

Mikrovaskularna gustina u iglenim biopsijama prostate - prediktor prognoze?

Microvascular density in prostate core biopsy - Prognostic predictors?

Stevan Matic¹, Milena Rakočević¹, Tomislav Jocić¹, Nataša Mihailović², Snežana Jančić¹

1. Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Odsek Patološka Anatomija
2. Institut za Javno Zdravlje Kragujevac, odsek Socijalna Medicina

Stevan Matic¹, Milena Rakocevic¹, Tomislav Jocic¹, Natasa Mihailovic², Snezana Jancic¹

1. University Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathological Anatomy, Kragujevac, Serbia
2. Institute for Public Health Kragujevac, Department of Social Medicine

RECEIVED 06.04.2017.

ACCEPTED 19.04.2017.

PRIMLJEN 06.04.2017.

PRIHVAĆEN 19.04.2017.

SAŽETAK

Cilj. Cilj našeg rada je ispitivanje mikrovaskularne gustine (MVD) u core biopsijama karcinoma prostate (PC).

Metoda. Na core biopsijama PC (n=25) i benigne hiperplazije prostate (BPH), served as controls (n=20) su, nakon rutinske obrade, primenjene klasična HE i imunohistohe-mijska ABC metoda sa CD105 antitelima. Svi ispitanici su imali nivo serumskog PSA >4.0 ng/mL. Srednja vrednost volumena prostate je 50.02, prosečan Gleason score je 7.7. MVD se računala brojanjem CD105 pozitivnih struktura u 5 „vrućih tačaka“. Nakon kvantitativne analize, stereometrijski je izračunata MVD po mm². Za statističku obradu dobijenih rezultata korišćen je programski paket SPSS (verzija 19.0).

Rezultati. Srednja vrednost CD 105 pozitivnih ćelija po mm² je značajno veća u PC nego kod BPH (676.6 vs 186.5). U PC postoji signifikantna povezanost MVD sa Gleason score (r=0.831) i nivoom PSA (r=0.343). Između PSA i volumena prostate postoji umerena pozitivna povezanost (r=0.565).

Zaključak. Vrednost MVD indeksa može biti značajan indikator progresije karcinoma prostate, tako da je moguće razlikovati pacijente kod kojih je ovaj rizik veći.

Ključne reči: rak prostate, mikrovaskularna gustina, core biopsija, povećan rizik, progresija

ABSTRACT

Objective. Objective of our study was to investigate microvascular density (MVD) in core biopsies of prostate cancer (PC). On core biopsies of the prostatic carcinoma PC (n = 25) the benign prostatic hyperplasia (BPH) served as control (n = 20), and after routine processing, classical HE and immunohistochemical ABC method with CD105 antibodies, were applied.

Method. All subjects had a serum PSA > 4.0 ng / mL. The mean value of prostate volume was 50.02, the average Gleason score was 7.7. MVD was achieved by counting the number of CD105-positive structures in the 5 "hot spots". After quantitative analysis, MVD was calculated stereometrically per mm². For the statistical analysis of obtained results the software package SPSS (version 19.0) was used.

Results. The mean value of CD 105-positive cells per mm² was significantly higher in PC than in BPH (676.6 vs 186.5). There is a significant correlation of MVD with Gleason score (r = 0.831) and PSA (r = 0.343) in the PC. Between the PSA and prostate volume exists a moderate positive correlation (r = 0.565).

Conclusion. Value of MVD index can be a significant indicator of the prostatic cancer progression degree in the core biopsy, thereby it is possible to distinguish patients with higher risk.

Key words: prostate cancer, core biopsy, micro-vessel density, higher risk, progression.

KORESPONDENCIJA / CORRESPONDENCE

Stevan Matic, SvetozaraMarkovića 69, 34000 Kragujevac, Tel. 0603230707, E-mail: stevan-008@hotmail.com

Stevan Matic, SvetozaraMarkovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia, Phone. +381603230707, E-mail: stevan-008@hotmail.com

UVOD

Karcinom prostate najčešći je maligni tumor kod muškaraca u Evropi sa 417 000 novih slučajeva dijagnostikovanih u toku 2012 godine. Prema zvaničnim podacima najveća incidenca ovog tumora registrovana je u Norveškoj dok je najmanja incidenca zabeležena u Albaniji. Varijacija u broju obolelih između zemalja može da odražava različitu prevalencu faktora rizika, korišćenje skrininga i različitih dijagnostičkih metoda.¹ Bolest se najčešće javlja kod muškaraca starijih od 50 godina i praćena je značajnom stopom mortaliteta, koja se povećava sa produženjem životnog veka muškaraca u Evropi i svetu.²

Najznačajniji faktori rizika za nastanak karcinoma prostate su starije životno doba, androgeni hormoni, pozitivna porodična anamneza, geografski položaj, gojaznost, socijalni i ekonomski uslovi.^{3,4} Prema nekim istraživanjima povećani unos hrane bogate mastima i rafinisanim ugljenim hidratima takođe doprinose povećanju incidence oboljevanja u industrijski razvijenim zemljama.^{5,6}

Karcinomi prostate čine prilično nehomogenu grupu malignih tumora sa nepredvidivim biološkim ponašanjem. Pored latentnih oblika koji vrlo često imaju usporen klinički tok, bez izraženih simptoma, postoje okultni, kao i tumori sa visokim malignim potencijalom koji često daju regionalne i udaljene metastaze pre bilo kakvih kliničkih simptoma. Podaci iz literature pokazuju da različiti faktori rasta i brojni angiogeni faktori mogu biti povezani sa agresivnim kliničkim tokom i lošom prognozom karcinoma prostate.

U rutinskoj kliničkoj dijagnostici malignih tumora prostate se koriste digitorektalni pregled (DRE), određivanje nivoa prostata specifičnog antigen seruma (PSA), transrektalni ultrazvuk (TRUS) i biopsija prostate.^{7,8,9} Definitivna dijagnoza se postavlja histopatološkim pregledom core biopsija prostate, na osnovu kojih se određuju prognostički parametri kao što su stepen diferentovanosti tumora, prisutvo i /ili odsustvo perineuralne i invazije vaskularnih struktura. Stepem proširenosti karcinoma prostate je među najvažnijim faktorima koji određuje prognozu bolesti i u velikoj meri zavisi od stepena angiogeneze.^{10,11} Cilj ovog istraživanja je proučavanje gustine mikrocirkulacije u adenokarcinomu prostate u uzorcima tkiva dobijenim iglenom biopsijom (core biopsy).

METODE

Istraživanjem je obuhvaćeno 45 pacijenata kojima je u dvogodišnjem periodu u poliklinici dr Vezmar u Kragujevcu urađena iglena biopsija prostate. Indikacija za biopsiju bio je suspektan digitalni rektalni nalaz, suspektan transrektalni ultrazvučni nalaz i/ili nivo serumskog PSA >4.0 ng/mL. Iglene biopsije tkiva prostate, kako je naznačeno u pratnicama za patohistološki pregled, uzimane su iz levog i desnog lobusa prostate, i njihov broj po pacijentu se kretao od 10 do 12 uzoraka tkiva. Dobijeni uzorci su u Centru za patološko anatomsku dijagnostiku Kliničkog centra Kragujevac, fiksirani u 4% neutralnom puferovanom formalinu, rutinski obrađivani, kalupljeni u parafinske blokove i arhivirani. Histopatološka dijagnoza karcinoma prostate postavljena je na rutinskim mikroskopskim preparatima, na kojima je istovremeno određen i Gleason score po standardizovanim procedurama. Nakon retrospektivne analize medicinskih protokola uzorci tkiva karcinoma prostate (PC) dobijeni iglenom biopsijom činili su ispitivanu grupu (n=25), dok su uzorci tkiva sa benignom hiperplazijom prostate (BHP) bili kontrolna grupa (n=20).

Histopatološko i imunohistohemijsko ispitivanje

Reprezentativni tkivni isecci debljine 3µm preneti na Superfrost+ predmetna stakla su najpre bili deparafinisani kroz seriju ksilola (4 puta po 5min), rehidratirani u seriji alkohola opadajuće koncentracije (3 puta po 5 min.), a zatim je urađeno demaskiranje antigena u citratnom puferu pH 6,0 u mikrotalasnoj pećnici. Nakon ispiranja u fosfatnom puferu (PBS pH 7.49), usledilo je blokiranje endogene peroksidaze u trajanju od 20min u 3% rastvoru vodonik peroksida (H₂O₂). Zatim je sledilo ispiranje u PBS-u, a potom inkubacija preko noći na 40°C sa primarnim anti CD105 antitelom (klon SN6h, DAKO, razblaženje 1:50) antitelom u vlažnoj komori. Obeleženi antigeni su nakon ispiranja bili inkubirani sa biotinisanim sekundarnim antitelom (Vectastain Elite ABC kit) 1 sat na sobnoj temperaturi. Ovo biotinisano antitelo reaguje sa avidinskim molekulima konjugovanim sa peroksidazom. Nakon ispiranja u PBS-u, usledila je vizualizacija pomoću diamino-benzidin-tetrahidrohlorid-a (DAB), koji je markirao mesta antigen-antitelo reakcije braon bojom, a zatim se uradilo kontrastno bojenje Mayer-ovim hematoksilinom. Negativne kontrole su izvedene zamenom primarnih antitela sa fosfatnim puferom (PBS).

Vrednovanje rezultata tkivne ekspresije

Gustina mikrocirkulacije (MVD), se računala brojanjem mikrovaskularnih Endoglin (CD105) pozitivnih struktura, tako što su na mikroskopskom uveličanju X 400 najpre selektovana mesta najveće mikrovaskularne gustine („vruće tačke“). Svaka pojedinačna ćelija ili polje obojeno imunohistohemijskim markerom je računato kao mikrovaskularna struktura. Za određivanje mikrovaskularne gustine je korišćen mnogonamenski testni sistem M42 po Weibel-u i merno polje od 0.016mm² na mikroskopu Olympus BH-2. Za ispitivanje gustine mikrocirkulacije po mm² je brojano sukcesivno po 5 „vrućih tačaka“. Apsolutna vrednost gustine pozitivnih vaskularnih struktura u „vrućoj tački“ je određivana stereometrijski.¹² Nakon dobijenih podataka o broju mikrovaskularnih struktura, za svakog pacijenta je izračunata medijana, u odnosu na koju su pacijenti podjeljeni u dve grupe: oni sa niskim stepenom angiogeneze (MVD u tumoru manja od vrednosti medijane) i oni sa visokim stepenom angiogeneze (MVD u tumoru veća od vrednosti medijane). Iz apsolutno određenih vrednosti gustine mikrocirkulacije u odnosu na odstupanje od medijane dobijen je indeks MVD (1+nizak ili 2+:visok mvd IDX)

Statistička analiza

Normalnost raspodele podataka testirana je grafičkim i računskim metodama. Od grafičkih metoda primenjeni su histogram i Q-Q detrendovani grafikon. Od računskih metoda primenjen je Kolmogorov-Smirnov test. Testiranje značajnosti razlike u vrednosti ekspresije Endoglina (CD105) u grupi sa karcinomom i grupi sa benignom hiperplazijom prostate, urađeno je pomoću Mann-Whitney U testa, dok je testiranje značajnosti razlike sledećim varijabli: godište, Gleason score, PSA, zapremina prostate između grupa sa niskim i visokim indeksom neoangiogeneze, kao i između grupe sa karcinomom i grupe bez karcinoma urađeno pomoću Studentovog t testa.

Statistička analiza je urađena pomoću SSPS 20.0 softvera. P vrednosti manje ili jednake od 0.05 su smatrane statistički značajnim.

REZULTATI

Prosečna starost ispitanika sa dijagnostikovanom karcinomom prostate bila je 71.3±6.7 godina (najmlađi je imao 58 a najstariji 84 godine), dok je u grupi sa hiperplazijom prostate prosečna starost iznosila 69.1±7.7 godina (najmlađi je imao 57 a najstariji pacijent 83 godine). Između ispitanika sa karcinomom i sa hiperplazijom prostate nije uočena statistički značajna razlika u starosnoj dobi (p>0.05). Prosečne vrednosti PSA su gotovo dva i po puta veća u grupi sa karcinomom u odnosu na grupu sa hiperplazijom prostate, što je statistički značajna razlika (p<0.05). Prosečna vrednost Gleason scor-a u grupi pacijenata obolelih od adenokarcinoma prostate je 7.7±1.2. Nije nađena statistički značajna razlika u volumenu prostate između grupe sa karcinomom prostate i grupe sa benignom hiperplazijom prostate (p>0.05) (Tabela 1).

Tabela 1. Odnos između Karcinoma prostate/Benigne hiperplazije i drugih kliničko-patoloških varijabli

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	p
Godine starosti						0.308
PC	25	58	84	71.3	6.8	
BPH	20	57	83	69.1	7.7	
GleasonScore						-
PC	25	6	10	7.7	1.2	
BPH	20	6	10	7.7	1.2	
PSA						0.006*
PC	25	4.40	111.30	25.63	23.63	
BPH	20	0.49	31.48	10.89	6.69	
Volumen Prostate - mm						0.994
PC	25	22.3	115.0	50.2	23.8	
BPH	20	22.0	99.5	50.2	21.8	

* signifikantno p≤0.05 Studentov t-test, N – broj slučajeva

Prosečna starost ispitanika sa visokim indeksom mikrovaskularne gustine je značajno veća u odnosu na ispitanike sa niskim indeksom mikrovaskularne gustine (74.5±6.4 naspram 68.2±6 godine, p<0.05). Srednja vrednost CD 105 pozitivnih ćelija po mm² kod obolelih od karcinoma prostate ima značajno veću vrednost u odnosu na srednju vrednost CD105 pozitivnih ćelija po mm² kod hiperplazije prostate (676.6 naspram 186.5, p<0.001). Gleason scor značajno je veći u grupi sa visokim indeksom mikrovaskularne gustine, u odnosu na nizak indeks neoangiogeneze (p<0.001). Prosečne vrednosti PSA, iako su veće u slučajevima visokog indeksa mikrovaskularne gustine prema niskom (oko 33 naspram 17), nisu bile i statistički značajno različite (p>0.05). Volumen prostate se statistički značajno ne razlikuje u grupama sa niskim i visokim indeksom mikrovaskularne gustine (Tabela 2).

Tabela 2. Odnos između nivoa ekspresije Endoglina i drugih kliničko-patoloških varijabli.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Strd. Deviation	p
Godine starosti						0.024*
LmvdIDX	12	58	77	68.2	6.0	
HmvdIDX	13	64	84	74.2	6.4	
GleasonScore						<0.001*
LmvdIDX	12	6	8	186.5	0.7	
HmvdIDX	13	8	10	676.6	0.8	
PSA						0.093
LmvdIDX	12	4.40	36.40	17.36	12.02	
HmvdIDX	13	7.42	111.30	33.26	29.21	
Volumen Prostate - mm						0.577
LmvdIDX	12	22.3	98.8	47.3	21.2	
HmvdIDX	13	32.0	115.0	52.8	26.6	

*signifikantno $p \leq 0.05$ Studentov t- test, N – broj slučajeva

DISKUSIJA

Karcinom prostate je najčešći maligni tumor u muškoj populaciji. Njegova incidenca raste sa starošću i najčešće se dijagnostikuje kod muškaraca starosti preko 60 godina.¹² U našem istraživanju najveći broj oboljelih je u 8 deceniji, što je u skladu sa nalazima iz literature.¹³

Zlatni standard za dijagnozu karcinoma prostate je biopsija. Indikacije za biopsiju su povišene vrednosti PSA i suspektan digitorektalni nalaz.⁷ Histološka potvrda dijagnoze karcinoma u core biopsijama prostate daje pouzdane informacije o stepenu diferentovanosti tumora, prisustvu perivaskularne i perineuralne invazije. Na osnovu ovih prognostičkih parametara moguće je predvideti biološko ponašanje tumora i primeniti adekvatan terapijski pristup.

Za ispitivanje angiogeneze odnosno mikrovaskularne gustine u tkivu karcinoma prostate smo koristili Endoglin (CD 105), koji je po svojoj strukturi transmembranski glikoprotein i sastavni je deo je TGF beta receptorskog kompleksa.¹⁴ Ima značajnu ulogu u tumorskoj angiogenezi, rastu, preživljavanju i metastaziranju tumorskih ćelija. Intenzivno ga ekspimiraju endotelne ćelije za vreme tumorske angiogeneze i inflamacije, dok ga vaskularni endotel slabo ili uopšte ne ekspimirira.^{15,16} U našem istraživanju je evidentirano da su apsolutne vrednosti CD 105 pozitivnih mikrovaskularnih struktura po jedinici površine tkiva značajno veće u karcinomu u odnosu na benignu hiperplaziju prostate. U skladu sa tim je i indeks mikrovaskularne gustine (mvdIDX) značajno veći u karcinomu prostate. Značajno povišen indeks mikrovaskularne gustine u karcinomu prostate je zapažen i od strane drugih autora, koji pokazuju da je

visok nivo vaskularne gustine u karcinomu prostate povezan sa lošim ishodom bolesti.^{17,18}

U našem radu je dokazano da je visok stepen indeksa mikrovaskularne gustine u analiziranim biopsijama karcinoma prostate značajno je veći u ispitanika čija je prosečna starost veća. Osim toga u ispitanika sa visokim indeksom mikrovaskularne gustine je zabeležen i značajno veći Gleason score u odnosu na ispitanike sa niskim indeksom mikrovaskularne gustine u tumorskom tkivu. Istraživanja o povezanosti mikrovaskularne gustine sa Gleason scorom su retka i često kontradiktorna. Erbersdobler i sar. su istakli značajnu povezanost mikrovaskularne gustine sa stadijumom tumora i Gleason scorom, ali postoje i studije u kojima nije dokazana statistički značajna povezanost između ova dva analizirana parametra.^{18,19}

Gleason-ov skor je najznačajniji prognostički faktor. Na osnovu vrednosti skora pacijenti se grupišu u zonu niskog rizika (skor od 2-4), visokog stepena rizika (skor od 8-10) i intermedijernu grupu srednjeg rizika (skor 5-7).²⁰ Pored prognostičkog bitan je i njegov prediktivni značaj gde njegova visoka vrednost ide u prilog povećanog rizika za nastanak lokoregionalnog i metastaskog karcinoma prostate nakon zračne i hormonalne terapije.²¹ Srednja vrednost Gleason score kod naših ispitanika iznosila je 7.7 i ukazuje da je karcinom prostate u ispitivanom uzorku u velikom broju slučajeva bio u uznapređovalom stadijumu.

Prostata specifični antigen je glikoprotein, koga sekretuju epitelne ćelije prostate. Porast nivoa PSA u cirkulaciji posledica je oštećenja bazalnih membrana žlezda i povećane vaskularizacije tkiva prostate. Određivanje serumskih vrednosti PSA u uzorcima periferne krvi muškaraca uvedeno je u kliničku praksu osamdesetih godina prošlog veka.²¹ Uvođenjem ovog testa je omogućeno da se karcinom prostate dijagnostikuje u ranoj fazi bez obzira na starost bolesnika.²² Brojne studije pokazuju da učestalost karcinoma prostate poslednjih godina značajno raste što se dovodi u vezu sa širokom upotrebom PSA (prostate-specific antigen) dijagnostičkog testa. Analiziranjem nivoa PSA u naših ispitanika sa karcinomom i sa benignom hiperplazijom prostate uočili smo da su značajno više vrednosti PSA izmerene u ispitanika sa karcinomom prostate. Odavno se zna da povišene serumske vrednosti PSA predstavljaju biohemijski pokazatelj ne samo karcinoma prostate, već i traume, prostatitisa kao i benigne hiperplazije prostate. Upoređivanjem dobijenih rezultata nije dokazana statistički značajna razlika između povišenih vrednosti PSA i indeksa mikrovaskularne gustine, što je u skladu sa već objavljenim podacima.²³

Naši rezultati pokazuju da ekspresija CD105 i indeks mikrovaskularne gustine u iglenim biopsijama karcinoma prostate mogu biti značajni prediktorni i prognostički pokazatelj ovog tumora. Međutim, zbog velike heterogenosti

metodoloških pristupa, otežana je prava procena ekspresije CD105 u prognostičke svrhe, pa su neophodna dalja istraživanja u cilju pronalazanja i sprovođenja antiangiogenezne terapije.

REFERENCE

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 2013;(49): 1374-1403.
2. Feletto E., Bang A., Cole-Clark D., Chalasani V., Rasiah K., Smith D.P. An examination of prostate cancer trends in Australia, England, Canada and USA: is the Australian death rate too high? *World J Urol.* 2015; (33): 1677–1687.
3. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol.* 2012; (4): 1–11
4. Bray F., Jemal A., Grey N., Ferlay J., Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2012; 13: 790–801
5. Di Sebastiano KM, Mourtzakis M. The Role of Dietary Fat throughout the Prostate Cancer Trajectory. *Nutrients.* 2014; 6(12): 6095-6109
6. Drake I, Sonestedt E, Gullberg B, Ahlgren G, Bjartell A, Wallström P et al. Dietary intakes of carbohydrates in relation to prostate cancer risk: a prospective study in the Malmö Diet and Cancer cohort. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96(6): 1409-1418.
7. Catalona, William J. "Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men." *The Journal of urology* 2017; (197): S200-S207.
8. Tyloch JF, Wiczorek AP. The standards of an ultrasound examination of the prostate gland. Part 1. *Journal of Ultrasonography.* 2016; 16 (67): 378-390.
9. Dell'Atti L. Can transrectal ultrasound-guided biopsy of the prostate with extended 14-core scheme improve the predictive accuracy of Gleason score and tumor site in prostate cancer treatment? *J BUON.* 2015; 20(5): 1239-1243.
10. Romero D, O'Neill C, Terzic A. Endoglin regulates cancer-stromal cell interactions in prostate tumors. *Cancer research.* 2011; 71(10): 3482-3493
11. Miyata, Yasuyoshi, et al. "Pathological significance and prognostic role of microvessel density, evaluated using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy." *The Prostate* 2015; (75): 84-91
12. Ferlay JSI, Ervik M, Dikshit R, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013.
13. Ji G, Huang C, Song G, et al. Are the Pathological Characteristics of Prostate Cancer More Aggressive or More Indolent Depending upon the Patient Age? *BioMed Research International.* 2017;1438027
14. Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. "ENG (endoglin)". *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.*
15. Altomonte M, Montagner R, Fonsatti E et al. "Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma". *British Journal of Cancer.* 1996; (10): 1586–1591.
16. Saad RS, Jasnosz KM, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol,* 2003; (22): 248-253
17. Coston WMP, Loera S, Lau SK, et al. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2008; (32) : 433-44.
18. Łuczyńska E, Gasińska A, Wilk W. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor in clinically localized prostate cancer. *Pol J Pathol.* 2013; (1): 33-38
19. Erbersdobler A, Isbarn H, Dix K, et al. Prognostic value of microvessel density in prostate cancer: a tissue microarray study. *World J Urol* 2010; (28): 687-692
20. Lau WK, Bergstralh EJ, Blute ML, Slezak JM, Zincke H. Radical prostatectomy for pathological Gleason 8 or greater prostate cancer: influence of concomitant pathological variables. *J Urol,* 2002;(167): 117-122
21. EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Advanced, Relapsing, and Castration-Resistant Prostate Cancer, Heidenreich, Axel et al. *European Urology* 2011; (2): 467 – 479
22. Klein EA, Platz EA, Thompson IM. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Kavoussi LR, Novic AC, Partin AW, Peters CA, eds. *Campbell-Walsh Urology.* Philadelphia: Saunders; 2007. pp.2854-2873.
23. G Di Lorenzoli S, De Plasidol, R Autorino, M De Laurentiis, C Mignoga, M D Armiento et al. Expression of biomarkers modulating prostate cancer progression: implication in the treatment of the disease. *Prostate Cancer and Prostate Disease.* 2005; (8): 54-59.