Chen YC, Stampfer MJ, et al. Sex steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; **14**: 1262–9.
- 36 Porter AT, Ben-Josef E. Humoral mechanism in prostate cancer: A role for FSH. *Urol Oncol.* 2001; **6**: 131–8.
- 37 Precioso D, Denis JL, Klocker H, Sciarra A, Reis M, Naber K, et al. Estrogens and aspects of prostate disease. *Int J Urol.* 2007; **14**: 1–16.
- 38 Prins GS. Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. *Endocrinology.* 1992; **130**: 2401–12.
- 39 Prins GS, Birch L. The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology.* 1995; **136**: 1303–14.
- 40 Pylkkanen L, Makela S, Valve E, Harkonen P, Toikkanen S, Santti R. Prostatic dysplasia associated with increased expression of c-myc in neonatally estrogenized mice. *J Urol.* 1993; **149**: 1593–1601.
- 41 Sastry BVR, Janson VE, Owens LK, Tayeb OS. Enkephalin – and substance P-like immunoreactives of mammalian sperm and accessory sex glands. *Biochem Pharmacol.* 1982; **31**: 3519–22.
- 42 Sibley PE, Harper ME, Peeling WB, Griffiths K. Growth hormone and prostatic tumours: localization using a monoclonal human growth hormone antibody. *J Endocrinol.* 1984; **103**: 311–5.
- 43 Sobin LH, Wittekind CH. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th Edition. Wiley; 2002.
- 44 Strigley JR, Amin MB, Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond EH. Updated protocol for the examination of specimen from patients with carcinomas of the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; **124**: 1034–9.

- 45 Stattin P, Lumme S, Tenkanen L, Alfthan H, Jellum E, Hallmans G, et al. High levels of circulating testosterone are not associated with increased prostate cancer risk: a pooled prospective study. *Int J Cancer*. 2004; **108**: 418–24.
- 46 Stattin P, Rinaldi S, Stenman U, Riboli E, Hallmans G, Bergh A, et al. Plasma prolactin and prostate cancer risk: A prospective study. *Int J Cancer*. 2001; **92**: 463–5.
- 47 Teloken C, Da Ros CT, Caraver F, Weber FA, Cavalheiro AP, Graziottin TM. Low serum testosterone levels are associated with positive surgical margins in radical retropubic prostatectomy: hypogonadism represents bad prognosis in prostate cancer. *J Urol*. 2005; **176**: 2178–80.
- 48 True LD. Surgical pathology examination of the prostate gland. Practice survey by American society of clinical pathologists. *Am J Clin Pathol*. 1994; **102**: 572–9.
- 49 Van Coppenolle F, Skryma R, Ouadid-Ahidouch H, Slomianny C, Roudbaraki M, Delcourt P, et al. Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem J*. 2004; **377**: 569–78.
- 50 Van Coppenolle F, Le Bourhis X, Carpentier F, Delaby G, Cousse H, Raynaud JP, et al. Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride. *Prostate*. 2000; **43**: 49–58.
- 51 Van Coppenolle F, Slomianny C, Carpentier F, Le Bourhis X, Ahidouch A, Croix D, et al. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgeno-dependence. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; **280**: 120–9.
- 52 Vermeulen A, Kaufman JM. Diagnosis of hypogonadism in the aging male. *Aging Male*. 2002; **5**: 170–6.
- 53 vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci*. 1997; **94**: 2056–61.
- 54 Wennbo H, Kindblom J, Isaksson OG, Tornell J. Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology*. 1997; **138**: 4410–5.

GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE-II ANTAGONIST TRPTORELIX-1 INDUCES HORMONE-REFRACTORY PROSTATE CANCER CELL DEATH

Kang S.H.¹, Lee K.H.¹, Bae J.H.¹, Shim K.S.², Park H.S.¹, Moon D.G.¹, Lee J.G.¹, Yoon D.K.¹, Kim J.J.¹, Seong J.Y.³, Cheon J.²

¹Korea Univeristy Hospital, Urology, Seoul, South Korea, ²Korea University Hospital, Urology, Seoul, South Korea, ³Graduate School of Medicine, Korea University, Lab of G protein-Coupled Receptors, Seoul, South Korea

Introduction & Objectives: Prostate cancer is the most common malignancy in men and the second leading cause of cancer-related deaths in western countries. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is known to directly regulate prostate cancer cell proliferation, but the precise mechanism of action of the peptide is still under investigation. Recently, we demonstrate effects of GnRH-II on hormone-refractory human prostate cancer (HRPC) cells and also developed novel GnRH-II antagonist, triptorelix-1. This study is designed for evaluating the effect of GnRH-II receptor and its antagonist on cell growth of HRPC.

Material & Methods: The existence of GnRH-II binding protein was evaluated in both four different HRPC cell lines using photoaffinity labeling with [¹²⁵I]-[azidobenzoyl-D-Lys³] GnRH-II. After application of Cetorelix (classical GnRH-I antagonist), triptorelix-1 (GnRH-II antagonist), or synthetic GnRH-II, we evaluate cell proliferation and apoptosis in using thymidine incorporation, DNA fragmentation assay, DAPI stain, and TUNNEL method.

Results: We observed an 80-kDa protein specifically bound to GnRH-II, suggesting the existence of a novel GnRH-II binding protein in prostate cancer cells. GnRH-II increased the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) either through Ca²⁺ influx from external Ca²⁺ source or via mobilization of Ca²⁺ from internal Ca²⁺ stores. Trptorelix-1, a novel GnRH-II antagonist but not cetorelix, a classical GnRH-I antagonist, completely inhibited the GnRH-II-induced [Ca²⁺]_i increase. Triptorelix-1 but not cetorelix significantly reduced the number of cells survived and it induced nuclear fragmentation and DNA laddering. The most of cells treated with trptorelix-1 were TUNEL-positive. Thus, trptorelix-1 is likely to trigger an apoptotic process of these cells.

Conclusions: The GnRH-II receptor is identified and important role in proliferation and survival of HRPC cells. The novel GnRH-II antagonist, triptorelix can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in human HRPC cells. Collectively, this study indicates that trptorelix-1 can be developed as an innovative therapeutic drug for the treatment of prostate cancer.

ENDOGENOUSLY EXPRESSED SEX HORMONE-BINDING GLOBULIN (SHBG) MEDIATES THE STEROID RESPONSE OF PROSTATE CANCER CELLS

Kahn S.¹, Li Y.H.², Nahkla A.¹, Hryb D.¹, Rosner W.¹, Romas N.¹

¹Columbia University, Urology, New York, United States of America, ²Emory University, Yerkes Microarray Core, Atlanta, United States of America

Introduction & Objectives: Sex hormone binding globulin (SHBG), a protein that binds plasma androgens and estrogens, participates in the initial steps of a membrane based steroid signaling pathway in human prostate cells. We recently showed that SHBG is locally expressed in prostate cells. Here, we investigated whether locally expressed SHBG regulates activation of membrane based androgen signaling, and intracellular activation of the androgen receptor (AR). We hypothesize that altered SHBG expression affects the androgen response of prostate cancer cells and contributes to their progression through deletion of the linked p53/SHBG gene locus on chromosome 17p13.1.

Material & Methods: Genomic effects of SHBG expression on the androgen response of prostate cancer cells was addressed in LNCaP cells by microarray analysis. L5S2 is an inducible LNCaP cell line that overexpresses SHBG when treated with the inducing agent, ponasterone A (PonA). L5V4 is a sister, empty vector control line. Each treatment condition was performed in triplicate- 1) L5S2 negative treatment control (carrier only) 2) L5S2 PonA treated only 3) L5S2 PonA treated, DHT treated 4hrs 4) L5S2 PonA treated, DHT treated 24hrs 5) L5V4 negative treatment control (carrier only) 6) L5V4 PonA treated only 7) L5V4 PonA treated, DHT treated 4hrs 8) L5V4 PonA treated, DHT treated 24hrs Briefly, RNAs were isolated, assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer, and were found to be of high integrity. Biotinylated cRNAs were hybridized to Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array chips, representing 54675 transcripts. Raw data were analyzed using GeneSpring software to identify differentially expressed genes.

Results: SHBG expression affects the androgen responsiveness of LNCaP cells. We identified genes in LNCaP cells whose expression is affected by elevated SHBG and DHT, but not by SHBG or DHT alone, consistent with membrane based SHBG signaling. Furthermore, SHBG dampened the response of an independent set of genes that were induced or repressed by DHT treatment alone, consistent with a role for SHBG in regulating AR activation. A detailed description will be presented at the 2007 meeting.

Conclusions: Our findings support a biologic role for AR-independent, membrane based androgen signaling through SHBG, and for intracellular SHBG in modulating the AR response of prostate cells. This is important, considering the intense attention devoted to androgen signaling via the AR. Our results should help identify SHBG-mediated, AR-independent androgen responsive pathways, and their biologic effects. Furthermore, our finding that intracellular SHBG can affect the AR response of LNCaP cells supports a role for reduced SHBG expression in prostate cancer progression. If confirmed, SHBG could serve as a novel clinical target for the treatment of prostate cancer through the availability of agonists and antagonists of SHBG signaling and androgen binding.

CELL PROLIFERATION CONTROL BY TESTOSTERONE AND LETROZOLE IN LNCAP ANDROGEN-DEPENDENT PROSTATE CANCER CELLS: INVOLVEMENT OF THE GLYOXALASE SYSTEM

Mearini E.¹, Talesa V.N.², Cottini E.¹, Fioretti F.¹, Del Buono C.², Antognelli C.²

¹University of Perugia, Urology, Perugia, Italy, ²University of Perugia, Molecular Biology, Perugia, Italy

Introduction & Objectives: A growing body of evidence suggests that elevated testosterone (T) levels play a role in PCa pathogenesis. Recently, a possible involvement of T as inhibitor of cell proliferation in human androgen-insensitive PCa has been also suggested [2], being this steroid molecule able to induce oxidative stress [3]. In addition, epidemiological studies and experimental evidences, point out an emerging role of estrogens in the pathogenetic process of PCa. In vitro experiments on human breast cancer cell lines, has recently proved a modulation by estrogens on glyoxalase system (glyoxalase I, GI and glyoxalase II, GII) genes expression. The glyoxalase system is an important cellular system involved in cell growth control, being able to regulate the cytoplasmic levels of the two catabolic intermediates methylglyoxal (MG) and lactoylglutathione (LSG), both physiological inhibitors of cell proliferation and strong apoptosis factors [4,5]. To investigate whether T and letrozole (L), a potent aromatase inhibitor, may affect LNCaP androgen-dependent prostate cancer cells proliferation, via a glyoxalases-mediated mechanism

Material & Methods: LNCaP cells were cultured for 2 days in the presence of T or L at the concentrations of 1 nM, 100 nM and 25 nM, 50 nM, 100 nM and 1mM, respectively, in independent or combination (1 nM T + 25 nM L) experiments. Cell proliferation has been studied by [³H]thymidine incorporation assay and by counting viable cells by MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) assay; GI and GII mRNA levels were determined by Real-Time RT-PCR.

Results: T seems to significantly increase cell proliferation as well as GI and GII gene expression in LNCaP cells. L appears to induce a significant decrease in LNCaP cell growth, already at the lowest used concentration, and an augmentation in GI and GII transcripts levels. T and L combination experiments, however, indicate that the observed biological effects are mediated by estrogens rather than T.

Conclusions: Our results suggest that T, L and estrogens may affect proliferation of androgen-responsive LNCaP cells through changes in glyoxalases genes expression with a mechanism still to be elucidated. We hypothesize that the observed GI and GII mRNA levels modulations may be due to three possible mechanisms: (1) presence of estrogen response elements (EREs) [6] and/or androgen response elements (AREs) on glyoxalases genes promoter, as indicated by bioinformatics analysis; (2) presence of response mechanisms to androgens-induced oxidative stress [3]; (3) the typology of estrogens and androgen receptors pattern expressed by LNCaP cells. The results suggest the possible use of GI and GII transcript levels as a specific marker of cell proliferation and the potential introduction of aromatase inhibitors in the adjuvant therapy of androgen-responsive PCas.

TISSUE AND SERUM LEVELS OF PRINCIPAL ANDROGENS IN BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND PROSTATE CANCER

Heracek J.¹, Hill M.², Hampl R.², Starka L.², Sachova J.¹, Kuncova J.³, Urban M.¹, Eis V.⁴, Mandys V.⁴

¹3rd Faculty of Medicine, Charles University, Department of Urology, Prague, Czech Republic, ²Institute of Endocrinology, Endocrinology, Prague, Czech Republic, ³St. Chiara Hospital, University of Pisa, Department of Surgery, Division of Urology, Pisa, Italy, ⁴3rd Faculty of Medicine, Charles University, Department of Pathology, Prague, Czech Republic

Introduction & Objectives: Androgens play a key role in pathogenesis of both benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer, there is still not unequivocal opinion on importance of their tissue and serum levels for diagnosis and prognosis. Based on determination of principle androgens (and also epitestosterone as potential antiandrogen) in tissue and serum from large and statistically representative groups of patients underwent surgery for BPH or prostate cancer, 1. to find out whether the above hormones differ in both diseases, 2. whether correlation does exist between their intraprostatic and serum levels, and 3. to evaluate the (predictory) value of their investigation.

Material & Methods: Tissue samples obtained from 57 patients underwent transvesical prostatectomy for BPH and 121 patients underwent radical prostatectomy for prostate cancer of pathological stage T2 in 90 patients and T3 in 31 patients, Gleason score 2-10, aged 50-87 years were analyzed for testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), androstenedione and epitestosterone. In 75 subjects with cancer and 51 with BPH the serum samples were analyzed for testosterone, dihydrotestosterone, too and for SHBG. Tissues were homogenized in saline, extracted with diethyl ether, and following evaporation partitioned between n-hexane-methanol-water to remove the excessive fat. Steroids in methanolic-aqueous phase were then separated by reverse-phase HPLC and in the respective fractions they were determined by specific radioimmunoassays. Serum T, DHT and SHBG were determined by common immunoassays. Free T content was calculated from total T and SHBG concentrations. Mann-Whitney test was used for statistical evaluation of differences between BPH and prostate cancer samples, and Spearman correlation analysis for evaluation of mutual relationship between laboratory data.

Results: Significantly higher intraprostatic androgen levels were found in samples from patients with prostate cancer than in BPH. Higher levels in cancer tissue were found also for epitestosterone, no differences were found in serum levels. Highly significant correlations occurred between all pairs of intraprostatic androgens and also epitestosterone, as well as between serum androgens in both samples. No correlation was found between tissue and serum T and DHT, either in benign or cancer samples. The only exception was a significant correlation between tissue T and its free form in serum in BPH subgroup.

Conclusions: Analysis of a large group of samples from patients with BPH and prostate cancer revealed significant differences in intraprostatic androgens and also epitestosterone (believed to act as an endogenous antiandrogen). The most prominent (remarkable) were higher levels of DHT in prostate cancer tissue. The results point to importance of intraprostatic levels for evaluation of androgen status of the patients, contrasting to a low value of serum hormone measurement. Supported by grant NR 8039-3.

tosterone levels. We have observed libido decrease only in 25% of patients. Erectile dysfunction worsened in patients with already developed dysfunction. Non-steroid anti-androgens induced sexual dysfunction in 30% of patients. Intermittent androgenic suppression reduces incidence of symptoms associated with lack of androgens; in the cycle without therapy comes to the increase of testosterone levels and improvement of sexual life.

Conclusion:

Sexual dysfunction (SD) is accompanied with prostate diseases. Depending on the level of symptoms of lower urinary tract also the SD level gets worse. Moreover, in prostate cancer we influence development of SD also by selection of the therapeutic regimen and anti-tumour pharmacotherapy. During selection of therapeutic strategy we should take into consideration not only safety of oncological therapy but also the patient's sexuality and preferences.

THE ENDOCRINE PROFILES IN MEN WITH LOCALIZED AND LOCALLY ADVANCED PROSTATE CANCER TREATED WITH RADICAL PROSTATECTOMY

Heracek J.¹, Urban M.¹, Sachova J.¹, Kuncova J.², Eis V.³, Mandys V.³, Hampl R.⁴, Starka L.⁴

¹Department of Urology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University Prague, Czech Republic

²Department of Surgery, Division of Urology, St. Chiara Hospital, University of Pisa, Italy

³Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University Prague, Czech Republic

⁴Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

Introduction:

Prostate cancer is now recognized as one of the principal medical problems facing male population and the commonest cancer in males in developed countries. The aim of this study was to find out whether serum hormone levels differ significantly in localized (pT2) and locally advanced (pT3–pT4 or N1) prostate cancer.

Material and methods:

In 250 men (mean age \pm SEM: 63.8 ± 0.4) who underwent radical retropubic prostatectomy for histologically confirmed prostate cancer were analyzed serum samples for total testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, estradiol, progesterone, prolactin, cortisol, sex hormone-binding globulin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. Free testosterone content was calculated from total testosterone and SHBG concentrations.

Results:

Significantly lower serum level of FSH, i.e. 5.63 ± 0.31 vs. 7.07 ± 0.65 U/L was found in patients with localized prostate cancer than in locally advanced ($P < 0.05$). Significant correlation was found between serum levels of DHEAS and cortisol in both groups ($P < 0.02$), estradiol and prolactin in patients with locally advanced prostate cancer, as well between LH and prolactin ($P < 0.05$). No differences were found in other observed hormones.

Conclusion:

The results point to importance of hormone status as possible additional prognostic marker for patients with prostate cancer. Considerable research is needed to further understand influence of hormones on prostate cancer.

- 3 – Parapelvic cysts on both kidneys
- 4 – Suspected diverticle of Urinary bladder
- 5 – Expanding mass in pelvis between prostate and ampulla of rectum

Lungs x-ray: without pathological findings.

CT of pelvis:

- 1 – Huge Tumorous mass dorsally to the urinary bladder, infiltrating nearby organs
- 2 – Pelvic and retroperitoneal lymphadenopathy
- 3 – Suspected diverticle of the urinary bladder

Colonoscopy:

- 1 – Cauliflower-like tumor, fragile and bleeding, filling the ampulla of rectum

- 2 – Internal Hemorrhoids
- 3 – Diverticulosis of sigmoidal colon

Bone Scan:

- 1 – suspected Tumorous changes in the region of right shoulder joint and the head of left femur
- 2 – degenerative changes on the spine

Histology from rectum:

Tumorous cells growing in the rectum from the Urogenital tract.

TISSUE AND SERUM LEVELS OF PRINCIPAL ANDROGENS IN BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA AND PROSTATE CANCER

Heracek J.¹, Hampl R.², Hill M.², Starka L.², Sachova J.¹, Kuncova J.³, Eis V.⁴, Urban M.¹, Mandys V.⁴

¹Department of Urology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University Prague, Czech Republic

²Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic

³Department of Surgery, Division of Urology, St. Chiara Hospital, University of Pisa, Italy

⁴Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University Prague, Czech Republic

Introduction:

Androgens are considered to play a substantial role in pathogenesis of both benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer. The importance of determination of androgen levels in tissue and serum for cancer progression and prognosis has been poorly understood. The aim of study was to find out hormonal differences in both diseases, their correlations between intraprostatic and serum levels and predictory value of their investigation.

Material and methods:

Testosterone, dihydrotestosterone, androstenedione and also epitestosterone were determined in prostate tissue from 57 patients who underwent transvesical prostatectomy for BPH and 121 patients after radical prostatectomy for prostate cancer. In 75 subjects with cancer and 51 with BPH the serum samples were analyzed for testosterone, dihydrotestosterone and SHBG.

Results:

Significantly higher intraprostatic androgen concentrations, i.e. 8.85 ± 6.77 vs. 6.44 ± 6.43 pmol/g, $P < 0.01$ for dihydrotestosterone, and 4.61 ± 7.02 vs. 3.44 ± 4.53 pmol/g, $P < 0.05$ for testosterone, respectively, were found in patients with prostate cancer than in BPH. Higher levels in cancer tissue were found also for epitestosterone. However, no differences were found in serum levels. Highly significant correlations occurred between all pairs of intraprostatic androgens and also epitestosterone as well as between serum testosterone and dihydrotestosterone ($P < 0.001$) in both BPH and cancer groups. Correlation was not found between corresponding tissue and serum testosterone and dihydrotestosterone, either in benign or cancer samples.

Conclusion:

The results point to importance of intraprostatic hormone levels for evaluation of androgen status of patients, contrasting to a low value of serum hormone measurement.

15. Endokrinní profil muže s lokalizovaným a lokálně pokročilým karcinomem prostaty po radikální prostatektomii

J. Heráček¹, M. Urban¹, M. Lukeš¹, J. Sachová¹,
J. Kuncová², R. Hamp³, L. Stárka³, M. Hill³,
V. Eis⁴, V. Mandys⁴

¹Urologická klinika 3. LF UK, Praha

²Chirurgická klinika St. Chiara Hospital, Univerzita v Pise, Itálie

³Endokrinologický ústav, Praha

⁴Ústav patologie 3. LF UK, Praha

Úvod: Karcinom prostaty (KP) patří mezi nejzávažnější onemocnění ohrožující mužskou populaci a současně k nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů ve vyspělých zemích. Cílem studie bylo zjistit, zda existují signifikantní rozdíly v sérových koncentracích hormonů u lokalizovaného (pT2) a lokálně pokročilého (pT3–pT4 nebo N1) karcinomu prostaty.

Materiál, metodika: Ve skupině 250 mužů (průměrný věk \pm SEM: $63,8 \pm 0,4$), kteří podstoupili radikální retropubickou prostatektomii v letech 2004–2006 s histologickým nálezem karcinomu prostaty (128 mužů s lokalizovaným a 122 s lokálně pokročilým KP), jsme z ranní krve nalačno v den operace stanovili koncentrace celkového testosteronu, sulfát dehydroepiandrosteronu, estradiolu, progesteronu, prolaktinu, kortisolu, globulinu vázajícího sexuální hormony, luteinizačního a folikulostimulačního hormonu. Volný testosteron jsme určili výpočtem z hodnot koncentrace celkového testosteronu a SHBG.

Výsledky: U pacientů s lokalizovaným KP jsme prokázali statisticky významně nižší koncentrace FSH v séru ($5,63 \pm 0,31$ vs. $7,07 \pm 0,65$ U/l) oproti pacientům s lokálně pokročilým KP ($p < 0,05$). Nalezli jsme významnou korelaci mezi koncentracemi v séru u DHEAS a kortisolu u obou skupin pacientů ($p < 0,02$), mezi estradiolem a prolaktinem a mezi LH a prolaktinem ($p < 0,05$) u pacientů s lokálně pokročilým KP. U ostatních sledovaných hormonů jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly v sérových koncentracích hormonů.

Závěr: Výsledky studie ukazují na možnost využití hormonálního profilu jako dalšího prognostického markeru u pacientů s KP. K upřesnění významu jednotlivých hormonů v patogenezi KP je nutný další základní výzkum.

16. Chová se karcinom prostaty u hypogonadálního muže stejně jako v eugonadální populaci?

M. Matoušková¹, M. Hanuš¹, V. Dudková²,
E. Tejčková²

¹Urocentrum Praha

²PET centrum Nemocnice Na Homolce, Praha

Úvod: V posledních letech je v urologii věnována velká pozornost problematice LOH. Bývají udávány rozdílné hranice, pod nimiž je vhodná hormonální suplementace testosteronem. Součástí klinického sledování mužů, kteří jsou léčeni testosteronem, je kromě klinického vyšetření i sledování hladin PSA. Ani nízké hladiny testosteronu nesnižují riziko karcinomu prostaty. Hormonální suplementace by naopak neměla zvyšovat riziko zhoubných nádorů prostaty.

Materiál, metodika: Od roku 2005 jsme stanovení hladiny testosteronu zařadili do standardního sledování pacientů s karcinomem prostaty. Hladinu testosteronu vyšetřujeme u recentně zachycených karcinomů, před zahájením hormonální léčby, monitorujeme v průběhu hormonální léčby a při relapsu onemocnění. Karcinom prostaty jsme zastihli u 5 mužů po předchozí hormonální suplementaci, u jednoho z nich byla delší než 6 let. U dalších 18 mužů se hladiny testosteronu v době stanovení diagnózy pohybovaly pod 11 nmol/l. Hladina PSA u pacientů v souboru nepřesáhla 20 ng/ml.

Výsledky: Muži s průměrným věkem 64 let ($< 56; 77$) měli diagnostikovaný karcinom prostaty na podkladě elevace PSA a dalšího klinického vyšetření.

Testosteron	T1	T2	T3
< 7 nmol/l	2	3	1
7–11 nmol/l	6	8	3

U většiny nemocných převažoval střední stupeň buněčné diference, u 4 nemocných byl GS > 8 .

Závěr: Na základě literárních údajů i našeho malého souboru nepředpokládáme odlišné rozdělení a chování karcinomů prostaty v populaci u pacientů eugonadálních a pacientů s hypogonadizmem.

Adiponectin as a Potential Marker of Prostate Cancer Progression: Studies in Organ-Confined and Locally Advanced Prostate Cancer

D. HOUSA, Z. VERNEROVÁ, J. HERÁČEK¹, B. PROCHÁZKA², P. ČECHÁK³,
J. KUNCOVÁ¹, M. HALUZÍK⁴

Department of Pathology, and ¹Department of Urology, Third Medical Faculty and Teaching Hospital Královské Vinohrady, Prague, ²Department of Biostatistics and Informatics, National Institute of Public Health, Prague, ³Department of Biochemistry and Pathobiochemistry, Third Medical Faculty and Teaching Hospital Kralovske Vinohrady, ⁴Third Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine and General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic

Received November 13, 2006

Accepted February 19, 2007

On-line April 25, 2007

Summary

Serum levels of adiponectin were measured in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer of pT2 and pT3 stage. Adiponectin ELISA assay, immunohistochemistry, and selected metabolic and biochemical parameters measurement was performed in 25 patients with benign prostatic hyperplasia and 43 with prostate cancer (17 patients with organ-confined and 26 patients with locally advanced disease). Serum adiponectin levels did not differ between prostate benign hyperplasia and cancer clinical stage T2, but was significantly higher in pT3 relative to pT2 group (14.51 ± 4.92 vs. 21.41 ± 8.12 , $P = 0.003$). Tissue immunohistochemistry showed enhanced staining in neoplastic prostate glands and intraepithelial neoplasia relative to benign prostatic hyperplasia without distinction between disease grade and stage. Serum adiponectin levels are higher in locally advanced relative to organ-confined prostate cancer and may thus serve as an auxiliary marker providing further improvement for discrimination between pT2 and pT3 stages.

Key words

Prostate cancer • Adiponectin • Immunohistochemistry

Corresponding author

Martin Haluzik, Third Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine and General Faculty Hospital Prague, U nemocnice 2, 128 00 Prague 2, Czech Republic. E-mail: Martin.Haluzik@lf1.cuni.cz

Introduction

Prostate cancer (PCa), the third most common cancer in men worldwide, represents an important health and socio-economical problem in Western countries with increasing prevalence due to higher proportion of elderly population. Besides populational influence, the development of better methods for early detection of prostate cancer led to the substantial increase in number of cases. Except proposed genetic factors like higher circulating sex steroid levels, shorter androgen receptor CAG (glutamine) repeat length, genetic variability of steroid 5α -reductase enzyme gene and polymorphic variation in the VDBP (vitamin D-binding protein) gene, environmental factors may also contribute to the process of conversion of latent or histological/microscopic cancer to the clinically overt one. The most commonly studied environmental factors in connection with prostate cancer are diet with higher content of saturated fat and obesity itself: both being very common as a result of Western lifestyle with abundance of food (Gann 2002). Fat consumption correlates well with the prostate cancer mortality rate in most studies around the world (Le Marchand *et al.* 1994), although this finding was not confirmed by all studies (Andersson *et al.* 1995). This observation might reflect the fact that high levels of dietary fat stimulate proliferation of prostate cancer cells (Aronson *et al.* 1999). Obesity itself is a general risk factor for the development of some forms of cancer

including the prostate, breast, endometrial and colon cancer (Calle and Thun 2004). However, it should be noted that the studies focused on the relationship between obesity and prostate cancer did not yield completely consistent results. While several studies found an increased risk of prostate cancer among obese and overweight men (Andersson *et al.* 1997), others revealed little or no association (Giovannucci *et al.* 1997). According to the results of some studies, body mass index and in particular visceral obesity correlates with the aggressiveness and mortality of prostate cancer (Hsing *et al.* 2002). In patients with established diagnosis of prostate cancer, obesity is a predictor of poor prognosis and is associated with higher tumor stage and grade (Freedland *et al.* 2004). The convincing evidence for the role of diet in modulation of prostate cancerogenesis came from migration studies showing an increased incidence of prostate cancer in first-generation immigrants to US from Japan and China linking increased incidence of prostate cancer to the change of diet higher in saturated fat (Shimizu *et al.* 1991).

A discovery of endocrine function of adipose tissue opened another possible link between obesity and cancerogenesis. Adipose tissue is the source of numerous circulating hormones that may participate in the development and progression of different forms of malignant tumors (Housa *et al.* 2006) including prostate cancer (Freedland *et al.* 2005, Somasundar *et al.* 2004). Adiponectin is an adipose tissue-derived hormone expressed almost exclusively in adipocytes with significant anti-diabetic, anti-atherosclerotic and anti-inflammatory properties as demonstrated by experimental rodent studies (Kadowaki and Yamauchi 2005). There are several lines of evidence suggesting that adiponectin may play a substantial role in cancer pathogenesis. Circulating levels of adiponectin were inversely associated with the risk of breast, endometrial, colon and gastric cancer in several studies (Dal Maso *et al.* 2004, Ishikawa *et al.* 2005, Mantzoros *et al.* 2004, Miyoshi *et al.* 2003, Petridou *et al.* 2003, Wei *et al.* 2005). Furthermore, *in vitro* data suggest that adiponectin inhibits cell proliferation, induces apoptosis and suppresses tumor growth due to its antiangiogenic properties exerting its effect *via* downstream common effectors c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) (Miyazaki *et al.* 2005). Recent studies showed that non-proteolytic full-length adiponectin inhibited the growth of androgen-dependent and androgen-independent prostate cancer cell lines thus

serving as a link between obesity and prostate cancer (Bub *et al.* 2006). An inverse association between serum adiponectin levels and histological grade, disease stage as well as aggressiveness of prostate cancer was reported by Freedland *et al.* 2004, 2005a,b, Goktas *et al.* 2005), but these results were not confirmed in the recent study of Baillargeon *et al.* (2006).

In this study, we evaluated serum levels and tissue expression of adiponectin in well-characterized patients undergoing simple suprapubic prostatectomy for BPH (benign prostatic hyperplasia) and radical retropubic prostatectomy for organ-confined (pT2) or locally advanced prostate cancer (pT3) preoperatively clinically staged as T2 disease and we studied the relationship of adiponectin levels with tumor stage, grade and selected hormonal, metabolic and biochemical parameters.

Methods

Study subjects

Sixty-eight men referred to undergo either simple prostatectomy for benign prostatic hyperplasia or radical prostatectomy for prostate cancer preoperatively diagnosed with clinical stage T2 from December 2004 to May 2005 at the Department of Urology, Teaching Hospital Kralovske Vinohrady were enrolled into the study. Of those, 25 patients had benign prostatic hyperplasia and 43 patients had prostate cancer of clinical stage T2. None of patients had prior radiotherapy, chemotherapy, hormonal treatment including androgen deprivation therapy or suffered from an acute illness. The prostate cancer patients were stratified for further evaluation into two groups based on the disease extension: 17 patients with organ-confined (pT2 pathological stage) and 26 patients with locally advanced disease (pT3 pathological stage). The patients in pT2 group were followed up for 16-20 months and none of the subjects reported local recurrence or metastatic disease development. The study protocol was approved by the local ethical committee. All participating subjects were informed about the purpose of the study and provided written informed consent.

Anthropometric examination and blood sampling

Patients underwent a single physical examination, were measured and weighed and BMI (body mass index) was calculated as the weight in kilograms divided by the height in square meters. Peripheral venous blood samples were collected after an overnight fast at

the morning of the day of surgery between 6:00 and 8:00 and centrifuged for 20 min at 2000 rpm. The serum was separated, aliquoted and kept frozen at -80°C until further analysis.

Hormonal and biochemical assays

Serum adiponectin levels were measured using commercial RIA kit (Linco Research, St. Charles, Missouri, USA). Sensitivity was 1.0 ng/ml, and the intra- and interassay variability were 1.78 % and 8.25 %, respectively. Serum total prostate specific antigen (PSA) and free PSA levels, cortisol, prolactin, testosterone, SHBG, FAI, DHEAS, estradiol, progesterone, LH, FSH, insulin, fasting plasma glucose, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and total cholesterol were measured at the Department of Biochemistry, Teaching Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, by standard laboratory methods.

Prostatectomy specimens processing

Each radical or simple prostatectomy whole specimen was fixed in 4 % buffered formaldehyde, totally embedded and processed as complete sampling with routine sections described previously (True 1994). All specimens were examined at the Department of Pathology, Teaching Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, graded according to the Gleason grading scheme and pathological staging based on UIAC TNM Classification of Malignant Tumours, Sixth edition was performed. Total prostate volume was calculated using the ellipsoidal method ($4/3 \times \pi \times (\text{length}/2 \times \text{width}/2 \times \text{height}/2)$) and prostate cancer volume was calculated based on the thickness of tissue sections and measurement of area occupied by tumor by analySIS 3.2 image analysis software (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Germany).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed in a subset of patients ($n=10$ from each group) covering both low and high serum levels of adiponectin of all three studied groups (BPH, pT2 and pT3). Five-micron-thick sections cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples were deparaffinized in xylene and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was inhibited by 3 % H_2O_2 in methanol for 30 min followed by 15 min rinsing in tap water. Non-specific reactivity was avoided by pretreatment sections with 1 % normal goat serum (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) with 1 % bovine fetal albumin for 2 h. The slides were incubated with polyclonal rabbit anti-adiponectin antibody Arcp30 (N-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), diluted to 1:250 with ChemMate Antibody Diluent (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). The Histofine® kit (Nichirei, Tokyo, Japan) was used to visualize sections incubated with primary antibody. The chromogen 3,3-diaminobenzidine (Liquid DAB+ Substrate, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) was applied to all sections and counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin. Tissue sections incubated without primary antibody and with normal rabbit immunoglobulin fraction (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) were used as negative controls.

All sections were analyzed using Nikon Eclipse E600 microscope in a random order by two pathologists who were unaware of clinical data. The intensity of adiponectin expression was scored on a four-point scale (0-3). In terms of the staining intensity, 0 represented lack of positivity, while a score of 1 to 3 represented weak, moderate, and strong immunohistochemical positivity, respectively. In a case of borderline staining intensity the difference between observers was solved by a secondary evaluation.

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.

	Benign prostatic hyperplasia (n=25)	Prostate cancer (n=43)	P
<i>Age (years)</i>	70.52 ± 8.73	63.61 ± 4.71	< 0.001***
<i>BMI (kg/m²)</i>	27.55 ± 3.36	27.43 ± 3.10	0.88
<i>Serum adiponectin (ng/ml)</i>	20.47 ± 10.13	18.68 ± 7.75	0.64
<i>Total PSA (ng/ml)</i>	8.02 ± 6.83	9.49 ± 8.66	0.18
<i>Free PSA (ng/ml)</i>	1.37 ± 2.07	0.91 ± 0.80	0.22
<i>F/T PSA (ng/ml)</i>	0.22 ± 0.20	0.10 ± 0.057	< 0.001***

Data presented as mean ± SD, *** $P < 0.001$, BMI – body mass index, F/T PSA – free/total PSA ratio

Table 2. Anthropometric, clinico-pathological, metabolic and biochemical parameters in patients with organ-confined and advanced prostate cancer group.

	Organ confined prostate cancer (n=17)	Advanced prostate cancer (n=26)	P
Age (year)	62.71 ± 5.22	64.19 ± 4.35	0.31
BMI (kg/m ²)	27.22 ± 3.24	27.56 ± 3.06	0.73
Normal (less than 25)	4	5	
Overweight (25-less than 30)	10	16	
Obese (30 or greater)	3	5	
Prostate volume (cm ³)	35.66 ± 16.33	28.71 ± 14.21	0.15
Total cancer volume (cm ³)	12.64 ± 10.31	14.58 ± 7.00	0.49
Serum adiponectin (ng/ml)	14.51 ± 4.92	21.41 ± 8.12	0.003**
Total PSA (µg/l)	6.30 ± 2.22	11.58 ± 10.55	0.024*
Free PSA (µg/l)	0.72 ± 0.46	1.04 ± 0.95	0.42
FAI (%)	47.37 ± 16.52	44.12 ± 16.50	0.58
F/T PSA	0.11 ± 0.06	0.10 ± 0.05	0.63
Testosterone (nmol/l)	13.04 ± 6.16	15.66 ± 10.13	0.52
LH (U/l)	3.66 ± 1.88	4.08 ± 4.28	0.57
FSH (U/l)	5.70 ± 2.56	7.74 ± 8.09	0.70
Cortisol (nmol/l)	506.00 ± 191.24	476.69±167.39	0.61
Prolactin (µg/l)	23.87 ± 19.17	14.93 ± 13.11	0.08
Progesterone (nmol/l)	5.89 ± 5.00	4.24 ± 1.62	0.40
Estradiol (pmol/l)	76.83 ± 22.35	82.91 ± 43.71	0.81
DHEAS (µmol/l)	35.59 ± 67.53	45.80 ± 64.52	0.10
SHBG (nmol/l)	38.54 ± 23.79	34.99 ± 14.90	0.99
CRP (mg/l)	5.26 ± 6.07	5.58 ± 6.49	0.83
Glucose (mmol/l)	5.66 ± 2.31	5.08 ± 1.42	0.24
Insulin (mUI/l)	5.46 ± 4.16	4.73 ± 4.18	0.33
Cholesterol (mmol/l)	4.76 ± 0.95	5.26 ± 0.84	0.08
LDL (mmol/l)	2.94 ± 0.77	3.21 ± 0.60	0.21
HDL (mmol/l)	1.14 ± 0.23	1.28 ± 0.21	0.08
Triglycerides (mmol/l)	1.63 ± 0.65	1.72 ± 0.84	0.71
Gleason sum score 2-4	3	0	
Gleason sum score 5-6	11	13	
Gleason sum score 3+4=7	2	4	
Gleason sum score 4+3=7	1	2	
Gleason sum score 8-10	0	7	

Data presented as mean ± SD, * P < 0.05, ** P < 0.01, CRP – C-reactive protein, DHEAS – dehydroepiandrosterone sulphate, FAI – free androgen index, PSA – prostate specific antigen, F/T PSA – free/total PSA, HDL – high-density cholesterol, LDL – low-density cholesterol, LH – luteinizing hormone, SHBG sex – hormone binding globulin.

Statistical analysis

The results are reported as mean ± S.D. Mann-Whitney Rank Sum test and Kruskal-Wallis test with Dunnet's Method were used for comparison of the groups as appropriate. The relationships between the variables were analyzed by Spearman's correlation coefficient ρ .

ROC curve for serum adiponectin and PSA levels in organ-confined and locally advanced cancer was calculated (Eng 2006). Differences and correlations were considered significant at $p < 0.05$ and where applicable, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ were shown.

The statistical analysis was performed with

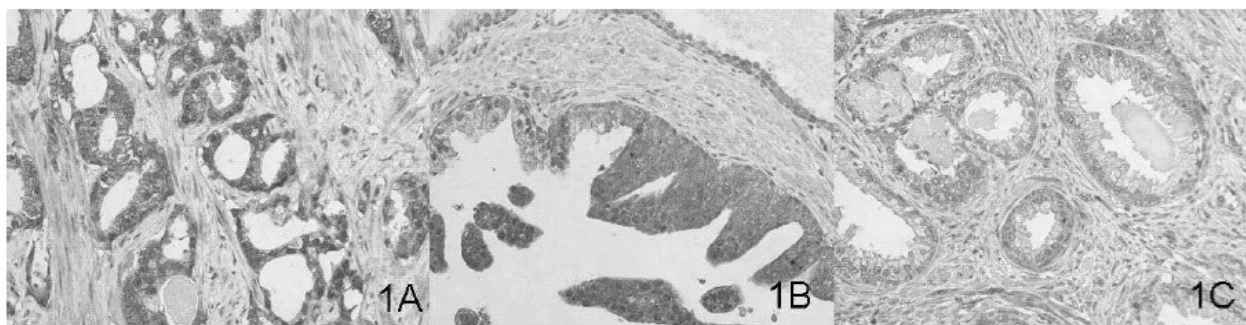


Fig 1. A. Immunohistochemical analysis of adiponectin within prostate adenocarcinoma. **B.** Immunohistochemical analysis of adiponectin within prostate intraepithelial neoplasia (PIN) and adjacent benign prostate gland. **C.** Immunohistochemical analysis of adiponectin within benign prostatic hyperplasia. Original magnification x 200

SigmaStat (Jandel Scientific, USA) and SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Baseline characteristics of all studied groups are shown in Tables 1 and 2. Most of prostate cancer patients in our study were overweight, had locally advanced disease and Gleason sum score 5 to 6. Patients with BPH and PCa did not differ significantly with respect to serum adiponectin levels (20.47 ± 10.13 vs. 18.68 ± 7.75 , $P = 0.64$, AUC (area under the curve) BPH vs. PCa = 0.52). There was also no difference between the latter and former group in terms of BMI, total and free PSA, but there was a significant difference in F/T PSA ratio (0.22 ± 0.20 vs. 0.10 ± 0.06 , $P < 0.001$).

When the patients were subdivided into subgroups with prostate cancer of pT2 and pT3 stage, respectively, a significantly higher adiponectin levels in locally advanced relative to organ-confined cancer were found (14.51 ± 4.92 vs. 21.41 ± 8.12 , $P < 0.005$). Except serum adiponectin levels, significant differences were also observed between both groups in total PSA levels. It is of notion here that similar significant results were obtained after BMI adjustment of serum adiponectin levels in three studied groups (BPH vs. T2 vs. T3, 0.78 ± 0.46 vs. 0.56 ± 0.26 vs. 0.80 ± 0.34 , for T2 vs. T3 $P < 0.02$, otherwise statistically non-significant).

No significant differences between T2 and T3 subgroups were found with respect to BMI, fasting plasma glucose and insulin serum levels. Similarly, we did not observe any difference between low-grade (pathological Gleason sum up to 6) and high-grade disease (pathological Gleason sum 7 or greater) with respect to adiponectin serum levels (19.60 ± 8.83 vs. 17.13 ± 5.38 , $P = 0.32$). On the contrary, difference in

BMI between low- and high-grade disease was found (26.61 ± 2.64 vs. 28.80 ± 3.40 , $P < 0.02$). After stratification into pT2a, pT2b, pT2c, pT3a and pT3b, adiponectin positively correlated with the substage of disease ($\rho = 0.35$, $P < 0.02$) and similarly correlated PSA levels ($\rho = 0.40$, $P < 0.01$), but both serum markers did not correlate with each other ($\rho = 0.18$, $P = 0.24$).

The area under the ROC (receiver operating characteristics) for serum adiponectin levels in prostate cancer was calculated as 0.77 (standard error 0.07) and the optimal cut-off detecting extension of prostate cancer beyond the capsule was set at adiponectin serum level 18.2 ng/ml with sensitivity 82.4 and specificity 69.2. When adiponectin was adjusted for BMI, area under ROC was calculated as 0.72 (standard error 0.08) and for PSA as 0.71 (standard error 0.08).

In organ-confined cancer a P trend towards inverse relationship between adiponectin levels and BMI ($\rho = -0.44$, $P = 0.07$) was found. Furthermore, adiponectin levels positively correlated with prolactin concentrations ($\rho = 0.49$, $P = 0.05$) while an inverse association of adiponectin was observed with total testosterone ($\rho = -0.63$, $P = 0.009$), DHEAS ($\rho = -0.59$, $P = 0.02$) and SHBG ($\rho = 0.68$, $P = 0.004$). In extraprostatic extension of cancer, a trend towards an inverse association between adiponectin and BMI was observed ($\rho = -0.38$, $P = 0.05$) and similarly to organ-confined cancer a positive correlation with prolactin ($\rho = 0.43$, $P = 0.03$). There was also a negative correlation with insulin ($\rho = -0.40$, $P = 0.05$).

Tissue immunostaining with adiponectin antibody showed cytoplasmic positivity both in benign and malignant prostatic glands and in some stromal elements (i.e. smooth muscle cells). Cancerous glands (Fig. 1A) and glands with prostatic intraepithelial neoplasia (Fig. 1B) showed higher staining intensity in

comparison with adjacent benign prostatic glands (Fig. 1C). Comparable staining intensity in normal and tumor samples was observed in basal cells, basal cell hyperplasia and urothelial and squamous metaplasia. There was no obvious association between staining intensity and histological grade and stage of tumor (data not shown)

Discussion

Obesity, the excess of adipose tissue, is a well-established risk factor for the development of several types of malignancies. Adipose tissue produces several hormonally active substances that can participate in the process of cancerogenesis by stimulating growth, migration and invasion of tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. Adiponectin is an adipose tissue-derived polypeptide hormone that in addition to its anti-diabetic and anti-atherogenic effects also exerts anti-angiogenic properties (Brakenhielm *et al.* 2004). Previous studies showed that increased serum adiponectin levels were inversely correlated with a risk of endometrial (Dal Maso *et al.* 2004, Petridou *et al.* 2003), breast (Mantzoros *et al.* 2004, Miyoshi *et al.* 2003), colon (Wei *et al.* 2005) and gastric cancer (Ishikawa *et al.* 2005).

The relationship between serum adiponectin levels and prostate cancer was evaluated in three recently published studies. Goktas *et al.* (2005) found lower adiponectin levels in poorly differentiated and extraprostatic prostate cancer than in well- or moderately differentiated prostate cancer and organ-confined disease. In addition, a negative association between histological grade and stage of prostate cancer and plasma adiponectin levels was observed. Similarly, Freedland *et al.* (2005) found an inverse relationship between adiponectin and BMI as well as inverse association of adiponectin with high-grade disease in overweight and obese men. In normal weight and in overweight and obese men with high-grade disease adiponectin was positively associated with high stage disease. On the contrary, Baillargeon *et al.* (2006) found that adiponectin did not correlate with prostate cancer aggressiveness or cancer risk. In our study, we observed no significant difference in adiponectin levels between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and between low-grade and high-grade disease, but we found significantly higher adiponectin concentrations in patients with locally advanced disease stage relative to organ-confined cancer.

There are several possible explanations for different findings with respect to serum adiponectin levels between our and other studies cited above. Firstly, in the study of Goktas *et al.* (2005) the patients were stratified into the groups based on the results of transrectal ultrasound-guided biopsy and the same approach was used for grading of disease. This approach could be less precise than diagnosis of tumor stage and grade based on the histological examination of samples obtained by retropubic radical prostatectomy specimens in prostate cancer as used in our study. Furthermore, the population in the previous study had mostly normal weight, while in our study most of the subjects were overweight. Our data are to some extent similar to the results of Freedland *et al.* (2005) who did not find any association between plasma adiponectin and grade before adjusting the patients' subgroups with logistic regression and to the results of Baillargeon *et al.* (2006) who did not find any difference in serum adiponectin concentrations between control and prostate cancer and between high grade and low-grade disease.

As described above, we found significantly higher adiponectin levels in extended relative to organ-confined prostate cancer and positive correlation with prostate cancer substaging as well. The addition of serum adiponectin to PSA levels provided further improvement to prostate cancer staging. Based on these finding we suggest that adiponectin levels may provide a novel auxiliary marker for discrimination between organ-confined and locally advanced prostate cancer.

Our data suggested the link between adiponectin levels and prostate cancer progression. The opened question remains whether this is a causal relationship or whether the changes of adiponectin levels are rather the consequence of some metabolic changes present in more progressive but not organ-confined cancer. Here we found no significant differences in anthropometric and metabolic parameters such as BMI, blood glucose and serum insulin levels when comparing patients with advanced vs. organ-confined diseases. These findings support the idea that the difference in adiponectin levels is not a secondary result of metabolic changes. One attractive although rather speculative possibility is that increased serum adiponectin levels may serve as a protective factor against further tumor progression. It has been previously demonstrated that adiponectin has in general antiproliferative effects either through direct mechanism or by activating AMP activated protein kinase. As adiponectin did not correlate with PSA levels

in our study we may speculate that both serum markers work through different pathways and possibly reflect different places of production. In support of this hypothesis, we were unable to demonstrate immunohistochemically the adiponectin immunoreactivity in DU145 prostate cancer cell line growing in the absence of surrounding stroma and/or fat tissue, whereas we found an enhanced adiponectin immunostaining in the epithelium of malignant glands and PIN (prostate intraepithelial neoplasia) in the whole tissue sections recruited from prostate specimens (data not shown). Similarly to our results, recently it was shown that adiponectin receptors are expressed at mRNA and protein levels in prostate cancer cell lines while mRNA for adiponectin was undetectable (Mistry *et al.* 2006). Therefore it is possible that adiponectin released from periprostatic fat after breach of capsule or from interstitial stromal tissue surrounding epithelium of prostate glands binds increasingly to its receptors in (pre)malignant epithelium and after its selective uptake acts on it in an autocrine/paracrine fashion.

Increased serum adiponectin levels in patients with advanced disease stage (pT3) observed in our study differ from previously published results in patients with other malignancies (breast, gastric, colon and endometrial cancer) where inverse association of adiponectin levels and tumor stage was observed. However, it should be stressed that advanced stage of breast, colon and

endometrial cancer is often linked to cachexia with the liberation of cytokines, including TNF- α , lowering serum adiponectin levels. Higher cancer stage in colon and endometrial cancer is also linked with serosal surface perforation with the extension of cancerous cells in the peritoneal cavity with possible direct modulation of adiponectin production.

In conclusion, in our study on a limited number of patients we showed that serum adiponectin levels did not differ between patients with benign hyperplasia and prostate cancer of clinical stage T2. However, adiponectin levels were significantly higher in pT3 relative to pT2 stage prostate cancer patients. We suggest that circulating adiponectin levels may serve as an auxiliary marker for discrimination of organ-confined and locally advanced prostate cancer stage.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Vaclav Eis for helpful discussion and Renáta Hájková and Andrea Musilová for technical assistance. This work was supported by Internal Grant Agency of Ministry of Health of the Czech Republic NRI 8096-3 to J. Heráček and Project Oncology Nr. MSM0021620808 by the Ministry of Education of The Czech Republic to Z. Vernerová.

References

- ANDERSSON SO, BARON J, WOLK A, LINDGREN C, BERGSTROM R, ADAMI HO: Early life risk factors for prostate cancer: a population-based case-control study in Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **4**: 187-192, 1995.
- ANDERSSON SO, WOLK A, BERGSTROM R, ADAMI HO, ENGHOLM G, ENGLUND A, NYREN O: Body size and prostate cancer: a 20-year follow-up study among 135006 Swedish construction workers. *J Natl Cancer Inst* **89**: 385-389, 1997.
- ARONSON WJ, TYMCHUK CN, ELASHOFF RM, McBRIDE WH, McLEAN C, WANG H, HEBER D: Decreased growth of human prostate LNCaP tumors in SCID mice fed a low-fat, soy protein diet with isoflavones. *Nutr Cancer* **35**: 130-136, 1999.
- BAILLARGEON J, PLATZ EA, ROSE DP, POLLOCK BH, ANKERST DP, HAFFNER S, HIGGINS B, LOKSHIN A, TROYER D, HERNANDEZ J, LYNCH S, LEACH RJ, THOMPSON IM: Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 1331-1335, 2006.
- BRAKENHIELM E, VEITONMAKI N, CAO R, KIHARA S, MATSUZAWA Y, ZHIVOTOVSKY B, FUNAHASHI T, CAO Y: Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2476-2481, 2004.
- BUB JD, MIYAZAKI T, IWAMOTO Y: Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **340**: 1158-1166, 2006.
- CALLE EE, THUN MJ: Obesity and cancer. *Oncogene* **23**: 6365-6378, 2004.

- DAL MASO L, AUGUSTIN LS, KARALIS A, TALAMINI R, FRANCESCHI S, TRICHOPOULOS D, MANTZOROS CS, LA VECCHIA C: Circulating adiponectin and endometrial cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 1160-1163, 2004.
- ENG J: <http://www.rad.jhmi.edu/jeng/javarad/roc/JROCFITi.html> 2006 November 7
- FREEDLAND SJ, TERRIS MK, PRESTI JC, JR., AMLING CL, KANE CJ, TROCK B, ARONSON WJ: Obesity and biochemical outcome following radical prostatectomy for organ confined disease with negative surgical margins. *J Urol* **172**: 520-524, 2004.
- FREEDLAND SJ, SOKOLL LJ, MANGOLD LA, BRUZEK DJ, MOHR P, YIU SK, EPSTEIN JI, PARTIN AW: Serum leptin and pathological findings at the time of radical prostatectomy. *J Urol* **173**: 773-776, 2005a.
- FREEDLAND SJ, SOKOLL LJ, PLATZ EA, MANGOLD LA, BRUZEK DJ, MOHR P, YIU SK, PARTIN AW: Association between serum adiponectin, and pathological stage and grade in men undergoing radical prostatectomy. *J Urol* **174**: 1266-1270, 2005b.
- GANN PH: Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol* **4** (Suppl 5): S3-S10, 2002.
- GIOVANNUCCI E, RIMM EB, STAMPFER MJ, COLDITZ GA, WILLETT WC: Height, body weight, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**: 557-563, 1997.
- GOKTAS S, YILMAZ MI, CAGLAR K, SONMEZ A, KILIC S, BEDIR S: Prostate cancer and adiponectin. *Urology* **65**: 1168-1172, 2005.
- HOUSA D, HOUSOVA J, VERNEROVA Z, HALUZIK M: Adipocytokines and cancer. *Physiol Res* **55**: 233-244, 2006.
- HSING AW, REICHARDT JK, STANCZYK FZ: Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* **52**: 213-235, 2002.
- ISHIKAWA M, KITAYAMA J, KAZAMA S, HIRAMATSU T, HATANO K, NAGAWA H: Plasma adiponectin and gastric cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 466-472, 2005.
- KADOWAKI T, YAMAUCHI T: Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* **26**: 439-451, 2005.
- LE MARCHAND L, KOLONEL LN, WILKENS LR, MYERS BC, HIROHATA T: Animal fat consumption and prostate cancer: a prospective study in Hawaii. *Epidemiology* **5**: 276-282, 1994.
- MANTZOROS C, PETRIDOU E, DESSYPRIS N, CHAVELAS C, DALAMAGA M, ALEXE DM, PAPADIAMANTIS Y, MARKOPOULOS C, SPANOS E, CHROUSOS G, TRICHOPOULOS D: Adiponectin and breast cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 1102-1107, 2004.
- MISTRY T, DIGBY JE, CHEN J, DESAI KM, RANDEVA HS: The regulation of adiponectin receptors in human prostate cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **348**: 832-838, 2006.
- MIYAZAKI T, BUB JD, UZUKI M, IWAMOTO Y: Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. *Biochem Biophys Res Commun* **333**: 79-87, 2005.
- MIYOSHI Y, FUNAHASHI T, KIHARA S, TAGUCHI T, TAMAKI Y, MATSUZAWA Y, NOGUCHI S: Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res* **9**: 5699-5704, 2003.
- PETRIDOU E, MANTZOROS C, DESSYPRIS N, KOUKOULOMATIS P, ADDY C, VOULGARIS Z, CHROUSOS G, TRICHOPOULOS D: Plasma adiponectin concentrations in relation to endometrial cancer: a case-control study in Greece. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 993-997, 2003.
- SHIMIZU H, ROSS RK, BERNSTEIN L, YATANI R, HENDERSON BE, MACK TM: Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* **63**: 963-966, 1991.
- SOMASUNDAR P, FRANKENBERRY KA, SKINNER H, VEDULA G, MCFADDEN DW, RIGGS D, JACKSON B, VANGILDER R, HILEMAN SM, VONA-DAVIS LC: Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J Surg Res* **118**: 71-82, 2004.
- TRUE LD: Surgical pathology examination of the prostate gland. Practice survey by American society of clinical pathologists. *Am J Clin Pathol* **102**: 572-579, 1994.
- WEI EK, GIOVANNUCCI E, FUCHS CS, WILLETT WC, MANTZOROS CS: Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* **97**: 1688-1694, 2005.

Serum resistin levels in benign prostate hyperplasia and non-metastatic prostate cancer: Possible role in cancer progression

D. HOUSA*, Z. VERNEROVA, J. HERACEK¹, P. CECHAK², B. ROŠOVA, J. KUNCOVA¹, M. HALUZIK³

Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic; ¹Department of Urology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague; ²Department of biochemistry and pathobiochemistry, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague; ³3rd Department of Internal Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague, e-mail: dhous@lf1.cuni.cz

Received: January 15, 2008

Resistin is a member of adipokine family involved in the regulation of inflammatory reactions and insulin sensitivity. In presented study its possible role in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer was evaluated.

Blood samples and prostate specimens were collected from 26 patients with benign prostate hyperplasia (BPH) and from 42 patients with prostate cancer (PCa) stage pT2 (n=18) and pT3 (n=24). Selected metabolic and biochemical parameters and serum resistin levels were measured and anthropometric measurements were performed as well as tissue immunohistochemistry for resistin.

Serum resistin levels did not differ significantly between benign hyperplasia and prostate cancer but in cancer patients there was a trend towards decrease with higher cancer stage. Moreover, serum resistin levels were significantly lower in patients with seminal vesicle invasion in comparison to those without invasion. While in BPH serum resistin levels correlated with insulin resistance, inflammatory status and cortisol, in PCa positive correlation with F/T PSA ratio and cortisol was observed. Tissue immunohistochemistry did not show any differences in staining pattern between benign and neoplastic prostate tissue.

We conclude that serum resistin levels do not significantly differ between patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer, but there is a trend towards decrease in resistin serum levels in advanced cancer cases.

Key words: Immunohistochemistry, inflammation, insulin resistance, prostate cancer, resistin

Introduction

Obesity and diet rich in saturated fat is associated with several malignancies, including prostate cancer. As prevalence of both entities increases in Western countries, it is not surprising that the rate of prostate cancer has been continuously increasing [1–3].

Adipose tissue produces a vast array of biologically active molecules acting by both paracrine and endocrine fashion [4]. Adipocyte-derived factors commonly referred to as adipokines

may represent a possible link between obesity and cancer development as is known from studies in breast, endometrial and colon cancer [5]. It has been mainly leptin and adiponectin that were demonstrated to participate in the development and progression of different forms of malignancies, including prostate cancer [6–10] while the role of resistin in cancerogenesis remains less clear.

Resistin is a member of cystein-rich proteins that has been the subject of much controversy concerning its role in the pathogenesis of obesity-induced insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. Experimental data suggested that recombinant resistin administration induced insulin resistance and that hyperresistinemia contributed to impaired insulin sensitivity in obese rodents [11]. In contrast to rodents, the physiological role of resistin in humans is unclear. This fact is not surprising as there is not a direct homology between resistin in rodents and humans and additionally humans lack one of three murine isoforms [12]. In humans, resistin de-

* Corresponding author

BPH benign prostate hyperplasia, BMI body mass index, CRP C-reactive protein, cT2 clinical stage T2, F/T PSA free/total PSA ratio, FAI free androgen index, HDL high-density lipoproteins, LDL low-density lipoproteins, PCa prostate cancer, PSA prostate specific antigen, pT2, pT3 histopathological stage T2,T3, SHBG sex-hormone binding globulin, SVI seminal vesicle invasion

rives primarily from stromavascular fraction of adipose tissue and immunocompetent cells of peripheral blood and its role probably lies in the regulation of inflammatory reactions associated with obesity rather than insulin sensitivity [13]. Several studies in humans have highlighted resistin expression in adipose tissue, particularly in abdominal depots [14], though mRNA expression in isolated mature adipocytes is low in comparison with pre-adipocytes. Concerning its role in cancerogenesis, resistin was recently reported to contribute to *in vitro* human choriocarcinoma cell invasiveness and to the control of angiogenesis [15] and increased serum resistin levels were described in breast cancer patients [16].

We hypothesized that resistin could be involved in the development of prostate cancer. To evaluate this we measured serum resistin levels and tissue expression in well-characterized group of patients that underwent simple prostatectomy for benign prostate hyperplasia (BPH); suprapubic radical prostatectomy for organ-confined (pT2) or locally advanced (pT3) prostate cancer (PCa), respectively and studied the relationship of resistin levels with tumor stage, grade and selected hormonal, metabolic and biochemical parameters.

Patients and methods

Study population. Sixty-eight men referred to undergo either simple prostatectomy for benign prostate hyperplasia or radical prostatectomy for prostate cancer of pre-operative clinical stage T2 were enrolled to the study. Of those, 26 patients had benign prostate hyperplasia, 18 patients had organ-confined (pT2) and 24 patients locally advanced disease (pT3), respectively. A complete medical history and physical examination were performed and the patients' medication was recorded. None of the patients had previously actinotherapy, chemotherapy, hormonal treatment, including androgen deprivation therapy or suffered from an acute illness. The study protocol was approved by the local ethical committee of Faculty Hospital Kralovske Vinohrady. All participating subjects were informed about the purpose of the study and provided written informed consent.

Anthropometric measurement and hormonal and biochemical analysis. BMI was calculated as the weight in kilograms divided by the height in square meters. Peripheral venous blood was collected after an overnight fasting in the morning of the day of surgery between 6:00am and 7:00am into tubes with EDTA and centrifuged for 20 minutes at 2000 rpm. The serum was separated, aliquoted and kept frozen at -80°C until further analysis. Serum resistin levels were measured using commercial ELISA kit (Biovendor, Brno, Czech Republic). Sensitivity was 1.0 ng/ml, and the intra- and interassay variability were 1.78% and 9.25%, respectively. Serum total PSA and free PSA levels, cortisol, testosterone, SHBG, FAI, DHEAS, estradiol, progesterone, LH, FSH, triglycerides, high-density lipoprotein, cholesterol, low-density lipoprotein and total cholesterol were measured in the Department of Biochemistry, Teaching Hospital Královské Vinohrady, Prague,

by standard laboratory methods. Assays for each parameter were performed in one batch to reduce interassay variability. Fasting levels of serum glucose (G_0) and insulin (I_0) were measured and HOMA-IR index was calculated [$\text{HOMA-IR} = \text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucose } (\text{mmol/L})/22.5$]. Atherogenic index was calculated as serum total cholesterol divided by serum HDL levels.

Histopathologic characteristics of prostate specimens. Each specimen of radical or simple prostatectomy was fixed in 4% buffered formaldehyde, totally embedded and processed as complete sampling with routine sections. All specimens were examined at the Department of Pathology, Teaching Hospital Královské Vinohrady, Prague. Tumor grading according to the Gleason grading scheme and pathological staging based on UICC TNM Classification of Malignant Tumours, Sixth edition staging manual (Czech edition 2004) were performed. The patients in pT2 group were followed-up for up to 30 months and none of the subjects reported recurrence, biochemical relapse or metastatic disease development.

Immunohistochemistry. Five-micron-thick sections cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples were deparaffinized in xylene and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was inhibited by 3% H_2O_2 in methanol for 30 minutes followed by 15 minutes rinsing in tap water. Non-specific reactivity was avoided by pre-treatment sections for 2 hrs with 1% normal goat serum (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) with 1% bovine fetal albumine diluted in ChemMate Antibody Diluent (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). The slides were incubated with resistin rabbit antiserum (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California, USA), diluted to 1:750 with ChemMate Antibody Diluent (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) for 1 hour at room temperature. The Histofine® kit (Nichirei, Tokyo, Japan) was used to visualize sections incubated with primary antibody. The chromogen 3,3'-diaminobenzidine (Liquid DAB+Substrate, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) was applied to all sections and counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin. Tissue sections incubated either without primary antibody or with normal rabbit immunoglobulin fraction (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) were used as negative controls.

All sections were analyzed using Nikon Eclipse E600 microscope in a random order by two pathologists who were unaware of clinical data.

Statistical analysis. The mean values of the various parameters studied were calculated and compared between groups using a two-tailed independent sample *t*-test or ANOVA as appropriate. The correlations among variables were analyzed using Spearman's correlation coefficients (*rho*). Two-sided Fishers exact test was used to determine the relationship between resistin immunostaining and the investigated clinicopathological factors. Statistical analyses were performed using SigmaStat (Jandel Scientific, USA) statistical package. Statistical significance was defined as a two-sided *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ and * $P \leq 0.05$, respectively and data were reported as mean \pm SD.

Results

Hormonal and biochemical characteristics of BPH and combined organ-limited and locally advanced PCa group (PCa = pT2+pT3) are shown in Tables 1 and 2. We did not find a significant difference between the latter and former group in terms of BMI, total and free PSA but there was a statistically significant increase in F/T PSA ratio (0.22 ± 0.20 vs. 0.10 ± 0.06 , $P < 0.001$) and serum cortisol levels (378.10 ± 222.38 vs. 488.81 ± 173.15 , $P = 0.002$) in PCa in comparison to BPH patients. Moreover, age in the BPH was biased towards advanced age when compared with PCa group. When the patients in “combined” PCa group were subdivided into pT2 and pT3 stages, the only difference encountered between both stages was increased total PSA level in pT3 (pT2 vs. pT3, 6.24 ± 2.17 vs. 11.55 ± 10.10 , $P = 0.04$).

Patients with BPH and PCa did not differ significantly with respect to serum resistin levels (7.09 ± 2.83 vs. 7.33 ± 4.98 , $P = 0.80$) and neither did after stratification for organ-confined and locally advanced prostate cancer (pT2 vs. pT3, 6.90 ± 2.67 vs. 6.07 ± 2.76 , $P = 0.34$). Similarly, we did not observe any difference in PCa group with respect to serum resistin levels between low-grade and high-grade disease (pathological Gleason sum 7 or greater) (7.64 ± 5.03 vs. 6.77 ± 5.01 , $P = 0.59$), the presence or absence of vascular invasion (6.21 ± 3.00 vs. 6.47 ± 2.70 , $P = 0.62$) but we noticed the statistically significant difference between the cases with ($n=13$) and without ($n=33$) seminal vesicle invasion (SVI) (5.04 ± 2.03 vs. 6.91 ± 2.79 , $P = 0.049$) (Fig.1). When comparing both groups with and without SVI in terms of CRP (3.35 ± 2.74 vs. 5.48 ± 6.54 , $P = 0.15$) and cortisol (437.46 ± 210.31 vs. 508.70 ± 163.53 , $P = 0.26$), there was no statistically significant difference.

Table 1. Anthropometric and biochemical parameters in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer.

	Benign prostate hyperplasia (n=26)	Prostate cancer (n=42)	P
Age (years)	70.73 ± 8.62	63.50 ± 4.70	< 0.001**
BMI (kg/m ²)	27.47 ± 3.31	27.36 ± 3.09	0.85
Serum resistin (ng/ml)	7.09 ± 2.83	7.33 ± 4.98	0.34
Total PSA (ng/ml)	8.02 ± 6.83	9.40 ± 8.58	0.23
Free PSA (ng/ml)	1.37 ± 2.07	0.91 ± 0.79	0.17
F/T PSA (ng/ml)	0.22 ± 0.20	0.10 ± 0.06	< 0.001 ***
Cortisol (nmol/l)	378.10 ± 223.38	488.81 ± 173.15	0.002 **
CRP (mg/l)	7.06 ± 13.63	5.42 ± 6.48	0.27
Glucose (mmol/l)	5.78 ± 2.42	5.28 ± 1.81	0.18
Insulin (mUI/l)	5.22 ± 4.52	4.94 ± 4.11	0.75
Cholesterol (mmol/l)	4.62 ± 1.07	5.08 ± 0.91	0.10
LDL (mmol/l)	2.82 ± 0.79	3.12 ± 0.67	0.16
HDL (mmol/l)	1.14 ± 0.31	1.24 ± 0.23	0.16
Triglycerides (mmol/l)	1.46 ± 0.68	1.67 ± 0.76	0.33
HOMA IR index	1.59 ± 2.37	1.36 ± 1.97	0.59
Athero index	4.16 ± 0.80	4.18 ± 0.72	0.90

Data presented as mean ± SD, *** P < 0.001, ** P < 0.01

Table 2. Anthropometric, clinico-pathological, metabolic and biochemical parameters in patients with organ-confined (pT2) and advanced prostate cancer (pT3) group.

	pT2 (n=18)	pT3 (n=24)	P
Age (years)	62.50 ± 5.14	64.42 ± 4.33	0.35
BMI (kg/m ²)	27.07 ± 3.21	27.50 ± 2.10	0.57
Serum resistin (ng/ml)	6.90 ± 2.67	6.07 ± 2.76	0.32
Total PSA (ng/ml)	6.24 ± 2.17	11.55 ± 10.10	0.04*
Free PSA (ng/ml)	0.72 ± 0.45	1.03 ± 0.98	0.82
Cortisol (nmol/l)	507.35 ± 185.25	477.00 ± 174.50	0.30
CRP (mg/l)	5.18 ± 5.89	4.72 ± 5.91	0.93
Glucose (mmol/l)	5.57 ± 2.27	5.10 ± 1.39	0.37
Insulin (mUI/l)	5.25 ± 4.12	4.62 ± 4.18	0.42
Cholesterol (mmol/l)	4.82 ± 0.95	5.18 ± 0.81	0.18
LDL (mmol/l)	2.98 ± 0.76	3.14 ± 0.56	0.45
HDL (mmol/l)	1.17 ± 0.24	1.29 ± 0.22	0.10
Triglycerides (mmol/l)	1.60 ± 0.64	1.69 ± 0.87	0.95
HOMA IR index	1.58 ± 2.51	1.17 ± 1.56	0.31
Athero index	4.19 ± 0.66	4.11 ± 0.76	0.73

Data presented as mean ± SD, HDL – high-density cholesterol, LDL – low-density cholesterol, CRP – C-reactive protein * P < 0.05

When the patients with prostate cancer were divided into the two groups based on median value of plasma resistin concentration (5.8 ng/ml) a P trend with decreased levels of free PSA in a group of serum resistin concentration < 5.8 ng/ml was observed (0.67 ± 0.42 vs. 1.12 ± 1.02 , $P = 0.07$) but not in other parameters monitored. When prostate cancer group was divided into pT2 and pT3 TNM classification substages, there was a P trend towards the decrease of serum resistin levels in advanced cancer stage ($r = -0.28$, P trend = 0.08). Additionally, statistically significant correlation of disease stage with PSA levels, Gleason sum and local aggressiveness factors (capsule penetration and/or SVI) was observed (data not shown).

No statistically significant differences between all studied groups were found with respect to BMI, fasting plasma glucose, serum insulin levels, HOMA IR and lipid metabolism parameters.

In the population of men with BPH, resistin levels positively correlated with HOMA IR ($\rho = 0.49$, $P = 0.02$), serum insulin concentration ($\rho = 0.47$, $P = 0.03$) and CRP ($\rho = 0.57$, $P = 0.003$), while no such relationships were found in prostate cancer patients. In PCa patients, positive correlation was found with F/T PSA ratio ($\rho = 0.37$, $P = 0.02$). In both BPH and PCa, a positive correlation with cortisol was found ($\rho = 0.58$, $P = 0.01$ and $\rho = 0.37$, $P = 0.02$, respectively). No correlation between BMI and serum resistin levels was found in our study.

Tissue immunostaining with rabbit anti-resistin antiserum showed cytoplasmatic positivity both in benign and malignant prostate glands and in stromal elements (i.e. smooth muscle cells). Comparable staining intensity in normal and tumorous samples was observed in all examined structures. There was no obvious association between staining intensity and histological grade of tumor (data not shown).

Discussion

Obesity is a well-established risk factor for the development of several types of malignancies. Adipose tissue is the source of several hormonally active substances that can participate in the process of cancerogenesis by stimulating growth, migration and invasion of tumor cells both *in vitro* and *in vivo* [5]. While adiponectin and leptin have been extensively studied so far, the role of resistin is less clear. Resistin was originally proposed to be a link between obesity and insulin resistance/diabetes based on studies in rodents. However, its role in humans seems to be different and lies probably in the regulation of inflammatory processes rather than in insulin sensitivity [17].

Here we show that circulating resistin levels did not differ significantly between patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. In prostate cancer, no relation of resistin serum levels to disease grade was observed but we found a statistically significant decrease of resistin serum levels in patients with SVI. This observation is of particular interest as

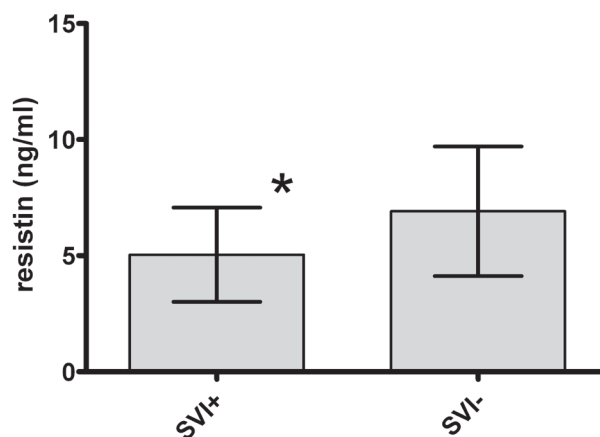


Figure 1. Serum resistin concentrations in patients with seminal vesicle invasion (SVI+) relative to patients without seminal vesicle invasion (SVI-). Results are expressed as means \pm SD. * $P < 0.05$.

SVI is a negative prognostic finding that confers a high rate of prostate cancer recurrence [18]. This finding is in accordance with observed trend of decreasing serum resistin levels with advancing prostate cancer stage. As the similar trend with disease stage was not observed in CRP, cortisol or HOMA-IR we may speculate that this finding is directly attributable to cancer growth rather than to secondary general metabolic changes. Moreover, positive correlation was observed between F/T PSA ratio and serum resistin levels which further supports the previous findings. Our results are opposite to those described recently in Korean breast cancer patients [16] and it might be speculated that it reflects enhanced metabolic turnover/hypercatabolic status in advanced stage of tumor. The similar trend toward decrease of serum resistin levels was observed in hyperthyroidism [19] and anorexia nervosa patients [20]. Moreover, in our study serum resistin levels in patients with benign hyperplasia positively correlated with CRP and HOMA IR, the finding that was not observed in patients with prostate cancer. In both groups the correlation with cortisol as the marker of stress conditions was observed.

Our findings show that resistin's role in metabolism, stress and inflammation at least partially overlaps in both cancerous and non-cancerous patients and that there is a possible role for resistin in cancer progression. Taken together, our data suggest that similarly to serum leptin and adiponectin levels, resistin might participate in prostate cancer progression.

This work was supported by the Research Project of MZO VFN2005

References

- [1] HARDING MA, THEODORESCU D. Prostate tumor progression and prognosis. interplay of tumor and host factors. *Urol Oncol* 2000; 5: 258–264.

- [2] ROTH J, QIANG X, MARBAN SL et al. The obesity pandemic: where have we been and where are we going? *Obes Res* 2004; 12 Suppl 2: 88S–101S.
- [3] SONN GA, ARONSON W, LITWIN MS. Impact of diet on prostate cancer: a review. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005; 8: 304–310.
- [4] Matsuzawa Y The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006; 580: 2917–2921.
- [5] HOUSA D, HOUSOVA J, VERNEROVA Z et al. Adipocytokines and cancer. *Physiol Res* 2006; 55: 233–244.
- [6] FREEDLAND SJ, SOKOLL LJ, MANGOLD LA et al. Serum leptin and pathological findings at the time of radical prostatectomy. *J Urol* 2005; 173: 773–776.
- [7] BAILLARGEON J, PLATZ EA, ROSE DP et al. Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1331–1335.
- [8] GOKTAS S, YILMAZ MI, CAGLAR K et al. Prostate cancer and adiponectin. *Urology* 2005; 65: 1168–1172.
- [9] MICHALAKIS K, WILLIAMS CJ, MITSIADES N et al. Serum adiponectin concentrations and tissue expression of adiponectin receptors are reduced in patients with prostate cancer: a case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 308–313.
- [10] HOUSA D, VERNEROVA Z, HERACEK J et al. Adiponectin as a potential marker of prostate cancer progression: studies in organ-confined and locally advanced prostate cancer. *Physiol Res* 2008; 57:
- [11] STEPPAN CM, LAZAR MA. The current biology of resistin. *J Intern Med* 2004; 255: 439–447.
- [12] ARNER P Resistin: yet another adipokine tells us that men are not mice. *Diabetologia* 2005; 48: 2203–2205.
- [13] KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548–2556.
- [14] McTERNAN PG, McTERNAN CL, CHETTY R et al. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2407.
- [15] DI SIMONE N, DI NICUOLO F, SANGUINETTI M et al. Resistin regulates human choriocarcinoma cell invasive behaviour and endothelial cell angiogenic processes. *J Endocrinol* 2006; 189: 691–699.
- [16] KANG JH, YU BY, YOUN DS. Relationship of serum adiponectin and resistin levels with breast cancer risk. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 117–121.
- [17] HALUZIK M, HALUZIKOVA D. The role of resistin in obesity-induced insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 306–311.
- [18] POTTER SR, EPSTEIN JI, PARTIN AW. Seminal vesicle invasion by prostate cancer: prognostic significance and therapeutic implications. *Rev Urol* 2000; 2: 190–195.
- [19] IGLESIAS P, ALVAREZ FIDALGO P, CODOCEO R et al. Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 59: 621–629.
- [20] DOSTALOVA I, SMITKA K, PAPEZOVA H et al. Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol Res* 2007; 56: 587–94.