

A prosztatata zónáinak összehasonlítása a sejtdifferenciálódás tükrében

Doktori értekezés

Dr. Laczkó István

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyirády Péter egyetemi docens, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Berczi Csaba egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Borka Katalin egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kelemen Zsolt egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Riesz Péter egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Kiss András adjunktus, Ph.D.

Budapest
2011

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	5
3. Bevezetés	8
3.1. A prosztatata betegségeinek összefüggései	8
3.1.1. A prosztatarák	9
3.1.2. A benignus prosztatata hyperplasia.....	10
3.1.3. A prosztatata gyulladós betegségei.....	11
3.2. A prosztatata anatómiája, hisztológiája és fiziológiája.....	11
3.3. A prosztatata mikrostruktúrája.....	15
3.4. A prosztatata szekretoros funkciója	16
3.5. A prosztatata hámrétege, és annak fejlődése, differenciálódása.....	17
3.5.1. A CD44 mint prosztatata epithelium differenciálódási sejtmarker.....	22
3.6. Össejt modellek az alapkutatásban	23
3.6.1. A prosztatata össejt teória	24
3.6.2. Az össejt elmélet jelentősége a prosztatata betegségeinek értelmezésében.....	25
4. Célkitűzések	30
5. Módszerek	32
5.1. Anyagok.....	32
5.2. Immunhisztokémia.....	34
5.2.1. TUNEL teszt	37
5.3. Pontozási rendszer és statisztikai vizsgálatok.....	38
6. Eredmények	39
6.1. Morfológiai elemzés	39
6.2. Citokeratin expresszió.....	40

6.2.1. Citokeratin festés – bazális markerek	40
6.2.2. Citokeratin expresszió – luminális sejtek.....	41
6.2.3. A luminális és bazális sejtek aránya	42
6.3. Neuroendokrin markerek	42
6.4. Funkcionális markerek vizsgálata.....	44
6.5. Zónára jellemző markerek	45
6.6. Mesenchymális sejtmarkerek.....	47
6.6.1. Androgén receptor expressziója a stromában	47
6.6.2. Az SMA, dezmin és vimentin expresszió a stromában.....	48
6.7. Sejtkinetikai markerek	50
6.8. CD44 expresszió a prosztatában	52
7. Megbeszélés	54
7.1. A bazális és luminális sejtek az epitheliumban.....	54
7.2. Neuroendokrin sejtek a prosztatában	54
7.3. A zonális markerek jelentősége	55
7.4. A zónák és a vesicula festésének klinikai jelentősége	57
7.5. Sejtkinetikai eltérések	58
7.6. A CD44 expresszió vizsgálata a sejt differenciálódás folyamatában	59
8. Következtetés.....	62
8.1. A prosztata zonális anatómiája szövettani elemzés alapján.....	62
8.2. A citokeratin expresszió a prosztatában és a vesicula seminalisban.....	62
8.3. A prosztata zónái a zonális markerek tükrében	63
8.4. A funkcionális markerek szerepe.....	63
8.5. Az utriculus prostaticus különleges megjelenése	64
8.6. A mesenchyma sejtjei	64
8.7. Sejt differenciálódási markerek a zónák között.....	65
8.7.1. Citokeratin expresszió a zónák epitheliumában.....	65

8.7.2. Neuroendokrin markerek eltérései a zónákban	65
8.7.3. CD44 expressziós eredményeink	66
8.8. A proliferáció és az apoptózis eltérései	66
9. Összefoglalás	68
10. Summary	69
11. Irodalomjegyzék	70
12. Saját publikációk jegyzéke	85
13. Köszönetnyilvánítás	86

2. Rövidítések jegyzéke

ABC	Avidin-Biotin Complex (avidin-biotin komplex)
ABC-AP	Avidin-Biotin Complex – Alkaline Phosphatase (ABC –alkalikus foszfatáz)
AFS	Anterior Fibromuscular Stroma (elülső fibromuscularis stroma)
AML	Acute Myeloid Leukemia (akut myeloid leukémia)
AR	Androgén Receptor
AR+	Androgén Receptort expresszáló
AR-	Androgén Receptort nem expresszáló
ATP	Adenosin Tri-Phosphate (adenozin-trifoszfát)
bcl-2	B-cell lymphoma 2 (B-sejt limfóma 2)
BPH	Benignus Prostatata Hyperplasia (jóindulatú prosztatata megnagyobbodás)
BNO	Betegségek Nemzetközi Osztályozása
CCD	Charge-couple Device (töltés csatolt eszköz)
CD	Cluster of Designation/Differentiation (differenciálódási csoport)
ChrA	Chromogranin A
CK	Citokeratin
CO ₂	szén-dioxid
CT	Computer Tomographia
CZ	Centrális Zóna
DAB	Diamino-benzidine
DE	Ductus Ejaculatorius
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DPX	Dystirene, Plasticizer, Xylene (disztirén, sűrítő, xilol)
DU	Distalis Urethra
dUTP	desoxi-Uridin-Triphosphate (dezoxi-uridin-trifoszfát)
EAU	European Association of Urology (Európai Urológus Társaság)
EB	Eosinophilic Body (eozinofil testek)
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermális Növekedési Faktor)
ER	Estragen (ösztrogén) Receptor
ET _A	Endothelin Receptor A

ET _B	Endothelin Receptor B
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GSTpi	Glutathion S-transferase pi
HGF	Hepatocita Growth Factor (Hepatocita növekedési faktor)
HRP	Horseradish Peroxidase (torma peroxidáz)
H&E	Hematoxilin és Eozin
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunohistochemistry (Immunhisztokémia)
K	Keratin=citokeratin
KSH	Központi Statisztikai Hivatal
MRI	Magnetic Resonance Imaging (mágneses rezonancia vizsgálat)
NE	Neuroendokrin
NEG	Negatív
NOD	Non-obese Diabetic (nem elhízott cukorbeteg)
NSE	Neuron Specific Enolase (neuron specifikus enoláz)
N/A	Nincs adat
PAP	Prostatic Acid Phosphatase=PSAP (prosztatikus savanyú foszfatáz)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Foszfáttal pufferelt sóoldat)
PCa	Prostate Cancer (prostatarák)
PIN	Prostatic Intraepithelial Neoplasia (prostataikus interepitheliális neoplázia)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen (Osztódó sejtmagi antigén)
PNA	Peanut Agglutinin (mogyoró agglutinin)
PrE2.8	BPH immortalizált sejtvonal
PrEGM	Prosztata epithelium sejtkultúra médium
PSA	Prosztata Specifikus Antigén
PSAP	Prostate Specific Acid-Phosphatase=PAP (prostataikus savanyú foszfatáz)
PSG	Prostate Secretory Granule (prostata kiválasztó szemcse)
PSMA	Prostate Specific Membrane Antigen (prostata specifikus membrán antigén)
PU	Proximális Urethra
PZ	Perifériás Zóna

RET	Receptor Tyrosine Kinase proto-oncogene (tirozin-kináz proto-onkogén)
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (súlyos kombinált immunhiány)
SEM	Standard Error of Mean (az átlag szórása)
SMA	Smooth muscle α -actin (simaizom aktin)
SNA	Sambucus Nigra Lectin
SV	Seminal Vesicle (vesicula seminalis – ondómirigy)
SV40	Simian Virus 40
S-WGA	Succinyl-Wheat Germ Agglutinin
TdT	Deoxynucleotidyl-Transferase (dezinukleotidil-transzferáz)
Thy-1	Thymocyta 1 antigen
tPA	tissue Plasminogen Activator
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
TURP	Transurethral Resection of Prostate (húgycsőön keresztüli prosztatata rezekció)
TUNEL	Terminal d-UTP Nick End Labelling
TZ	Tranzicionális Zóna (Átmeneti zóna)
UCL	University College London
VS	Vesicula Seminalis (Ondóhólyag)

3. Bevezetés

3.1. A prosztata és betegségeinek összefüggései

Az idősödő férfiakat leggyakrabban befolyásoló egészségügyi eltérés a prosztatában (dűlmirigy) jelentkezik: a jóindulatú prosztata megnagyobbodás (benignus prosztata hyperplasia; BPH) és a prosztaták. A prosztatán belül négy terület található, mely betegségekre fogékonysága különböző. A prosztata perifériás zónájában gyakrabban fordul elő prosztaták, míg a BPH az átmeneti (tranzicionális) zónában fejlődik ki. A funkcionális és molekuláris háttere ezeknek az eltéréseknek nem tisztázott. A betegségek (prosztaták, BPH) hátterének pontos megértéséhez szükségünk van a normális prosztata anatómiájának, felépítésének, működésének és fejlődésének pontos ismeretére.

A prosztata négy különböző régióra osztható fel, melyeket McNeal zónáknak nevezett. A négy zóna a perifériás, az átmeneti (tranzicionális), centrális és az elülső fibromuscularis zóna.

A prosztata zónáinak eltérései hátterében lehetséges embriológiai ok. A prosztaták ritkán fejlődik a centrális zónában és elvétve fejlődik ki rák a vesicula seminalisban. Mivel a vesicula seminalis a Wolf-csőből származik, hasonlóan fejlődhet a centrális zóna is a Wolf-csőből, magyarázatot adva a két szöveti struktúra hasonló biológiai viselkedésére. Ezekkel ellentétben a prosztata többi része a sinus urogenitalisból alakul ki.

A prosztata jelenleg széles körben elfogadott anatómiai modellje McNealtól származik (McNeal 1981a, 1981b, Villers és mtsai 1991, Selman és mtsai 2011). Az anatómiai modell pontosabban írta le a prosztata szövettani szerkezetét, mint a korábbi modellek (Lowsley 1912, LeDuc 1939, Gil Vernet 1953, Franks 1954). A McNeal szerinti anatómiai modell helyességét számos hisztokémiai, fehérje expressziós és szövettani vizsgálat (Arenas és mtsai 1999, Chan és mtsai 1999, Colombel és mtsai, 1998, Kobayashi és mtsai 1991, 1994; Krill és mtsai 2001, Leav és mtsai 2001, McNeal és mtsai 1988a, Reese és mtsai 1986, 1988, 1992, Santamaria és mtsai 2002, Tsurusaki és mtsai 2003), valamint CT, MRI és egyéb diagnosztikai (Hricak és mtsai 1987, Koslin és mtsai 1987, Mirowitz és mtsai 1992, Sommer és mtsai 1986, Villers és mtsai, 1990) és hisztopatológiai vizsgálatok (Colombo és mtsai, 2001; Erbersdobler és mtsai, 2002a,

2002b, Grignon és mtsai 1994, Lee és mtsai 1991, McNeal 1968, McNeal és mtsai, 1988b, Van de Voorde és mtsai 1995) igazolták.

3.1.1. Prosztatárak

A prosztatatarák (PCa – prostate cancer, carcinoma prostatae) a nyugati típusú társadalmakban jelentős népegészségügyi problémát jelent. A prosztatatarák elsősorban az időskor betegsége, diagnózisának időpontjában a férfiak átlagosan 67 évesek. A prosztatatarák incidenciája a 2000 és 2008 közötti időszakban az Egyesült Államokban csökkenő tendenciát mutatott (-1.9%/év). 2008. január 1-én az Egyesült Államokban kb. 2.355.000 férfi élt, akinek már diagnosztizálták a prosztatatarákot ([www.seer.cancer.gov/statfacts.html/prost.html](http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html)). A prosztatatarák mortalitása mind Európában, mind az Egyesült Államokban csökkenést mutatott az utóbbi 15 évben (Holmberg és mtsai 2011, Berrino és mtsai 2007, Collin és mtsai 2008). Európa minden régiójában hasonló trendeket figyelhetünk meg, de az országok között jelentősek a különbségek (Brenner és mtsai 2009).

A prosztatatarák Magyarországon is jelentős népegészségügyi probléma. A Nemzeti Rákregiszter adatait a hazai jelentési rendszer helytelen módja (nem megfelelő BNO [Betegségek Nemzetközi Osztályozása] kódok lejelentése) miatt fenntartásokkal kell fogadjuk (Döbrössy és mtsai 2007, Ottó és mtsai 2005). A KSH adatai szerint a prosztatatarák halálozása Magyarországon a 3-4. helyet foglalja el (Döbrössy és mtsai 2007) a férfiakban, mindkét nemet tekintve a nyolcadik leggyakoribb daganatos halálok (Ottó és mtsai 2005).

A prosztatatarák túlélést befolyásoló tényezők a korai diagnózis (PSA használatával), diagnosztikus aktivitás fokozása agresszív prosztata biopszia révén, új sebészeti és radioterápiás módszerek alkalmazása (Romics 2010, Eden és mtsai 2007), a szisztémás kezelési eljárások használata és a kezelési eljárás indikációs területének kiszélesítése (Holmberg és mtsai 2011). Ezeknek a faktoroknak a súlya a prosztatatarák túlélésre nem tisztázott. Tekintve, hogy egy országban mérhető prosztatatarák incidencia erősen korrelál a túléléssel (de a mortalitással nem szükségszerűen) a korai rákdiagnózisnak jelentős szerepe lehet (Holmberg és mtsai 2011).

Számos tanulmány igazolta, hogy a prosztatatarák elhelyezkedése jelentősen befolyásolhatja a betegség lefolyását. A tranzicionális zónában elhelyezkedő daganatok Gleason score értéke és klinikai stádiumbeosztása alacsonyabb a felfedezéskor, mint a

perifériás zónában elhelyezkedő daganatok esetén. Az átmeneti zóna daganatainak kuratív kezelése után a biokémiai relapsusig eltelt idő hosszabb, mint a perifériás daganatok műtéti megoldása után (van der Kwast és mtsai 2011, Noguchi és mtsai 2000, Erbersdobler és mtsai 2002a, 2002b, Shannon és mtsai 2003, Greene és mtsai 1995).

A prosztata adenocarcinoma predominantán lüminális fenotípussal rendelkező sejtekből áll (CK8, CK18, PSA pozitivitás) és ezek között a sejtek között elszórva neuroendokrin sejtek találhatóak. A bazális réteg eltünése a neoplasztikus fókuszokban a betegség egyik kulcsponjtja. A 34βE12 antitest reaktivitást (anti-CK1, CK5, CK10, CK14) ezért gyakran alkalmazzák, hogy a benignus atípusos léziókat és az adenocarcinómát elkülönítsék. Ezen megfigyelések alapján is általános nézet, hogy a prosztatarák a lüminális sejtekből fejlődik ki. Az utóbbi évtizedekben azonban számos kutató nagy molekulatömegű citokeratin expressziót mutatott ki prosztatadaganatokban. A nagy molekulatömegű citokeratinok (pl. CK5, CK14) általában a bazális sejtekben expresszálódnak a normális prosztatában. Több primer prosztatarákban CK5 expressziót (Verhagen és mtsai 1992) és prosztataáttétek több mint 54%-ban pedig 34βE12 expressziót mutattak ki (Googe és mtsai 1997, Yang és mtsai 1999b). Leenders és mtsai (Leenders és mtsai 2001) a CK5, CK14, CK18 és chromogranin A expresszióját vizsgálta prosztatarák metasztázisban és hormon rezisztens prosztatarák szövetben. A leggyakoribb sejtípus a CK18 pozitív lüminális fenotípusú sejt volt, majd a chromogranin A pozitív neuroendokrin sejtek következtek. A harmadik sejtípus a CK5 pozitív és CK14 negatív sejt volt (van Leenders és mtsai 2001). Érdekes módon CK5 expresszáló sejteket is talált a nyirokcsomók közeli erekben lévő tumorthrombusokban. Továbbá a hormon rezisztens daganatokban a CK5+ sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a hormon dependens daganatokhoz képest. Az utóbbi vizsgálatok is bizonytalanná tették a prosztatarák kiindulási sejtjének pontos meghatározását.

3.1.2. Benignus prosztata hyperplasia (BPH)

A BPH az idősödő férfiak leggyakoribb betegsége Magyarországon. A járóbeteg szakellátáson belül orvoshoz forduló, a 65 év feletti férfiak közel 10%-a (53.000 fő) BPH tünetei miatt jelentkezett az urológusnál a KSH 2004-ben közzétett adatai alapján. E betegek közül 10% (6.432 fő) kórházi ellátásban is részesült, míg az összesetszám 90%-át az orvosok gyógyszeresen kezelték járóbeteg ellátás keretén belül (Giczi és

Sághi 2004). Bár az alsó húgyúti tüneteknek egyéb okai is lehetnek, a leggyakoribb ezek közül a BPH (Romics 2010b).

McNeal demonstrálta, hogy a prosztatata hyperplasia prosztatata periurethrális területéről vagy a tranzicionális zónából ered. Az átmeneti zóna a preprostatikus sphincter külső részén helyezkedik el, és két független mirigyből áll. Eddigi megfigyelések szerint a BPH ebben a két területben dominál (McNeal és mtsai 1978, 1990). A kor előrehaladtával a tranzicionális zóna is növekszik, de nem feltétlenül fejlődnek ki benne nodulusok.

A prosztatata hyperplasia kialakulásának területi eltérései a prosztatában nem tisztázottak.

3.1.3. A prosztatata gyulladós betegségei (prostatitis)

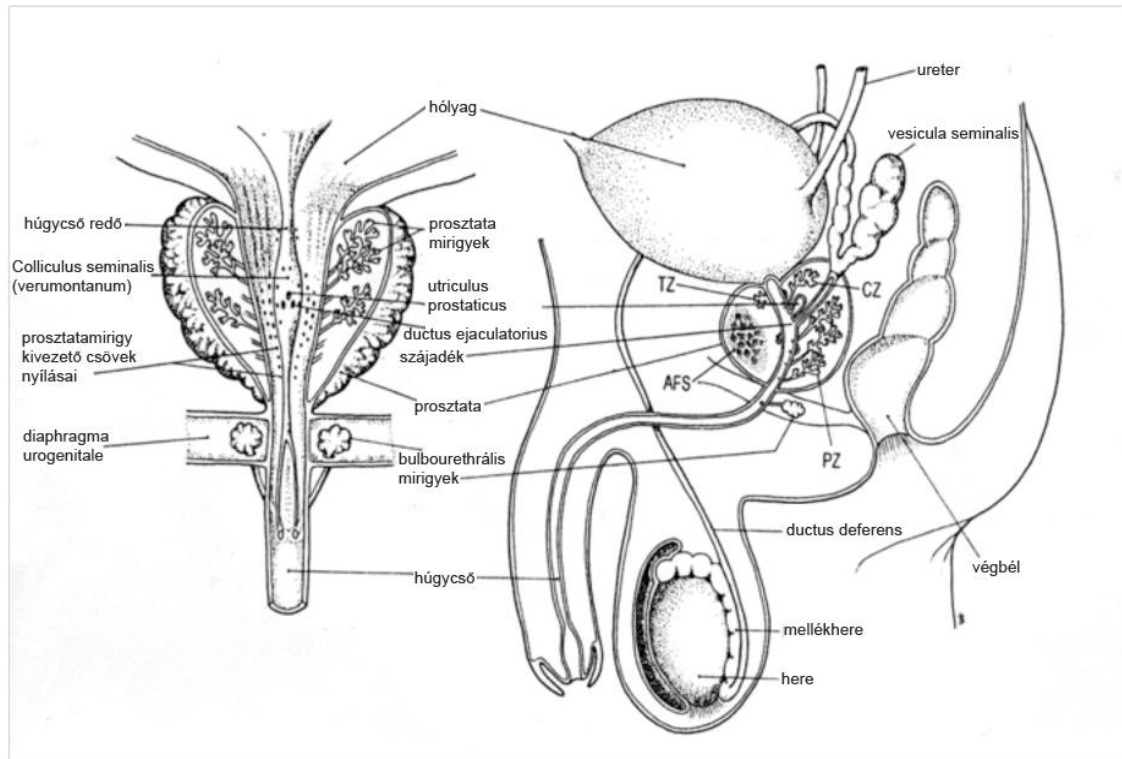
Az urológia számára manapság is nagy kihívást jelent a prosztatata gyulladós betegségeinek kezelése. Az Egyesült Államokban évente kb. 2 millió férfi fordul orvoshoz prostatitis-szel. Az 50 év alatti férfiakban a leggyakoribb urológiai eltérés a prosztatata gyulladós megbetegedése, ill. 50 év felett a BPH és a prostaticus adenoma után a harmadik leggyakoribb eltérés. A férfiak 2-10%-nak van prostatitis-szerű tünete, és a férfiak kb. 9-16%-a esik át élete során prostatitis-en. (Moon és mtsai 1997, McNaughton Collins és mtsai 1998).

A prosztatata perifériás zónájában a fokális gyulladós folyamatok gyakoriak, míg a centrális zóna rezisztens a gyulladós elváltozásokra (McNeal és mtsai, 1981). A perifériás zónában lezajló gyulladások extenzív atrophiahoz és hegesedéshez vezetnek (McNeal és mtsai, 1968).

3.2. A prosztatata anatómiája, hisztológiája és fiziológiája

A prosztatata a húgy- és ivarrendszer szerve. Külső elválasztású mirigy, melynek váladéka a sperma fontos összetevője. A prosztatata pontos működését még a mai napig nem sikerült teljesen tisztázni. A prosztatata által termelt secretum az ejaculatum fontos alkotóeleme. A sperma mennyiségének kb. 20-25%-át alkotja a prosztatata által termelt nedv (Aumüller és mtsai 1990a). A sperma nem sejtes összetevőinek nagy részét a vesicula seminalis és a prosztatata szekrétuma adja, míg a sejtes elemeket a herék termelik. A nem sejtes összetevőknek vélhetően az a feladata, hogy a megtermékenyítés

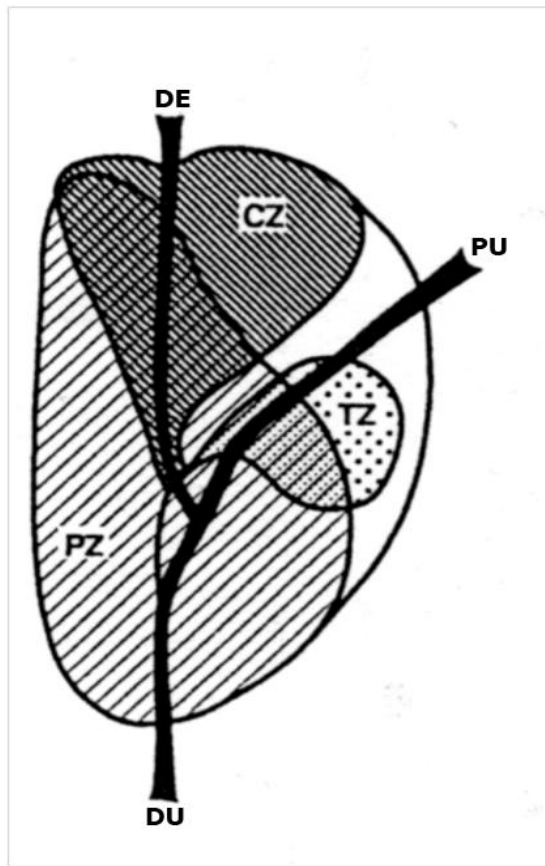
során a spermiumokat védve és támogatva a megtermékenyítést elősegítse. Fontos megjegyezni, hogy bár a nem sejtes elemeknek igen fontos feladata van elméleteink szerint, a nem sejtes elemek egyik komponenséről sem sikerült eddig igazolni, hogy hiányában a megtermékenyítés sikertelen lenne.



1. Ábra. A prosztata anatómiai helyzete: frontális és sagittalis metszet. Centrális zóna (CZ), perifériás zóna (PZ), tranzicionális zóna (TZ) és az elülső fibromuscularis stroma AFS (Timms és mtsai 1994).

Fiatal férfiakban a prosztata mérete $20\text{ml} \pm 6$ és súlya kb. 10-15g. A prosztátát mirigyes és fibromuscularis elemek alkotják. A prosztata a hólyag alatt helyezkedik el a húgycsővet körülvéve (1. ábra). A prosztata anatómia szerkezete sokáig vita tárgya volt a patológusok, anatómusok és klinikusok között. A prosztata anatómiai szerkezetét először Lowsley írta le 1912-ben. Azóta többen is foglalkoztak a prosztata szerkezetének tanulmányozásával és számos anatómiai modell született. A prosztata jelenleg is széles körben elfogadott modelljét McNeal írta le több művében (McNeal 1968, 1978, 1980, 1981a, 1981b, 1984, McNeal és mtsai 1988). McNeal írta le munkáiban először a prosztata szövettani heterogenitását. Munkáiban leírta a prosztata négy területét, melyeket zónáknak nevezett el elhelyezkedésük szerint (2. ábra). Megfigyelésének alapja több száz prosztata feldolgozása, szövettani és embriológiai

tanulmányozása volt. A prosztatata 2/3-a mirigyeket tartalmaz, míg 1/3 része mirigymentes terület.



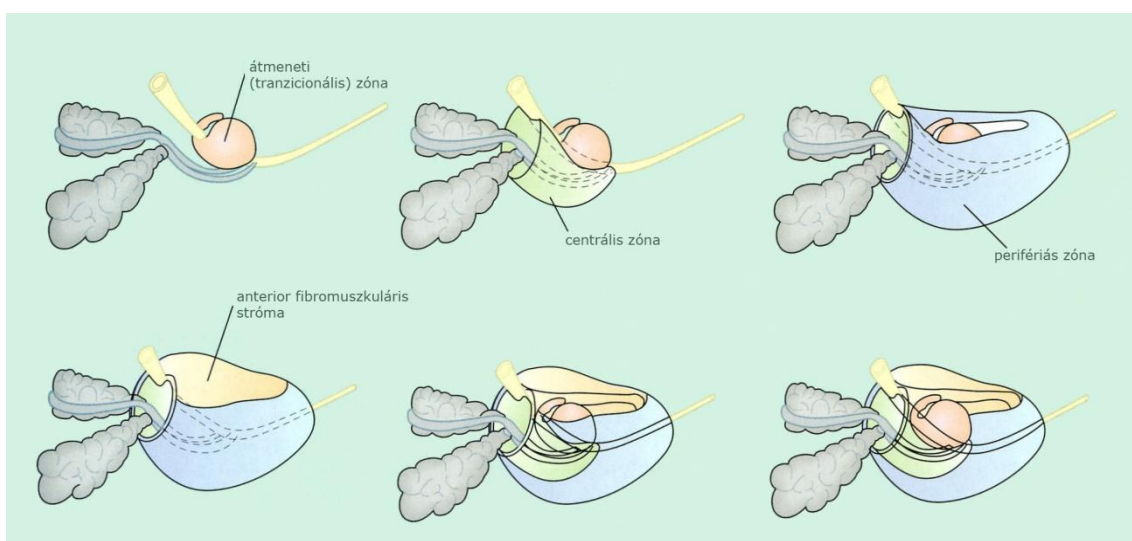
2. Ábra Az emberi prosztatata sagittalis átmetszete. A distalis (DU) és proximalis húgycső (PU), valamint a ductus ejaculatorius (DE) elhelyezkedése a prosztatata zónáihoz viszonyítva [CZ – centrális zóna, PZ – perifériás zóna, TZ – tranzicionális zóna; (McNeal és mtsai 1988)].

A húgycső prostatikus részét (pars prostatica urethrae) a verumontanum (colliculus prostaticus) két részre osztja. A proximális rész a hólyagnyaktól a verumontanumig míg a distalis szakasz a verumontanumtól a külső sphincterig húzódik. A két húgycsőszakasz 35 fokos szöveget zár be egymással. A verumontanum teljes egészében a distalis szakaszban foglal helyet. A ductus ejaculatoriusok a verumontanumon nyílnak a húgycsőbe. Egy henger alakú simaizomból álló gyűrű veszi körül a húgycsővet a verumontanum felső szélétől a hólyagnyakig, melyet preprostatikus sphincternek nevezett. A preprostatikus sphincter a hólyagnyaki belső sphincterrel együtt a kontinencia megőrzésében és a retrográd ejakuláció megakadályozásában játszik szerepet.

A normál prosztata négy részre osztható fel, melyek igen szorosan fekszenek egymáshoz (3. ábra). A zónák mirigyei a húgycső meghatározott részén helyezkednek el, amelyek a zónák elnevezésének alapját képezik, és a McNeal-i anatómia referencia pontjaiként szolgálnak. A prosztata három zónája, a centrális zóna, az átmeneti zóna a perifériás zóna tartalmazza a mirigyeket, míg az elülső fibromuscularis terület simaizom-elemekben gazdag régió és mirigyeket nem tartalmaz.

McNeal részletesen leírta a négy zóna szövettani szerkezetét is. A három mirigyes zóna a húgycső megfelelő területére vezeti váladékát.

A centrális zóna kúp alakú terület, mely a ductus ejaculatoriusoknak a prosztatán áthaladó szakasza körül helyezkedik el. A verumontanum és a prosztata bázisa között terül el, a húgycsővel csak kis területen érintkezik. A centrális zóna a normál fiatalkori prosztata kb. 25%-át foglalja el. A prosztatarákok 1-5 %-a ered ebből a zónából. Szövettanilag szabálytalan szélű, relatíve nagy, kerek mirigyekből áll. A centrális zóna mirigyeinek hámjá kockára hasonló alakú, szögletes alapú és oszlopos szerkezetű. A sejtek citoplazmája granulált, a sejtmagok nagyok, laza szerkezetűek és halványak. A sejtek magjai a bazális membrántól különböző magasságokban helyezkednek el. A zóna simaizom elemei bőségesek és szorosan egymás mellé rendezettek. A mirigyek a verumontanumra ürülnek a húgycsőbe a ductus ejaculatoriusok nyílása mellett. A centrális zóna szövettani szerkezete nagyon hasonlít a vesicula seminalis szövettani szerkezetére. Többek között erre vezethető vissza, hogy McNeal közös embriológiai eredetet feltételezett, ami szerint valószínűleg a Wolff-csőből származik a prosztata centrális zónája és a vesicula seminalis is.



3. Ábra A McNeal által leírt zónák elhelyezkedése a húgycső körül, szürkével ábrázolva látható a vesicula seminalis (McNeal 1978).

A perifériás vagy széli zóna a prosztatata hátsó és oldalsó területét alkotja, és mezodermás eredetű. Körülöleli a centrális zónát és a prosztatata csúcsától egészen a prosztatata bázisáig a prostatolateralis területet adja. A normál fiatalkori prosztatata legnagyobb részét ez alkotja, a prosztatata megközelítőleg 70%-át ez a zóna foglalja el. A perifériás zóna szövettani szerkezetére kicsi, kerek mirigyek jellemzőek. A mirigyeket magas, oszlopos szekretoros sejtek alkotják. A sejtek citoplazmája világos, a kicsi, sötétén festődő sejtmagok a bazális membrán közelében helyezkednek el. A mirigyeket körülvevő simaizom elemek sokkal lazábban helyezkednek el a stromában. A perifériás zóna mirigyeinek ductusai a pars prostatica distalis részébe nyílnak a verumontanum két oldalán. A prostatatárakok kb. 70%-a ered ebből a zónából.

A tranzicionális vagy átmeneti zóna a verumontanum környékén a húgycső körül elhelyezkedő mirigyterület. A fiatalkori prosztatata kb. 5%-át foglalja el és a húgycső két oldalán két teljesen szimmetrikusan elhelyezkedő lobulusból (lebeny) áll. A mirigyek kivezető csövei a verumontanum két oldalán a húgycsőbe nyílnak. Szövettanilag ezek a mirigyek a perifériás mirigyek szerkezetével azonosak. A mirigyeket körülvevő stroma szerkezete azonban a centrális zónához hasonlít: a simaizom elemek sűrűn egymás mellé rendezett rostokat alkotnak. Az átmeneti zónában a prostatatárakok kb. 20%-a ered. Ebből a zónából indul ki a jóindulatú prosztatata megnagyobbodás (BPH) (McNeal 1984).

A mirigyeket nem tartalmazó elülső fibromuscularis stroma (anterior fibromuscular stroma – AFM) a prosztatata térfogatának kb. 1/3-át foglalja el. Ez a rész borítja a prosztatata elülső felszínét. Ez a terület veszi körbe a prostatatát proximálisan a hólyagnyagnál. A terület simaizomrostokból és harántcsíkolt izomrostokból áll, számos elasztikus rostot, kollagén rostot és fibroblastot tartalmazó kötőszövetes állománnyal együtt. Ennek az elülső fibromuscularis résznek a funkciója valószínűleg ejakulációkor a sperma kiürülésének elősegítése lehet.

3.3. A prosztatata mikrostruktúrája

A prosztatata állományát mirigyekre és stromára lehet felosztani. A mirigyhámban legalább három sejtípust különböztetünk meg: luminális sejtek, bazális sejtek és neuroendokrin sejtek. Az intermedier sejtek a luminális és bazális sejtek között állnak differenciálódás szempontjából, elkülönítésük csak speciális immunhisztokémiai (IHC) festéssel lehetséges. A stroma egy átfogó elnevezés, mely a prosztatata nem mirigyterületet

elemekre utal. A stroma magában foglalja a prosztatában lévő kötőszövetet, simaizomszövetet, ereket, nyirokereket és a neuronokat. A kötőszövet a sejtekből és az általuk termelt sejtközötti állományból (extracelluláris mátrix) áll. A leggyakoribb sejttípusok a kötőszöveti sejtek (myofibroblastok, fibroblastok) és a simaizomsejtek (1. táblázat).

1. Táblázat. A prosztatában előforduló leggyakoribb sejtek immunhisztokémiai jellemzői.

Sejttípus	Immunhisztokémiai jellemző
Luminális (epithelium)	PSA, PAP, AR, K8, K18
Bazális (epithelium)	K5, K14, CD44
Intermedier sejtek (epithelium)	K5, K15, K17, K19
Neuroendokrin (epithelium)	Chr-A, szerotonin, CD56, NSE
Simaizomsejt	α -aktin, dezmin, vimentin
Myofibroblast	vimentin, α -aktin
Fibroblast	vimentin

3.4. A prosztata szekretoros funkciója

A prosztata szekretoros funkciója sokáig nem volt tisztázott a fixáló eljárásoknak köszönhetően. A konvencionális formalinos fixálás során a prosztata szekretoros granulái és azok luminális termékei megsemmisülnek. A prosztata apokrin funkciójának pontos ismerete csak a glutáraldehid bázisú fixáló használatával valósulhatott meg (Cohen és mtsai 1998). A prosztata kiürülésre kész szekretoros sejtorganeluma a prosztata szekretoros granula (PSG), melyek a luminális sejtek lumen felőli 1/3-ban, annak apikális részén helyezkednek el. A granulák erősen eozinofil festődést mutatnak, 1 μ m átmérőjűek, megközelítően gömb alakúak. Ezek a granulák tartalmazzák a prosztata által szekretált anyagokat, pl. PSA, PAP, keratán-szulfát, spermin, spermidin, stb. Az eozinofil festődés a nagy mennyiségben jelen lévő poliaminoknak tulajdonítható. Az endoplazmatikus retikulumban (ER) elkészült szekretoros fehérjéket a Golgi apparátus veszi körbe membránnal és alakítja ki szférikus alakjukat és méretüket. Szekréció során – a korábbi magyarázatok szerint – a

szekretoros granulákban gazdag citoplazma csúcsi része szigetszerűen leválk a sejtről és a mirigy lumenébe kerül. Ma úgy vélik, hogy az apokrin szekréció alapján fázisos kiválasztást jelent. Azt, hogy sajátos mirigyszekréció-típusról van szó, több sejttani sajátosság is mutatja. Az apikális terület citokeratin szegény expressziója is arra utal, hogy ez a terület elvesztette citoplazmatikus filamentumait és vele együtt a sejtek közötti kapcsolószerkezetek (dezmoszómák, stb) is eltűntek. A sejtekről leváló, a lumenbe kerülő kis hólyagcsák 8-15 μm átmérőjűek. A lumenbe kerülve összeolvadnak a szekrétumot formálva. Fagyasztott metszeteken ezek formálják a lumenben az eozinofil testeket (EB – eosinophilic body). Ezek a testek sötétebb maggal és világosabb széllel bírnak, és összeolvadva alkotják a keményítőttesteket (corpora amylacea). A corpora amylacea koncentrikus rajzolata az eozinofil testek fokozatos kicsapódásának a következménye.

Malignus szövetben a corpora amylacea és a szekretoros apparátus károsodása miatt ezek a struktúrák nem láthatók (loss of PSG). A malignus szövetben a lument krisztalloidok és mucin (nyák) tölti ki, amely a benignus prosztatata szövetben nem látható. Ezek eredetéről nincsenek megfelelő ismereteink, valószínűleg a károsodott szekretoros tevékenység termékei. Cohen és mtsai két PCa sejttípust különítettek el. Az első típus PSG nélküli, világos citoplazmájú sejtek, melyek a lipid vakuoláknak köszönhetőek. Ezek a sejtek valószínűleg a perifériás zónából származnak. A másik sejttípusban sem PSG, sem lipid vakuolák nem láthatók, ezek származhatnak a TZ-ből (Cohen és mtsai 1998, Cohen és mtsai 2000).

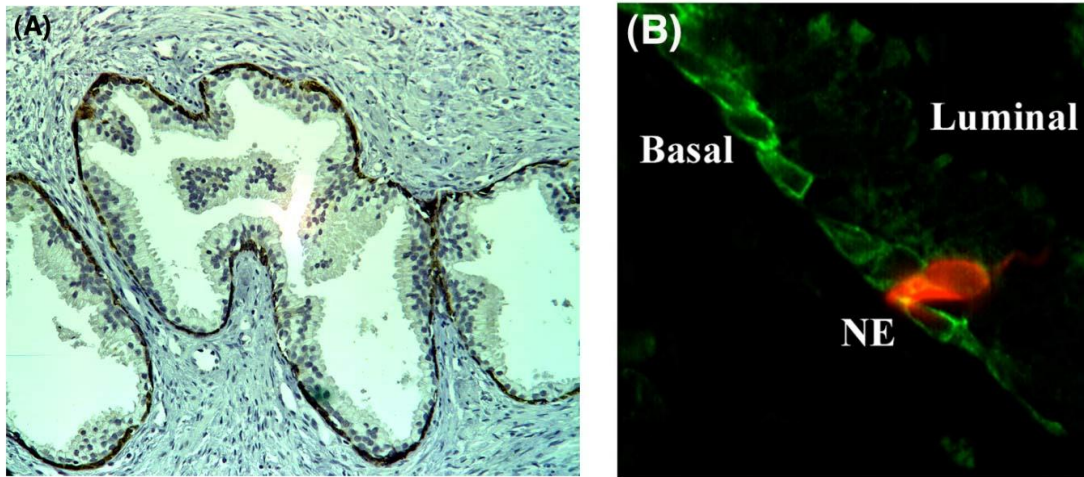
3.5. A prosztatata hámrétege, és annak fejlődése, differenciálódása

A felnőtt humán prosztatata epitheliuma három jól elkülöníthető sejttípusból áll: bazális sejtek, luminális sejtek és neuroendokrin sejtek (4. ábra). Ezek a sejtek a prosztatata minden mirigyes régiójában megtalálhatók. Ezek a sejtek morfológiailag és fenotípusuk alapján különböztethetők meg.

A mirigyhám leggyakoribb sejtjei a szekretoros luminális sejtek, melyek az epithelium 75%-át alkotják (Bonkhoff és mtsai 1994a). A luminális sejtek jól differenciált sejtek, melyek magasak és oszlopos alakjuk van. A szomszédos sejtek egymással szoros kapcsolatban vannak sejtkapcsoló komplexumok (dezmoszómák . gap és tight junction-ok) segítségével. A szekretoros luminális sejtek citoplazmájának felső része számos szekretoros granulát és azokban enzimet tartalmaz. A sejtek apokrin

mirigysejtek. A luminális sejtek fenntartásához és túléléséhez folyamatos androgén hatás szükséges (Aumüller és mtsai 1983). A szekretoros luminális sejtek termelnek számos a semenben jelen lévő anyagot, mint például a PSA (prostatata specifikus antigén), PAP (prostatikus acid-foszfátáz), leucin amino-peptidáz (Aumüller és mtsai 1983). A luminális sejteket citokeratin 8 és citokeratin 18 festéssel lehet elkülöníteni. Tekintettel arra, hogy a luminális sejtek terminálisan differenciált sejtek a sejtek életsiklusának végén apoptózis (programozott sejthalál) révén elpusztulnak.

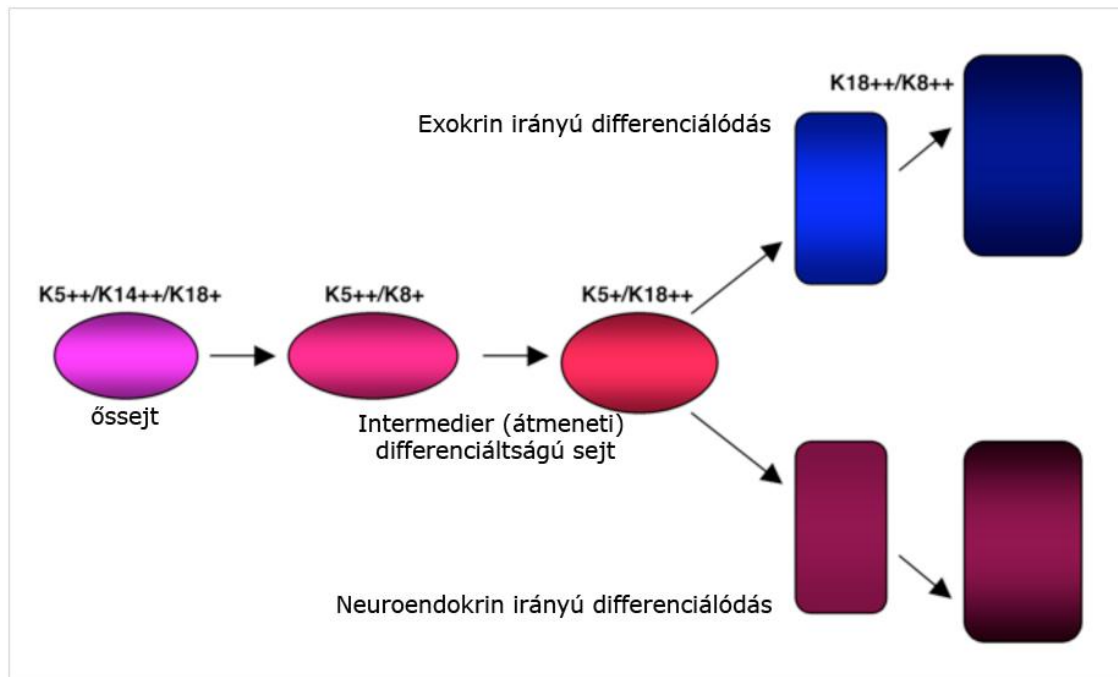
A luminális sejtek és a bazális membrán között helyezkednek el a bazális sejtek. Ezek a sejtek nem differenciált lapos vagy kocka alakú sejtek, melyek a bazális membránnal párhuzamosan helyezkednek el. A sejteknek kevés, sűrűbb citoplazmája van, sötétén festődő, szivar alakú sejtmaggal (McNeal és mtsai 1988a). A sejtek nagy molekula tömegű citokeratinnal, CK5 és CK14 festődnek (Isaac és mtsai 1984) valamint bcl-2-vel (McDonnell és mtsai 1992). A sejtek nem expresszálják a luminális sejtekre jellemző prostatikus szekretoros fehérjét, mint a PSA és PAP. A sejtekben az androgén receptorok mennyisége (AR) kisebb, mint a luminális sejtekben (Bonkhoff és Remberger 1993). A bazális sejteknek a proliferációban lehet szerepe, melyeket Ki-67, PCNA és MIB-1 antigénnel vizsgálták normál és BPH szövetben (Bonkhoff és Remberger, 1996). A festődő sejtek 70%-át a bazális sejtrétegben találták. A luminális és bazális sejtek aránya 3:1 volt a normál prostatában. A bazális sejtrétegben a proliferációs aktivitás akár tízszer nagyobb volt, mint a luminális rétegben (Bonkhoff és Remberger 1996, Hudson és mtsai 2001). A luminális sejtekkel összehasonlítva a bazális sejtek kevésbé fogékonyak az apoptózist indukáló androgén megvonásra (English és mtsai 1987). Ez valószínűleg az apoptózis gátló Bcl-2 pozitív bazális sejteknek köszönhető (Lu és mtsai 1995). Más vizsgálatok azt mutatták, hogy az izolált bazális sejtek képesek mind egy rétegű, mind háromdimenziós luminális sejtsztruktúrák kialakítására (Hudson és mtsai 2001, Liu és mtsai 1999, Robinson és mtsai 1998). Bár a bazális sejtek sajátos szerepe a prostata biológiájában nem tisztázott, ma széles körben elfogadottan a bazális sejteket a luminális sejtek prekursorának tartják (Robinson és mtsai 1998).



4. Ábra A felnőtt humán prosztata keresztmetszeti képei az epithelium különböző sejttypusait ábrázolják. (A) A barna festés (DAB) jelöli a bazális sejtréteget, mely citokeratin 5-öt expresszál, míg a lumenális réteg nem festődik. (200x nagyítás) (B) A prosztata epitheliumának immunfluorescens festése, melyen a citokeratin 14 expresszáló bazális sejtek zöldek (FITC), a chromogranin A expresszáló neuroendokrin sejtek (NE) vörösek (TRITC) (Alam és mtsai 2004, 1000x nagyítás).

A korai ultrastrukturális vizsgálatok egy harmadik sejttypust is izoláltak a bazális kompartmentben, melyek gazdagok elektrodenz, kerek granulákban (Biagini és mtsai 1982). Ezek a sejtek a neuroendokrin (NE) sejtek. A húgy- és ivarszervek közül a humán prosztata tartalmazza a legtöbb neuroendokrin sejtet (di Sant'Agnesse és mtsai 1992). Morfológiailag kétféle sejttypust lehet megkülönböztetni a neuroendokrin sejtek között. Az egyik típus nyitott, kehely alakú sejtek képviselik, a lumenig érő hosszú széles nyúlvánnyal, a másik típus pedig zárt sejtek, hosszú, keskeny nyúlványokkal (di Sant'Agnesse és mtsai 1992). A neuroendokrin sejtek számos neuropeptidet termelnek, mint a chromogranin A (Chr-A), szerotonin, neuron-specifikus enoláz (NSE), calcitonin, thyroid-stimuláló hormonszerű polipeptid, gastrin-releasing peptid és somatostatin (di Sant'Agnesse és mtsai 1992, Wu és mtsai 1996). Ezek szerepe a prosztata működésében még nem tisztázott, de feltételezések szerint számos intracelluláris esemény sorát indíthatják el, mint az ion beáramlás, depolarizáció, kalcium felszabadulás, ATP átalakulás aktivációja (Xue és mtsai 1998b). Az adatok birtokában egyre nagyobb az egyetértés, hogy a prosztata NE sejtjei alapvető szereppel bírnak a prosztata normális működésében és növekedésében (Abrahamsson és mtsai 1996).

A normál prosztatata hámrétegének csaknem az összes bazális, viszonylagosan differenciálatlan sejtjei a progenitor sejtjei a luminálisan elhelyezkedő, henger alakú PSA szekretáló sejtjeinek (Isaacs mtsai 1989, Bonkhoff és mtsai 1996, Robinson és mtsai 1998). A neuroendokrin sejtek vagy azok kis csoportja e két sejtfeleség között fordul elő szétszórtan. Úgy gondoljuk, hogy az őssejtek a bazális sejtrétegben foglalnak helyet, ahol a sejtosztódás nagy része történik. Számos tanulmányt végeztek már a prosztatata sejtjeinek differenciálódásának kérdésében. Többféle sejtmarkerrel jellemezték már a sejteket. Különösen fontos a citokeratinokkal történt vizsgálatok. A bazális sejtvonal klasszikus markerei a CK5 és CK14, valamint a p63. A luminális sejtrétek legjellemzőbb markerei a CK8 és CK18, valamint a PSA, AR, PSMA, PSAP. A neuroendokrin sejteket pedig leggyakrabban a chromogranin A, CD56 markerekkel szokás jellemezni. Kiterjesztve a markerek számát azonban ezeken kívül természetesen rengeteg egyéb fenotípussal rendelkező sejtípus található mindkét sejtrétegben.



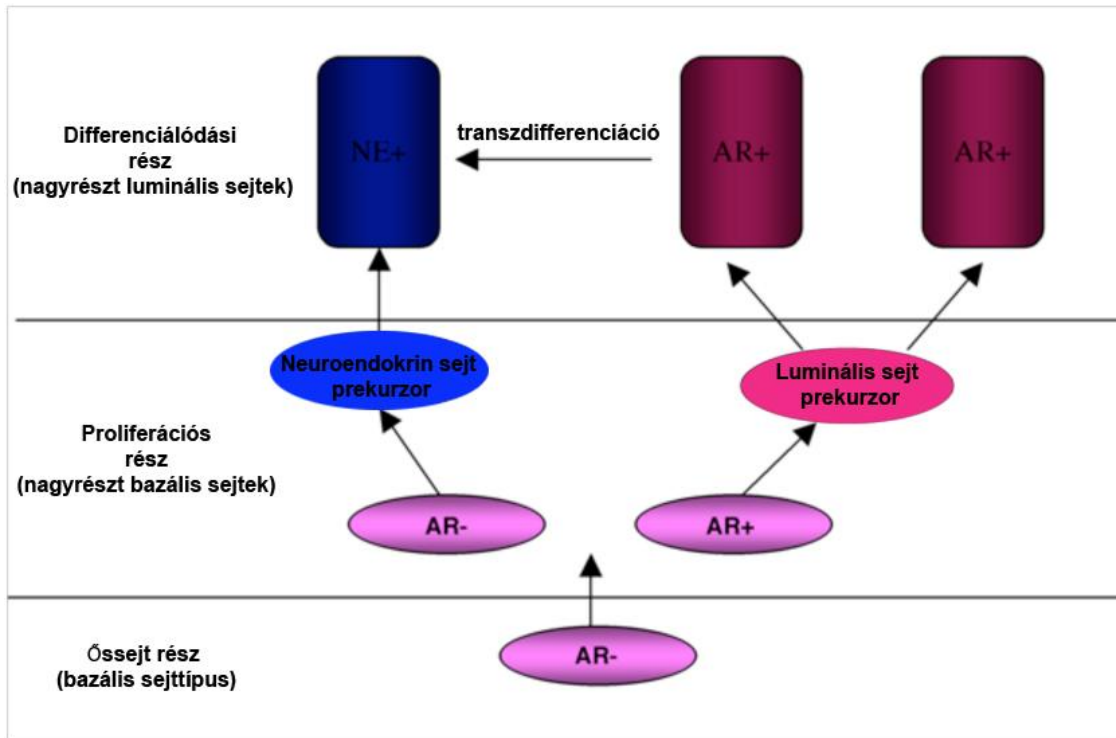
5. Ábra A prosztatata hámréteg differenciálódásának van Leenders féle modellje (van Leenders és mtsai 2000).

Bonkhoff és Remberger (Bonkhoff és mtsai 1996) úgy vélik, hogy a prosztatata hámsejtjei egy közös a bazális rétegben elhelyezkedő őssejtből származnak. Elméletük szerint három sejtípusra érdemes koncentrálni. Az őssejtek a bazális rétegben helyezkednek el és androgén negatív (AR-) sejtek. A következő sejtípusok nagyrészt még a bazális sejtrétegben helyezkednek el és vagy AR- vagy androgén pozitív (AR+)

sejtek. Az AR+ sejtek a prekursor sejteji a luminálisan elhelyezkedő differenciálódott sejteknek. Az AR- sejtek a neuroendokrin sejtek prekursorai. A luminális rétegben a NE (AR-) és a luminális (AR+) sejtek átalakulhatnak. Nagle és munkatársai megmutatták, hogy a bazális sejtek változatos módon expresszálják a CK5, 6, 8, 10, 13, 14, 18 és 19 sejtfelszíni markereket, míg a luminális sejtek hasonlóan a CK5, 7, 8, 13, 18, 19 markereket (Nagle és mtsai 1991). Sherwood és Hudson (Sherwood és mtsai 1990, Hudson és mtsai 2001) a CK15 festődést írták le a BPH szövetben. Peehl és Hudson is megfigyelték a CK19 expresszióját mind a bazális, mind pedig a luminális sejtrétegben (Pheel és mtsai 1996, Hudson és mtsai 2001). A vizsgálatok eredményei azt sugallták, hogy a CK19 reprezentálja a bazális és a luminális sejtek közötti átmeneti sejtek populációját. Xue és munkacsoportja (Xue és mtsai 1998a), valamint Leenders és kollégái is megkérdőjelezték a bazális és luminális sejtek közötti megkülönböztetést citokeratin festéssel (van-Leenders és mtsai 2000). Vizsgálataik alapján egy olyan modellt alkottak, melyben az őssejtek egy része CK5/14-et nagy arányban expresszálják, míg a CK18-at alacsony arányban. Az átmeneti erősödő sejtek (intermedier sejtek) elveszítik CK14 expressziójukat és miközben a sejtek differenciálódnak a CK18 up-regulálódik, míg a CK5 down-regulálódik. Ezáltal a teljesen differenciált sejtek a CK18 markert expresszálják (5. ábra). Mivel mind Bonkhoff (Bonkhoff és mtsai 1994b), mind pedig Xue (Xue és mtsai 1998b) megfigyelték a bazális sejtek PSA festődését lehetséges, hogy nincs éles választóvonal a két sejtpopuláció között (6. ábra). De Marzo a két sejtréteg között elkülönített egy harmadik sejtpopulációt is, melyet alacsony p27 expresszióval jellemzett (de Marzo és mtsai 1998). Ez a fehérje a nyugvó sejtekben magas arányban expresszálódik, míg a proliferáló sejtekben down-regulálódik. A bazális réteg heterogénnek mutatkozott a p27 fehérje festődését illetően. A bazális és luminális sejtréteg között viszont p27 negatív sejtek is találhatóak.

Wang és kollégái (Wang és mtsai 2001) magzati prosztatákat vizsgálva a kétirányú őssejt elméletét alkották meg. A humán prosztata a gesztációs időszak kb. 10 hetében indul fejlődésnek, az urogenitalis sinus epitheliuma több helyen bedudorodik a környező mesenchymába. A 16. gesztációs hét végére mind a bazális, mind a PSA termelő szekretoros és a neuroendokrin sejtek is kifejlődtek. A prosztata fejlődését egerekben és patkányokban hasonló eredménnyel vizsgálták. Tanulmányukban azt találták, hogy az urogenitalis sinus mind a bazális, mind pedig a luminális sejtek markerek teljes készletét expresszálják, beleértve a CK19-et, p63-at, CK8/18-at,

CK5/14-et és a GSTpi-t. A fejlődés során a luminális és bazális sejtek elveszítenek a markerekből, de a bazális réteg egyes sejtjei (kb. 0.6% az összes bazális sejtnek) mindig expresszálják az összes markert. Egyes vélemények szerint ezek a prosztata hámrétegének őssejtjei, bár ezt a véleményt többen vitatták.



6. Ábra A prosztata epitheliális sejtjei differenciálódási modelljének egyszerűsített diagramja (Bonkhoff és mtsai 1996). (AR⁻ - androgén receptort nem expresszáló sejtek, AR⁺ - androgén receptort expresszáló sejtek.)

3.5.1. A CD44 mint prosztata epithelium differenciálódási sejtmarker

A CD44 egy transzmembrán glikoprotein, melyet tulajdonképpen minden sejt típus expresszál. A CD44 szerepe a sejt-sejt és a sejt-mátrix közötti interakciókon keresztül a sejtnövekedés szabályozása (Lesley és mtsai 1993). A CD44 számos variánsa létezik, ami az extracelluláris membrán domén különbözőségének tulajdonítható. Az izotípusok expressziója az adott szövetre jellemző tulajdonság (Screaton és mtsai 1992, Tolg és mtsai 1993). A CD44 számos izoformja expresszálódik a normális és tumoros epitheliumban (Matsumura és mtsai 1992, Heider és mtsai 1993a, Hudson és mtsai 1995, Hudson és mtsai 1996, Fonseca és mtsai 2000).

A CD44 számos fiziológiai és patológiai folyamatban játszhat szerepet, mint az intercelluláris adhézió és a daganat metasztázis képzés. Nem malignus folyamat által

érintett prosztatata epitheliumában a CD44 expresszióját kimutatták a bazális és az intermediér sejtekben (Heider és mtsai 1995, Noordzij és mtsai 1997, Tran és mtsai 2002). Az epitheliális prosztatata sejtek differenciálódásának különböző fokán a CD44 expressziója csak részben ismert.

Számos közlemény jelent meg a különböző rosszindulatú elváltozások CD44 expressziójának vizsgálatáról. Heider a colorectalis és gyomor daganatokat jellemezte (Heider és mtsai 1993a, Heider és mtsai 1993b), Matsumura az emlő (Matsumura és mtsai 1992), Hudson a laphámrák expresszióját karakterizálta (Hudson és mtsai 1996) és Nagabhushan a prosztatatarákban írta le a CD44 expresszióját (Nagabhushan és mtsai 1996). A prosztatában a CD44 izoformok és a v6 expressziója fordítottan korrelál a daganat stádiumával, grádusával és a ploidotással (Nagabhushan és mtsai 1996). Ezen túlmenően olyan közlemények is napvilágot láttak, melyek a radikális prostatectomián átesett prosztatatarákos betegek prognózisának megítélésében a CD44 expresszió elvesztését hasznos eszköznek ítélte (Noordzij és mtsai 1997, Kallakury és mtsai 1998). Iczkowski és munkatársai a prosztatatarákban a v7-v9 variánsok expresszióját demonstrálták (Iczkowski és mtsai 2003). A CD44 csökkent expresszióját mutatták ki prosztatatarák metasztázisában és a primer tumorban is (Noordzij és mtsai 1999).

3.6. Össejt modellek az alap kutatásban

Az össejt teória szerint minden egyes szövetben van egy hosszú életű kis sejtpopuláció. Ezen a sejtek két fontos tulajdonsága az önmegújítás képessége és multipotens jelleg. Az össejtek osztódása során legalább az egyik utódsejt megmarad multipotens össejtnek, míg a másik utódsejtből egyéb irányú differenciáltságot mutató sejt alakul ki. Az össejtek ritkán osztódnak, de osztódásuk során egyéb gyorsan osztódó sejtpopulációkat hoznak létre, melyeket gyakran átmeneti erősítő (tranzit amplifying) sejteknek hívnak. Ebből a sejtpopulációból fognak végül kifejlődni a szövetre jellemző sejtek.

3.6.1. A prosztatata összejt teória

Az emberi prosztatata epitheliuma két sejtrétegből áll, melyekben három sejtípust tudunk megkülönböztetni: bazális, luminális és neuroendokrin sejtek. A sejteknek ezeken belül számos variáns fenotípusa ismerhető fel. A prosztatatarák sejtjei hasonló fenotípusú sejteket tartalmaz, de a növekedés mintázata és a sejt differenciálódás különböző fokban különböző mértékben megváltozik minden egyes prosztatatarákban.

Fontos alaptézis, hogy a differenciáltság foka fordítottan arányos a sejtek osztódási képességével. A normál prosztatata epitheliumában egy viszonylagosan szigorú munkamegosztás van, például a PSA termelő sejtek kis valószínűséggel osztódnak. Ezzel ellentétben prosztatatarák esetén éppen ez a sejtek közötti ilyen jellegű elkülönülés szűnik meg.

Ahhoz, hogy a prosztatatarák sejtjeinek differenciálódását megértsük először is meg kell ismernünk a normál prosztatata epitheliális sejtjeinek növekedését és differenciálódását. Számos tanulmány vizsgált már magzatokból, fiatal fiúkból, fiatal felnőttekből és idősebb férfiakból származó normál és kóros prosztatata szövetet, de kevés egyértelmű konklúziót lehetett csak levonni ez idáig.

A prosztatata összejt elméletek is abból indulnak ki, hogy a prosztatata hámrétegének bazális rétegében alacsony oszlási frekvenciával rendelkező összejtek foglalnak helyet. Ezek a korábban említettek szerint önmegújulási képességgel és multipotens jelleggel bírnak. Ha igaz az összejt elmélet, a prosztatának a legfontosabb sejtjei az összejtek. Számos tanulmány foglalkozott a prosztatata összejtek esetleges szerepével a normális prosztatata hámrétegének fejlődésében és a BPH valamint a prosztatatarák kialakulásában (Isaacs és mtsai 1989, Bonkhoff és mtsai 1996a, Bonkhoff és mtsai 1996b, de Marzo és mtsai 1998, Bui és mtsai 1998-99, van-Leenders és mtsai 2001).

Sejtkultúrákban az összejtek és az átmeneti erősítő sejtek a felelősek a sejtek kolónia formálásáért (Buick és mtsai 1984). A prosztatata epithelium kolónia formálási képességét Peehl és munkacsoportja írta le először (Peehl és mtsai 1986, Peehl és mtsai 1988). Ők mutatták meg, hogy egy Petri csésze aljában (kb. 100 sejt/Petri csésze sűrűségű sejtek) a prosztatata epitheliális sejtjeinek megközelítőleg 5%-a formál kolóniákat, melyek közül egyes kolóniák kifejezetten nagyok. Hasonló eredményre jutott Hudson és munkacsoportja, akik a kolóniákon belül már elkülönítették az összejteket és az átmeneti erősítő sejteket (Hudson és mtsai 2000). Az epitheliális sejteket szérumentes közegben kolonizálták, és a kolóniák kb. 0.5 %-nál észlelték,

hogy azok kifejezetten nagy kolóniákat formáltak, melyekben a sejtek szorosan egymás mellett helyezkedtek el. A kolóniák közel 4,5%-a pedig kisebb volt és a sejtek egy része szorosan egymás mellett volt, míg a nagyobb sejtek differenciálódás jeleit mutatták. A nagyobb kolóniák Matrigelben (Becton Dickinson, Oxford, UK) bazális és intermedier sejtekké differenciálódtak. Ezek a sejtek xenograft modellekben az egerek vesetokja alá ültetve pedig prosztatata szövetet formált glanduláris elemekkel. Következtetésük szerint a nagyobb kolóniák az epithelium őssejtjeiből fejlődött ki, míg a kisebb kolóniák az átmeneti erősödő sejtekből alakultak ki. (Hudson és mtsai 2000). Hasonlóan az előbbihez Collins és munkacsoportja is kétféle kolóniát figyelt meg a prosztatata hámsejtjeinek kolonizációjával (Collins és mtsai 2001). CD44-gyel jelölve a bazális sejteket a munkacsoport szerint a kolónia kialakulásáért felelős sejteknél az alfa-2-integrin erős expresszióját figyelték meg. Fagyasztott metszetek vizsgálata mutatta, hogy a bazális sejtek kb. 15%-a alfa-2-integrin expresszáló. Tanulmányaik szerint a kolónia formáló sejtek kb. 5%-a expresszálja a CK18-at, míg a bazális sejtek kb. 50%-a CK18 pozitív. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a CK18 pozitív bazális sejtek a differenciálódás felé elkötelezett sejteket reprezentálja (Collins és mtsai 2001).

Peehl és munkatársainak valamint más szerzők munkájából tudjuk, hogy a prosztatata hámsejtjeinek teljes, egyértelmű elkülönítése nem lehetséges. Amíg egyértelmű sejtfelszíni markereket nem identifikálunk – hasonlóan a hemopoetikus rendszer őssejtjeihez – a prosztatata hámsejtjeinek izolálása és jellemzése nehezen megközelíthető probléma marad.

3.6.2. Az őssejt elmélet jelentősége a prosztatata betegségeinek értelmezésében

A prosztatata intraepithelialis neoplasia (PIN) és a prosztatarák kialakulása között nincs egyértelmű kapcsolat. A PIN-t korábban a prosztatarák prekursorának tekintették (Bostwick és mtsai 1987). Három fokozata van a prosztatikusan intraepithelialis neoplasianak, I, II és III grádusú PIN-t különböztetünk meg. PIN esetén a bazális réteg folytonosságának megszakadását észlelhetjük. I grádusú PIN esetén 0.7%-ban, II grádusú PIN esetén 15%-ban, míg III grádusú PIN esetén 56%-ban fordul elő ez az anomália (Bostwick és mtsai 1987).

PIN esetén a sejtproliferáció változik meg. A normál prosztatata szövetben ill. BPH esetén a sejtproliferáció megközelítőleg 70-80%-ban fordul elő a bazális rétegben. Low-grade (alacsony fokú, Grade I) PIN esetén a proliferálódó sejtek közel 70%-a a

luminális sejtrétegben található, míg a high-grade PIN (magas fokú, Grade II-III) esetén ez az arány kb. 90% (Wang és mtsai 2001). A differenciálódás nyelvére lefordítva a folyamatokat, PIN esetén a luminális sejtek nagyobb arányban pozitívak CK19-re (Nagle és mtsai 1991). A Bcl-2 (apoptózisért felelős protein) és a RET onkogén overexpressziója, valamint a metalloproteináz enzimek eloszlásának változása figyelhető meg magas fokú (high-grade) PIN esetén.

Prosztatárak esetén a domináns sejttípusnak a luminális sejtekhez hasonló fenotípusa van (Brawer és mtsai 1985, Nagle és mtsai 1987, O'Malley és mtsai 1990, Sherwood és mtsai 1991, Okada és mtsai 1992). A prosztatárak sejtjeinek nagy része expresszálja a CK8-at, CK18-at, PSA-t, valamint a sejtmagok az androgén receptort (AR). A p63 bazális sejtmárker viszont hiányzik prosztatárak esetén (Signoretti és mtsai 2000). A primer és a metasztatikus prosztatárak 95%-a mutat PSA festődést, de a magasabb grádusú tumorok kevésbé expresszálják a PSA-t, mint az alacsonyabb grádusú tumorok (Ellis és mtsai 1984). A legtöbb prosztatárak neuroendokrin sejtet is tartalmaz, de nagyon ritka esetben dominálnak ezek a típusú sejtek. Ritkán olyan sejtek is előfordulnak, melyek mind a PSA-ra, mind pedig a Chromogranin A-ra pozitív festődést mutatnak. Amíg a prosztatárak sejtjeinek nagy részének luminális sejt irányú differenciáltsággal rendelkezik, a sejtek egy része ún. intermedier fenotípust mutat. Talán ezek az intermedier sejtek tükrözik a rák eredetét. Liu és munkatársai a CD57 és CD44 markereket használták a primer prosztatárak és metasztázis sejtjeinek izolálására. Eredményeik szerint a primer tumor és egy nyirokcsomó metasztázis predominantán CD57 pozitív sejtet tartalmazott, míg a másik két metasztázisban CD44 pozitív sejtek voltak (Liu és mtsai 1999). A bazális sejtek expresszálódását vizsgálva prosztatárak esetén azt tapasztalták, hogy a 34 β E12 antitesttel festve (CK1, CK5, CK10, CK14 elleni antitest) a primer prosztatárak sejtjeinek 54%, míg a metasztatizáló sejtek 43%-a volt pozitív (Googe és mtsai 1997). Ehhez hasonló eredményre jutottak korábbi vizsgálók is, vagyis hogy a prosztatárak sejtjei a bazális sejtekre jellemző expressziót mutatják (Verhagen és mtsai 1992). Az alacsony grádusú prosztatárak sejtek (Gleason grade 1-3) 35%, míg a magas grádusú sejtek 0-25%-a festődik bazális sejtmárkerekkel (Verhagen és mtsai 1992). Azok a sejtek, melyek a bazális citokeratinokat és a CK18-at is koexpresszálják az ún. transit amplifying sejt populációt jelenthetik (Verhagen és mtsai 1992). De Medina és kollégái a CK5 és CK18 és EGF (epidermal growth factor) festődést vizsgálták és megállapították, hogy a prosztatárak sejtjei mind a két sejtmárkert expresszálhatják (14%-47%) egyszerre. Más kutatók azt is vizsgálták, hogy

a bazális sejtek korai (CK5/CK14 koexpresszió) vagy intermedier (CK14 negatív) differenciálódás jeleit mutatják. 56 betegből származó prosztatatarák metasztázis mintát vizsgáltak CK5, CK14 és CK18 fluoreszcens festést készítve. Minden sejt CK18 pozitív és CK14 negatív volt. CK5 festődés az sejtek 29%-a mutatott a nem kezelt betegek esetén, míg hormon megvonás esetén ez az arány 75% volt, és a hormon független tumorok esetén pedig 57%. A tumorok kb. 50%-a tartalmazott neuroendokrin sejteket függetlenül a hormonkezeléstől (van-Leenders és mtsai 2001).

A normál szövetek kifejlődéséhez használt őssejt modell a prosztatatarákra is alkalmazható. A tumorban három sejtpopuláció különíthető el: őssejtek, átmeneti sejtek (transit amplifying cells) és a differenciált sejtek (Mackillop és mtsai, 1983). Ha a prosztatatarák is megfelel az őssejt modell szabályainak, akkor a prosztatatarák is egyetlen sejtől fejlődik és további őssejtek és átmeneti valamint differenciált sejtek képződéséhez vezet. A rák őssejtek elsődleges bizonyítéka az a megfigyelés, hogy a legtöbb daganatnak monoklonális eredete van. Klonális markerek, mint pl. a Philadelphia kromoszóma, minden ráksejtben megtalálhatók. A bizonyítékok második vonalát a kolónia formáló vizsgálatok képezik (colony-forming assay). Ezeket a vizsgálatokat az AML kapcsán végezték (Masters és mtsai 2003, Bonnet és mtsai 1997). A prosztatatarák sejtjei között is megtalálhatók luminális, bazális és neuroendokrin differenciálódást mutató sejtek ugyanúgy, mint az ép epitheliummal bíró prosztatában. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a ráksejtek a normál prosztatatahámsejtek fejlődéséhez hasonló átalakuláson mennek át, vagyis a prosztatatarákra is alkalmazható az őssejt elmélet.

Amennyiben elfogadjuk a prosztatatarák őssejt elméletét, rögtön felmerül a kérdés: mely sejtekből fejlődik ki a rák. Elméletileg a prosztatatarák őssejt a differenciáltság bármely stádiumban lévő sejtjéből kifejlődhet. Az egyik koncepció szerint egy differenciált sejt proliferációs aktivitásra szert téve de-differenciálódik a rák progressziója során (Buick és mtsai 1984). A spektrum másik végéről nézve pedig a rák a valódi őssejtekből alakul ki (Buick és mtsai 1984, Reya és mtsai 2001). Vannak, akik úgy vélik, a prosztatatarák normál őssejtekből fejlődik ki (Bonkhoff és mtsai 1996). Invazív rákká fejlődésük során a sejtek elveszítik a bazális sejtrétegre jellemző karakterisztikájukat és a luminális sejtekre jellemző fenotípust öltönek. Egy átmeneti szint figyelhető meg PIN során. Más elméletek szerint a prosztatatarák egy átmeneti sejtől (transit amplifying) fejlődik ki (van-Leenders és mtsai 2001, Verhagen és mtsai 1992) talán a luminális rétegből (de Marzo és mtsai 1998). Androgén megvonás után a

bazális sejtréteg markereivel bíró ráksejtek száma megnövekszik (Bui és mtsai 1998-99, van-Leenders és mtsai 2001, de Medina és mtsai 1998) arra utalva, hogy a bazális sejtek vagy őssejtekből, vagy átmeneti (transit amplifying) sejtekből fejlődnek ki.

Más szerzők szerint arra van bizonyíték, hogy egyes prosztatatarákok a luminális sejtekből fejlődnek ki (Brawer és mtsai 1985, Nagle és mtsai 1987, Okada és mtsai 1992, Liu és mtsai 1999), mivel a legtöbb prosztatatarák a luminális sejtekre jellemző fenotípussal rendelkezik.

A rosszindulatú daganatok őssejtektől származó elméletére legtöbb bizonyítékunk a hemopoetikus rendszer vizsgálatából származik. A leukémiák és lymphomák tanulmányozásának előnye, hogy az őssejtek és a jellegzetes markerrel bíró sejtvonalak a hemopoetikus rendszerből könnyen elérhetőek, ellentétben a prosztata és egyéb epitheliális daganatokkal.

A humán AML tanulmányozásából van bizonyítékunk a normális őssejtek létezésére. Azok a sejtek, melyek humán AML-t képesek NOD/SCID egér xenograft modellekben létrehozni CD34+CD38- fenotípussal rendelkeznek, ahogyan a hemopoetikus őssejtek is. A CD34+CD38+ sejtek viszont nem képesek xenograft modellben osztódni. Ebből következik, hogy a humán AML sejtet létrehozni képes sejtek differenciálódásra, proliferációra és önmegújításra képes sejtek a leukémiáért felelős őssejtek. Az AML-hez hasonlóan egyéb leukémiás sejtvonalak is a normális hemopoetikus prekursor sejtekre jellemző felszíni markerekkel rendelkeznek. A bizonyítékok másik része is az AML tanulmányozásából származik. A fúziós gén eredményező 8;21 transzlokáció gyakori az AML-ben. Az AML remisszióban lévő betegeknél a csontvelőből olyan sejtek mutathatók ki, melyek e fúziós gén transzkripciói. Ezek a sejtek viszont normálisan működnek és normális sejteket hoznak létre. Azt is kimutatták, hogy a leukémiás blast sejtek CD34+CD38-Thy-1- fenotípussal rendelkeznek, míg a normális őssejtek CD34+CD38-Thy-1+ marker státusszal jellemezhetőek. Ebből következik, hogy a leukémiához vezető kezdeti lépés a normális őssejtekben kell, hogy végbemenjen vagy azon hemopoetikus őssejtekben, melyek a Thy-1 expressziójukat elvesztették (Miyamoto és mtsai 2000).

Nem kétséges, hogy a legtöbb leukémia normális őssejtekből alakul ki. Azonban további genetikai változás is szükséges a leukémia progressziójához. Ezek a genetikai változások nem feltétlenül a rák őssejtben alakulnak ki, hanem a belőlük kifejlődő átmeneti sejtekben vagy a még differenciáltabb ráksejtekben. A prosztatatarák is hasonlóan alakulhat ki és fejlődhet tovább.

Prosztatarák esetén úgy feltételezik, hogy akár 20 évnek is el kell telnie ahhoz, hogy a rák klinikailag kimutathatóvá váljon. A prosztatarák sejtek proliferációs élethosszuk 2/3-áig – 3/4-éig kimutathatatlanok maradnak. Amennyiben a prosztataráknak szüksége van legalább 5-10 mutációra ahhoz, hogy klinikailag fontos rák legyen belőle, valószínűnek látszik, hogy a rák a normális őssejtekből alakul ki, melyek ezt a hosszú időintervallumot is túlélnek.

Ha az őssejtben egy vagy két mutáció történik, ezeket az utódsejtekbe is átadja, így a sokkal nagyobb proliferációs aktivitással bíró transit amplifying sejteknek is. Ezek a mutációk a proliferációs aktivitást és a sejtek élekciklusát is növelhetik. Ezek szerint tehát, a kezdeti változások valószínűleg a normál epitheliális őssejtben mennek végbe, a prosztatarák növekedése és progressziója a genetikailag módosult nagy proliferációs aktivitással rendelkező átmeneti sejtekben (transit amplifying) zajlik le. A prosztatarák differenciálódásának mintája attól függ, hogy a sejtfejlődés melyik állomásán zajlik le a genetikai változás. A progresszió (metasztázis vagy hormonrezisztencia) további klonális expanzió következménye lehet (Foulds és mtsai 1957, Nowell és mtsai 2002).

4. Célkitűzések

A vizsgálatunk első részének célja az volt, hogy a normális prosztata és a vesicula seminalis morfológiai, hisztológiai, immunhisztokémiai és sejtkinetikai jellegzetességeit megvizsgáljuk és összehasonlítsuk. A vizsgálat során az epitheliális és a mesenchymális sejtek eloszlását és immunhisztokémiai sajátosságait, apoptózis és proliferációs indexét vizsgáljuk. Immunhisztokémiai módszerrel a sejtek differenciálódási fokára, ill. a különböző differenciáltságú sejtek eloszlására tudunk következtetni. A vizsgálat során normális prosztátákat és ondóhólyagokat igyekeztünk vizsgálni. Úgy gondoljuk, hogy a fiatal férfiakból nyert prosztata és vesicula seminalis preparátumok ennek a kritériumnak megfeleltek. A neuroendokrin sejtek vizsgálatával és a sejtek eloszlásának vizsgálatával magyarázatot kaphatunk a zónák és a vesicula seminalis között lévő különbségekre, a betegségekre való fogékonyság tükrében. A neuroendokrin markerek közül a két leggyakrabban használt NE sejt markert használtuk. A sejtek vizsgálatánál a különböző differenciáltságú sejteket citokeratin immunhisztokémiával hasonlítjuk össze. A luminális sejtek és a bazális sejteket CK5, CK14, CK19 festéssel vizsgáljuk és azok zonális eloszlását figyeljük meg. Már korábban használt és különböző zonális festődést mutató markereket és antitesteket használunk a saját zonális felosztásunk helyességének ellenőrzésére, ill. hogy a korábbi vizsgálatok eredményét, reprodukálhatóságát megerősítsük. Az osztódó sejteket és az apoptózis mutató sejteket Ki67 és TUNEL teszt segítségével vizsgáljuk. A zónák és az ondóhólyag közötti különbségek magyarázhatják a betegségek megjelenésének eltérő eloszlását a dűlmirigyen és az ondóhólyagon belül.

A vizsgálatunk másik része arra összpontosított, hogy a CD44 és izoformjainak expresszióját vizsgálja a prosztata epithelium differenciálódásának különböző fokán. Az prosztata zónáiban megjelenő különböző differenciáltságú sejtek eloszlásának eltérései szintén magyarázhatják a zónák eltérő biológiai viselkedését. A vizsgálatokat normális prosztata epitheliumán, sejtkultúrán és BPH sejteken is célunk volt elvégezni.

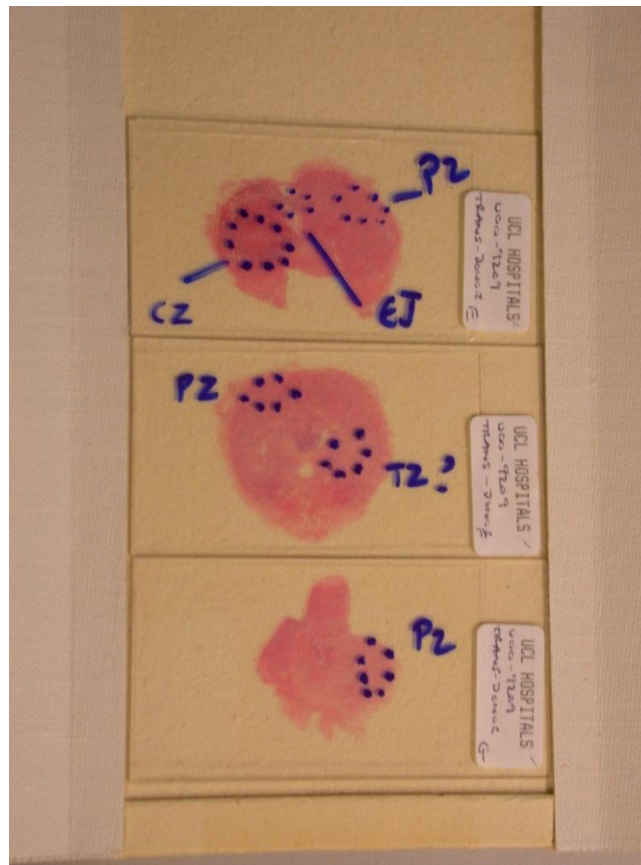
A munkánk nagy része korábbi eredményekre támaszkodik, melyek a zónák felosztásának tudományos alapjait adták. A sejt differenciálódási vizsgálataink korábbi sejtenyészetten és humán szövettani mintákon végzett immunhisztokémiai és egyéb proteomikai és genomikai vizsgálatra épült.

A prosztata zónái és a vesicula seminalis közötti sejtdisztribúciós különbségek magyarázatul szolgálhatnak a betegségek eltérő megjelenésére a prosztata zónáiban és a vesicula seminalis viszonylagos ellenálló képességére a betegségekkel szemben.

5. Módszerek

5.1. Anyagok

A vizsgálat első részénél prosztatata és vesicula seminalis preparátumokat használtunk fel, melyek kilenc, 15-36 év közötti (átlag 26 év), szerv transzplantációs donor férfi szervezetéből. A fiatal férfiak baleseten vagy cerebrovasculáris történésen estek át. A donorok egyikének sem volt olyan ismert betegsége, vagy olyan eltérése, mely a prosztatata állapotát befolyásolhatta. A vizsgálat második részében használt BPH-s prostataszövetet TURP-n átesett betegek szövettani anyagából választottuk ki. A minták kiválasztásánál ügyeltünk arra, hogy minél nagyobb szövet darabokat válasszunk ki, és hogy olyan szövetet válasszunk ki, melyek kevésbé ért termikus károsodás. A prosztatata sejteket Pre2.8 sejt kultúrából és BPH-s szövetből nyertük ki.



7. Ábra A prosztatata és vesicula seminalis preparátumokat haránt irányban, egészben vágtuk fel és készítettünk teljes metszetet. A metszeteken H&E festés után a zónákat patológus segítségével határoztuk meg.

A prosztatákat a bázistól az apex irányába haladva kb. 5 mm-es szeletekre vágtuk fel. A szeleteket 4%-os pH semleges formalinban fixáltuk 24-48 óráig. A formalin fixáció után a mintákat fokozatosan emelkedő töménységű alkoholos oldatban („felszálló alkoholsoron”) dehidráltuk, majd Histoclear[®] (National Diagnostics) oldatban tisztítottuk. A mintákat végül paraffinba ágyasztuk, majd szobahőmérsékleten tároltuk. A paraffinos blokkokból 5 mikrométeres teljes haránt irányú metszeteket készítettünk (whole mount section), majd a metszeteket Vectabond[®]-dal (Vector Laboratories, Peterborough, UK) bevont tárgylemezre vittük fel. Ennek a rövid menete a következő volt. A tárgylemezeket acetonban mostuk le öt percig, majd a metszetek lecsepegtetve azokat a Vectabond oldatba helyeztük be további öt percre. Ezután a metszeteket eltávolítottuk és lecsepegtettük, majd a desztillált vízben háromszor leöblítettük és végül a lemezeket megszáritottuk enyhe rázás mellett, hogy a cseppképződésből adódó foltosodást elkerüljük. A tárgylemezeket szobahőmérsékleten tároltuk a használatig. 76x51 mm-es tárgylemezeket használtunk, hogy a prostata legnagyobb átmérőjű haránt szeletei is ráférjenek maradéktalanul a tárgylemezre. A Vectabond[®]-dal bevont tárgylemezre a metszetek jobban tapadtak, így az immunhisztokémiai festés során a fokozott igénybevétel ellenére a metszetek nem váltak le a tárgylemezről. Minden blokkból egy metszetet hematoxilín-eozinnal festettünk hisztológiai vizsgálat céljából. A hisztopatológiai vizsgálat igazolta, hogy a mintákban betegségre utaló jel nem volt látható. A H&E festés segítségével prostata zónáit is meg tudtuk különböztetni. A teljes haránt irányú metszeten könnyen tudunk tájékozódni, így mirigyek helye és ez által a zonális elhelyezkedése meghatározható volt.

A sejtkultúra vizsgálatához PrE2.8 sejtvonalat használtunk, mely modellezi a humán prostata sejtek differenciálódását. A PrE2.8 sejtvonal immortalizált sejtekből áll. A sejtek proliferáló prostata mirigyhám sejtek. Az immortalizált sejtek BPH szövetből származtak. Az epithelialis sejteket hőérzékeny SV40 nagy T komplexszel immortalizáltuk transzfekció révén. Ezek a sejtek 33°C-on proliferációt mutatnak, míg 39°C-on a proliferáció megáll és a sejtek differenciálódnak. A sejtkultúra vizsgálatokhoz nagyon röviden a következő módszert használtuk. TURP műtét során nyert mintákból epithelialis sejteket nyertünk. A mintákról az elhalt részeket és az alvadékat szike segítségével távolítottuk el, majd 1mm³-es darabokat készítettünk, és a darabokat 20ml PBS-ben mostuk át. A vér és a szövettörmelék eltávolítása után kollagenáz oldat segítségével az acinusokat elválasztottuk a stromától. Ezt követően a

sejteket az acinusoktól 0.25%-os tipszin/verzin oldat segítségével szeparáltuk. Nagy-T antigént tartalmazó SV40-nel a sejteket immortalizáltuk. A sejtek 75cm³ szövetkultúra edényekben PrEGM mediumon (Clonetics) növekedtek 33°C vagy 39°C-on, megfelelő páratartalmú és 5%-os CO₂ koncentrációjú környezetben. Immunhisztokémiai vizsgálatra a sejteket fedőlemezen tenyésztettük, majd felhasználás előtt PBS-sel lemostuk és formalinos oldattal fixáltuk. Az immunhisztokémiai vizsgálat további részét a szöveteknél vázolt módon végeztük (ld. 5.2. fejezet).

A TURP mintákból származó BPH-s szövetmintákról a termikus károsodást szenvedett részeket és a szennyeződést eltávolítottuk. A szövetmintákat formalinos oldatban fixáltuk, majd dehidráció után paraffinba ágyasztuk és szobahőmérsékleten tároltuk felhasználásig. A metszetek készítését és immunhisztokémiai vizsgálatot az alábbiakban leírt módon végeztük.

5.2. Immunhisztokémia

A szobahőmérsékleten tárolt blokkok metszése és tárgylemezre felvitele után a metszeteket vagy HistoClear® oldatba vagy xilolba mártottuk 2 alkalommal 3 percig paraffinmentesítés céljából. Előtte azonban a metszeteket 20 percig inkubáltuk 60C fokon, hogy a paraffintól könnyebben megszabaduljunk. A paraffinmentes metszeteket fokozatosan híguló alkohol oldatokba helyezve rehidráltuk. Az utolsó mosás mindig teljesen alkoholmentes desztillált vizet tartalmazott. A formalin fixáció okozta fehérje konformáció változás következtében fellépő antigén elfedés miatt (masking) antigén visszanyerést végeztünk (unmasking). A Vector Labs által gyártott savas vegyhatású, citromsav alapú Vector Unmasking Solution oldat használatával a metszeteket 30 percig 800W teljesítmény mellett mikrohullámú sütőben forraltuk. 15ml Vector Unmasking Solution oldatot használtunk 1600ml desztillált vízben. A metszeteket egy óráig hagytuk hűlni szobahőmérsékleten, majd PBS-ben mostuk le 5 percig. A Dako által forgalmazott viaszos tollat használtunk a metszetek pontos körberajzolásához. Ez azért volt fontos, hogy a festés során a primer és secunder antitestet és a többi reagenst is a legkisebb még szükséges mennyiségben tudjuk alkalmazni. Az immunhisztokémiai festéseknél mindig használtunk negatív (primer antitest nélküli) és pozitív (biztosan festődő antigének-pl. aktin) kontrollt. A metszeteket minden esetben ceruzával jelöltük meg a festés megkezdése előtt. A torna-peroxidáz festési eljárásnál az endogén peroxidáz reakciót tíz és harminc perc közötti 0.3%-os hidrogén-peroxid oldatban

történő áztatással blokkoltuk, majd ismét PBS-ben mostuk le. A fehérje helyeket 1 óráig tartó 10%-os bovine-PBS (phosphate-buffered saline) oldattal blokkoltuk (általában a másodlagos antitestet termeltető állatfajból származó szérumát használjuk). Ezután a metszeteket a primer antitestekkel (primary antibody) inkubáltuk 4°C-on 12 órán keresztül. Következő lépésként a metszeteket 3-szor 5 percig PBS-ben öblítettük le. A vizsgálat során használt primer antitestek listáját az 2. és 3. táblázat tartalmazza. A metszeteket ezután a másodlagos antitestekkel (secondary antibody) reagáltattuk 30 percig 1:200-as hígításban. Immunhisztokémiai vizsgálatra vagy biotin konjugált anti-egér IgG (Vector Labs) vagy biotin konjugált monoklonális anti-nyúl immunglobulint (Sigma) használtunk, attól függően, hogy milyen állatból származott az elsődleges antitest. Fluorescens festéshez FITC vagy TRITC konjugálta immunglobulin alosztály specifikus másodlagos antitesteket (Southern Biotechnology Associates, Inc.) használtunk. A nucleusok háttérfestését 5 percig tartó 1 µg/ml koncentrációjú Hoechst 33258 festékkel végeztük. A primer antitestek színének megjelenítéséhez avidin-biotin-torma peroxidáz (HRP) reakciót (Vector ABC Elite Kit) vagy avidin-biotin-alkalikus-foszfátáz reakciót (Vector ABC-AP Kit) használtunk 30 percig (az A és B komponenst PBS puffer oldattal összekevertük, és 30 percig állva hagytuk), majd a metszeteket PBS oldatban mostuk le 5 percig. A metszeteket 2-30 percig enzim-szubsztrát kromogénnel reagáltattuk, melyek vagy Vector DAB (diaminobenzidin) vagy Novared vagy Vector Blue kromogének voltak. A kromogénnel történő előhívást állandó szemellenőrzés mellett végeztük a túl erős festődés elkerülése érdekében. Háttérfestésnek hematoxilint vagy metilénzöldet használtunk rövid ideig. Ismét 10 perces öblítés következett PBS oldatban, majd a metszeteket fokozatosan töményülő alkohol-víz oldatban („felszálló alkoholsoron”) dehidráltuk. Histoclear®-ben történő mosás után a metszeteket fedőlappal lefedtük. Mowiol 4-88 vagy DPX-et használtunk a rögzítéshez, immunfluoreszcens technikánál Gelvatolt (Monsanto, St Louis, MO, USA) használtunk. Száradás után a főleg Mowiol 4-88-et és a DPX-et acetonnal távolítottuk el. A kész metszeteket feldolgozásig fénymentes helyen, szobahőmérsékleten tároltuk.

2. Táblázat A vizsgálatunkban felhasznált antitestek adatai I (PSA - prosztata specifikus antigén, PNA - peanut agglutinin, PAP - prosztatikus acid-foszfátáz)

A vizsgálatban használt antitestek adatai I.

Antitest	Izotípus	Klón	Hígítási arány	Beszerzési forrás
----------	----------	------	----------------	-------------------

Citokeratin 5/6	Egér IgG1	MAB1620	1:200	Chemicon
Citokeratin 8	Egér IgM	35βH11	1:40	Dako
Citokeratin 14	Egér IgG3	LL002	1:50	Novocastra
Citokeratin 17	Egér IgG2b	E3	1:200	Dako
Citokeratin 18	Egér IgG1	LE61	1:10	Dako
Citokeratin 19	Egér IgG2b	LP2K	1:10	Ajándék EB Lane- tól
Laktoferrin	Nyúl	A0186	1:100	Dako
Androgén receptor	Egér IgG1	MU256-UC	1:250	Affinity Biogenex
Ki-67	Nyúl	A0047	1:50	Dako
PNA (biotinnal konjugált)	Lectin	B-1075	1:5000	Vector
Chromogranin A	Egér IgG2b	DAK-A3	1:500	Dako
Szerotonin	Egér IgG1	5HT-H209	1:50	Dako
PSA	Egér IgG1	Er-PR8	1:25	Dako
PAP	Egér IgG1	PASE/4LJ	1:100	Dako
Dezmin	Egér IgG1	DE-U-10	1:200	Sigma
Simaizom α-aktin	Egér IgG2a	1A4	1:1000	Sigma

5.2.1. TUNEL teszt

A programozott sejthalál vizsgálatának egyik legszélesebb körben elfogadott módszerét alkalmaztuk, a TUNEL tesztet. Az apoptózis vizsgálatához az apoptózis szignál kaskádjának hatására bekövetkező DNS fragmentáció kimutatását használtuk. Az módszer lényege, hogy jelölt dUTP molekula kötődését a DNS fragmentumok végéhez terminális deoxinucleotidil transferáz enzim segítségével katalizálva kapcsoljuk. A jelölt dUTP kimutatható megfelelő festési technikával. Az apoptózis vizsgálatához TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling) technikát alkalmaztunk torna-peroxidáz/DAB festéssel. A festés során az in situ kithoz mellékelt instrukciókat követtük (Sigma, APO-TH). Röviden a következőket végeztük. Paraffinmentesítés előtt a metszeteket 60 fokra melegítettük. A metszeteket deparaffinizáltuk Histoclear® oldatban vagy xilolban 15 percig folyamatos mozgatás mellett. A paraffinmentes metszeteket fokozatosan híguló alkohol oldatokba helyezve rehidráltuk, majd DNáz-mentes vízben öblítettük le. A metszeteket Dako jelölő viaszos tollal körberajzoltuk. A szövet permeabilitásának biztosítása céljából 50µL 1:50 hígítású Proteináz K oldatot cseppentettünk rá, majd a lefedtük 15 percig. A metszeteket ezek után a kitből származó terminális deoxinucleotidil transferáz (TdT) enzimmel reagáltattuk 37C fokon 60 percig. Ezután TdT stop oldatot használtunk 5 percig, mely az enzimet további működését blokkolja. Ismételt PBS öblítést követően streptavidin HRP detekciós kittet helyeztünk fel 10 percre, miközben hidrofób fedőlemezt alkalmaztunk. Ismételt öblítés után diaminobenzidin oldatot (DAB) használtunk a HRP előhívására 2-10 percig állandó szemellenőrzés mellett. A DAB oldat lemosása után háttérfestésnek hematoxilint használtunk. Dehidrálás után a metszeteket fedőlemezzel fedtük.

3. Táblázat. A vizsgálatban használt primer antitestek adatai II.

Antitest	Klón	Hígítás	Forrás
anti-CD44v3	VFF-327	1:100	Serotec, Oxford, UK
anti-CD44v5	VFF-8	1:100	Serotec, Oxford, UK
anti-CD44v6	VFF-7	1:100	Serotec, Oxford, UK
anti-CD44v7/8	VFF-327	1:100	Serotec, Oxford, UK
anti-CD44v10	VFF-14	1:100	Serotec, Oxford, UK

5.3. Pontozási rendszer és statisztikai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai metszeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk meg. Minden területről legalább három digitális képek készítettünk (Nikon Coolpix 995, Olympus BX50 mikroszkóp) véletlenszerűen 200x nagyításban. Az immunfluoreszcens festéseket ívfényű Zeiss Axiophot mikroszkóppal tanulmányoztuk. Ez a mikroszkóp Photonic Science Coolview 12 (1024x1024 CCD) kamerával volt felszerelve (Photonic Science, Robertsbridge, UK), melyet Image ProPlus 3.0 szoftverrel (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) lehet kezelni. Ezzel a fényképezővel készített digitális képeket Adobe Photoshop 4.0 szoftverrel elemeztük. A három rögzített csatorna képét a szoftver segítségével egyesítettük. Minden területben a festődött és a nem festődött sejtek magjait számoltuk meg. A számolás befejeztével, a területre jellemző átlagot vettük. A átlag értékeket nem-paraméteres Mann-Whitney U-test segítségével hasonlítottuk össze. A statisztikai adatok rögzítéséhez Microsoft Office Excel-t, az elemzéshez pedig SPSS for Windows v11.0 szoftvert (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) használtunk.

A festődést a következőképpen vizsgáltuk. A pozitív színreakciót adó sejtek háttérfestése során a sejtmag jól kirajzolódott. A sejtmagok számolásával tudtuk összehasonlítani a pozitívan és a negatívan festődő sejteket. Koexpressziós vizsgálatot minden esetben fluoreszcens technikával végeztünk. Ilyenkor Hoechst-tel festettük a magokat, és ekkor is a sejtmagokat számoltuk meg. A mesenchymális sejtek vizsgálatánál a következőket vettük alapul: az SMA a myofibroblast és a simaizomsejteket, a dezmin a simaizomsejteket festik. A fibroblastok nem expresszálják sem a dezmint, sem az aktint (4. táblázat).

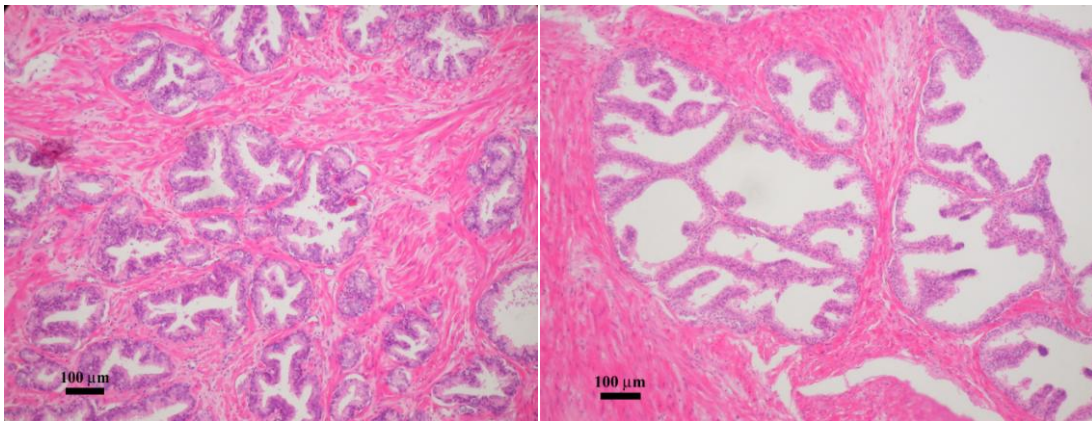
4. Táblázat A mesenchymális sejtek elkülönítése immunhisztokémiai eljárással.

	SMA (simaizom aktin)	Dezmin
Simaizomsejtek	Pozitív	Pozitív
Myofibroblastok	Pozitív	Negatív
Fibroblastok	Negatív	Negatív

6. Eredmények

6.1. Morfológiai elemzés

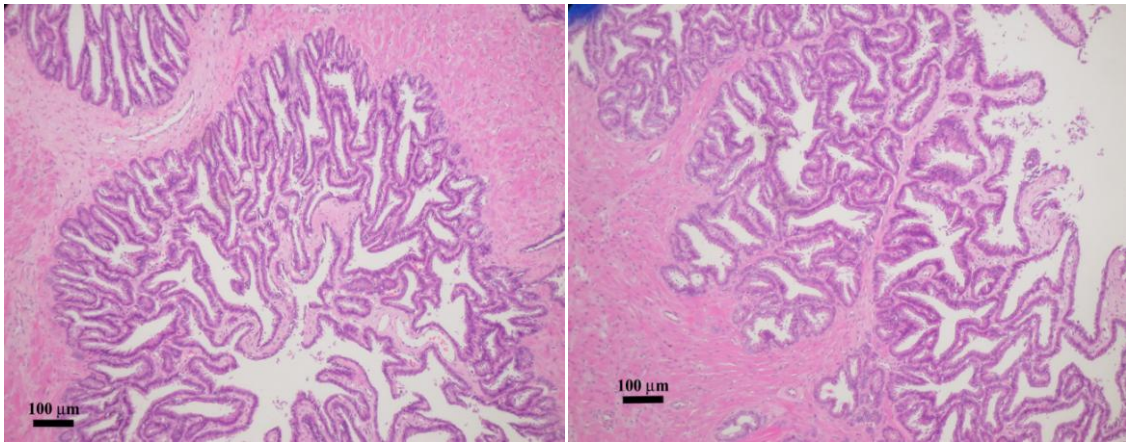
Hematoxilin és eozin festést használva a perifériás és a centrális zóna morfológiai tulajdonságaik és anatómiai jellemzőik alapján különböztethetők meg. A perifériás zónában a mirigyek relatíve kicsik, kerekék és a stroma simaizom rostok lazán elrendezett hálózatából áll (8. ábra).



8. Ábra. H&E festés a perifériás (bal oldali kép) és a centrális zónában (jobb oldali kép).

A centrális zóna hámrétege nagy acinusokból áll, melyek relatíve négyszög alakúak a keresztmetszeti képen. Az acinusokat szorosan egymás mellé rendezett simaizom elemek választják el, melyek a mirigy határáig helyezkednek el (9. ábra). A centrális zóna a ductus ejaculatoriusokat veszi körbe. A tranzicionális zóna szerkezetében hasonlít a perifériás zónára.

A vesicula seminalisok (SV) megjelenése eltér a prosztatától. A bazális sejtek kerekék és nem képeznek folytonos réteget az epithéliumban. Ezáltal a lumenális és bazális sejtek kevésbé különíthetők el (9. ábra).

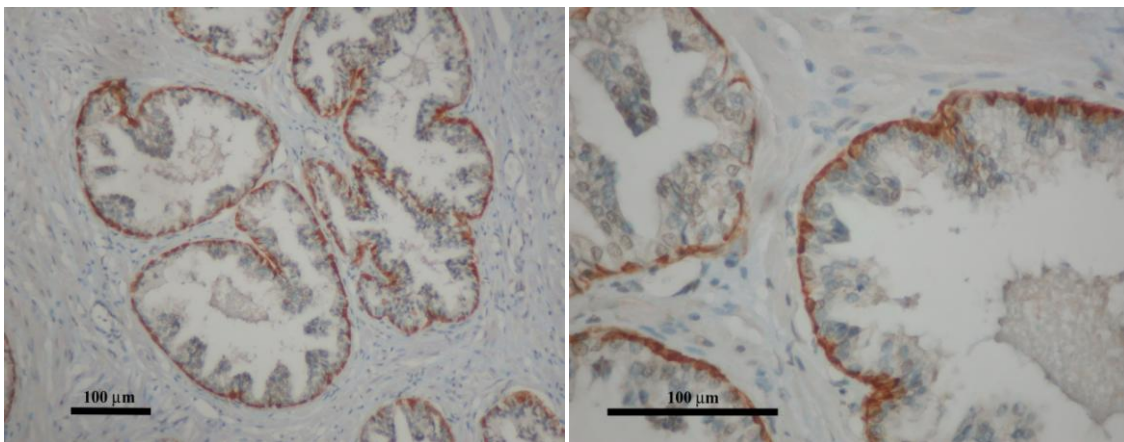


9. Ábra. H&E festés a vesicula seminalisban (100x nagyítás).

6.2. Citokeratin expresszió

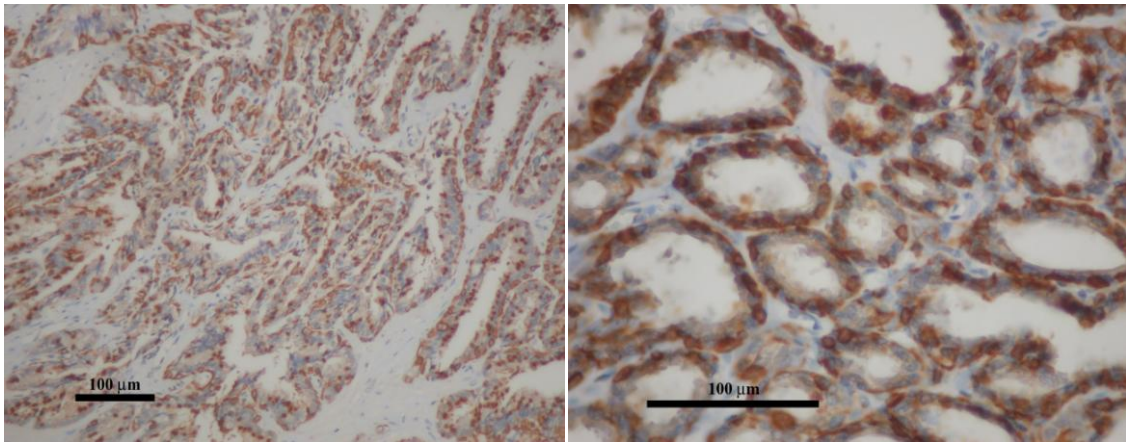
6.2.1. Citokeratin festés – bazális markerek

A citokeratin 5 a bazális sejteket festette egységesen a prosztata epitheliumában, egy folytonos réteget alkotva (10. ábra). A luminális sejtek nem festődtek. A 10. ábrán jól látható a prosztata epitheliumánál elkülönülő két sejtrétege.



10. Ábra. Citokeratin 5 festődés a perifériás zónában. Jól látható az ellapult folytonos bazális sejtréteg és a nem festődő luminális sejtréteg (DAB + hematoxilin háttérfestés; 200x nagyítás).

A vesicula seminalisban a festődés foltos volt, nem képeztek a festett sejtek egy folyamatos réteget (11. ábra).



11. Ábra. Citokeratin 5 expresszió a vesicula seminalisban. A kuboidalis bazális sejtek nem képeznek folytonos sejtréteget, a festés „foltos” és nem folyamatos, mint a prosztatában (DAB + hematoxilin háttérfestés; jobb oldali kép 200x, bal oldali 100x nagyítás).

A citokeratin 14 festődés a prosztatata epitheliumában nem volt folytonos és hiányzott a vesicula seminalisban (12. ábra). A citokeratin 17 erősen expresszáldott a prosztatata epitheliumának egyes területein, de ennek a mintázatnak anatómiai okát nem találtuk. A CK 17 expressziójának vizsgálatakor a prosztatata zónái között nem találtunk különbséget (13. ábra). A prosztatata epitheliumában a CK17 pozitív sejtek aránya 20.4% volt. A citokeratin 19 expressziója sem volt folytonos és csak a bazális sejtrétegben volt kimutatható (13. ábra). A CK19 expresszálo sejtek aránya valamivel alacsonyabb volt, mint a CK14 pozitív sejtek aránya (24.0%), de valamivel magasabb, mint a CK17 expresszálo sejtek aránya. A prosztatata zónái között nem volt statisztikailag jelentős különbség. A prosztatata epitheliumában a legnagyobb arányban a CK5 expresszálo sejtek voltak (38%), ezt követték a CK14 pozitív sejtek (24%), majd a CK17 expresszálo sejtek (20.4%). Ezek alapján a bazális sejteket a CK5-tel tudtuk legnagyobb arányban kimutatni.

A CK8 és CK18 nem expresszáldott a bazális sejtekben sem a prosztatában, sem pedig a vesicula seminalisban.

6.2.2. Citokeratin expresszió – luminális sejtek

A citokeratin 8 és 18 expressziója a luminális sejteken volt észlelhető. Nem észleltünk CK8 és CK18 pozitív sejteket a bazális sejtrétegben. A vesicula seminalisban

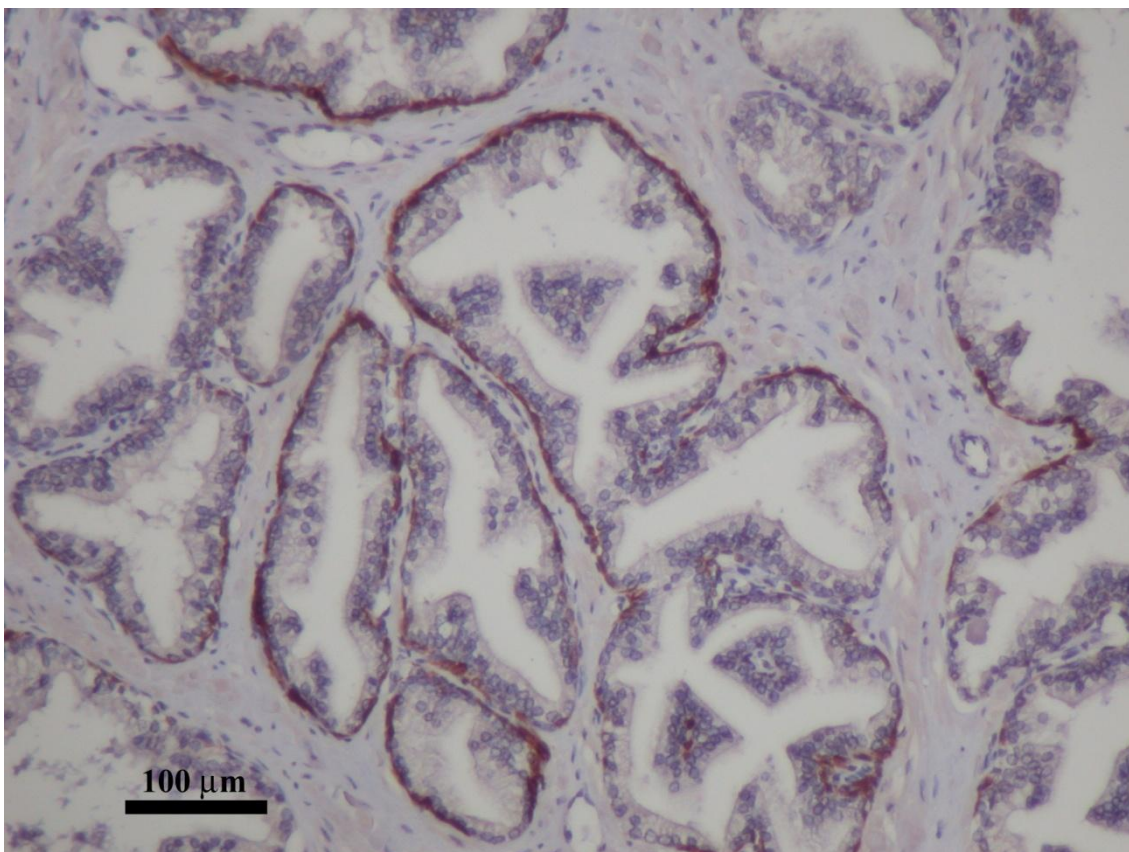
a luminális szekretoros sejtek expresszálták a CK8 és CK18 markereket. A luminális és bazális sejteket a citokeratin festés alapján jól el lehet különíteni, a prosztatata összes zónájában. A CK8 és CK18 festődése alapján nem találtunk különbséget a zónák között.

6.2.3. A luminális és bazális sejtek aránya

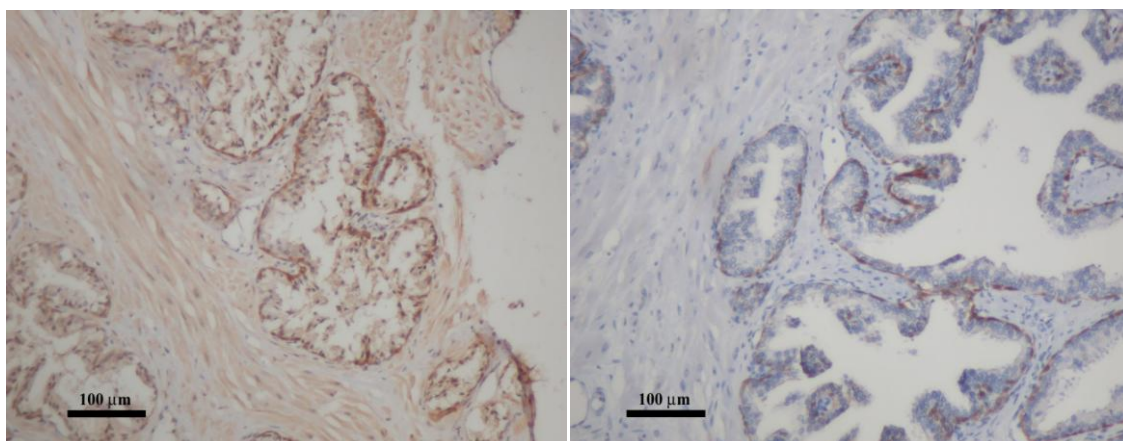
A prosztatata minden egyes zónájában és a vesicula seminalisban is kiszámítottuk a luminális a bazális sejtek arányát (5. táblázat). A bazális sejtek a CK5-tel festődő sejtek adták, a nem festődő sejtek, pedig a luminális sejteket reprezentálták. A zónák között nem volt szignifikáns különbség. Az egyetlen statisztikailag szignifikáns különbség a sejtek arányában a perifériás zóna és a vesicula seminalis között volt. A vesicula seminalisban a luminális sejtek aránya alacsonyabb volt. A prosztatában a luminális és bazális sejtek arányát átlagosan 2.63-nak találtuk, azaz az epitheliumban a CK5 pozitív sejtek átlagos előfordulási aránya 38% volt.

6.3. Neuroendokrin markerek

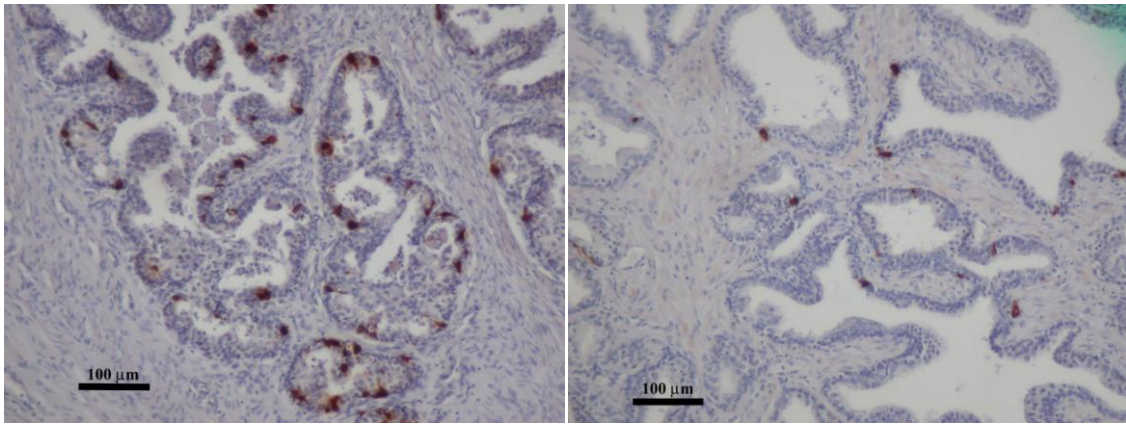
A neuroendokrin sejtek festését anti-chromogranin A-val és anti-serotoninnal végeztük. A neuroendokrin sejtek hiányoztak a vesicula seminalisokból és ductus ejaculatoriusokból. Ezzel szemben nagy számban találtunk neuroendokrin sejteket az utriculus prostaticusban. Jelentős számú NE sejtet észleltünk a periurethrális területen (14. ábra). Ez utóbbiban a sejtek aránya az epitheliumban 8% körül volt. A prosztatata három zónájában a neuroendokrin sejteket a fent említett két neuroendokrin markerrel vizsgáltuk. A prosztatata összes zónájának epitheliumában átlagosan a sejtek kb. 1-2%-a volt neuroendokrin irányú differenciáltságú sejt. A neuroendokrin sejtek gyakorisága a centrális zónában 50%-kal alacsonyabb volt, mint az átmeneti és a perifériás zónában és ez a különbség statisztikailag is szignifikáns volt. A serotoninnal és a chromogranin A-val jelölt sejtek aránya nem különbözött, és ez a zónák között sem mutatott eltérést (5. táblázat).



12. Ábra. Citokeratin 14 marker expresszió a perifériás zónában (DAB + hematoxin háttérfestés, 200x nagyítás).



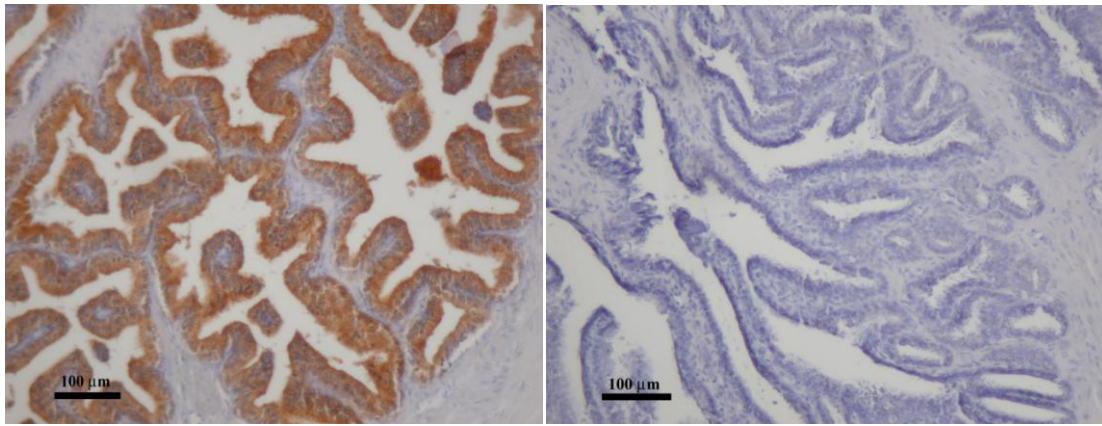
13. Ábra A citokeratin 17 expressziója (bal oldali kép) és a citokeratin 19 (jobb oldali kép) expressziója a perifériás zónában (DAB és hematoxin háttérfestés, 100x nagyítás).



14. Ábra Chromogranin A expresszió a periurethrális régióban (bal oldali kép) és a perifériás zónában (jobb oldali kép). (DAB és hematoxin háttérfestés, 100x nagyítás).

6.4. Funkcionális markerek vizsgálata

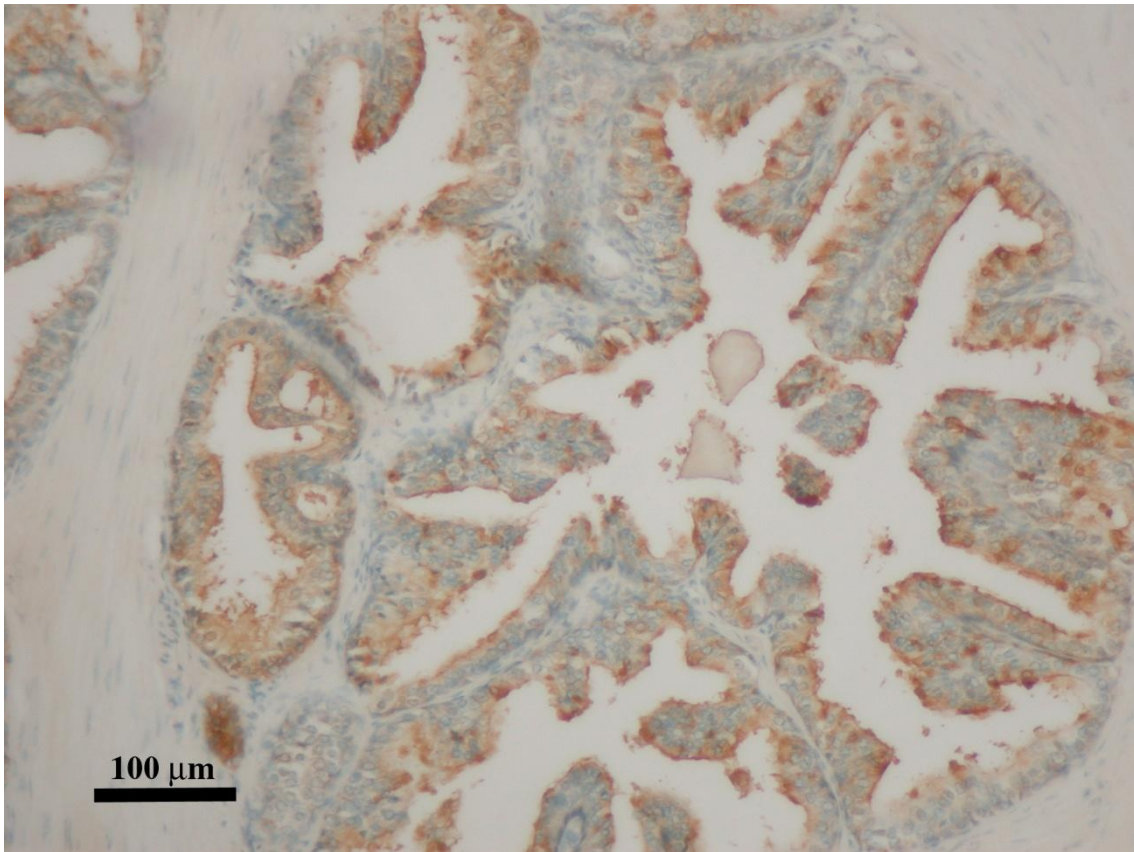
A prosztata specifikus antigén (PSA) a luminális sejtek citoplazmájában erős pozitív reakciót adott, de sem a prosztata bazális sejtjeiben, sem a vesicula seminalis luminális sejtjeiben sem pedig a ductus ejaculatoriusban nem expresszáldott. A prosztatikus acid-foszfátáz (PAP) expressziója hasonló volt a PSA-hoz a prosztatában és ez sem mutatott expressziót a vesicula seminalisban és a ductus ejaculatoriusban. A festődés jellemzően a szekretoros luminális sejtek apikális, lumen felőli részén volt a legerősebb, mely a prosztata szekretoros granuláit (PSG) tartalmazza. Az androgén receptor erősen és egységesen expresszáldott a prosztata luminális sejtjeinek sejtmagjában és a vesicula seminalis sejtjeiben is. A prosztata három zónája között nem észleltünk eltérést az expressziót illetően. Az egyetlen eltérés a prosztata és a vesicula seminalis között volt látható a funkcionális markerek vonatkozásában.



15. Ábra PSA expresszió a centrális zóna luminális sejtjeiben (bal oldali kép). A PSA nem expresszálódik a vesicula seminalis sejtjeiben (jobb oldali kép; DAB + hematoxin háttérfestés, 100x nagyítás).

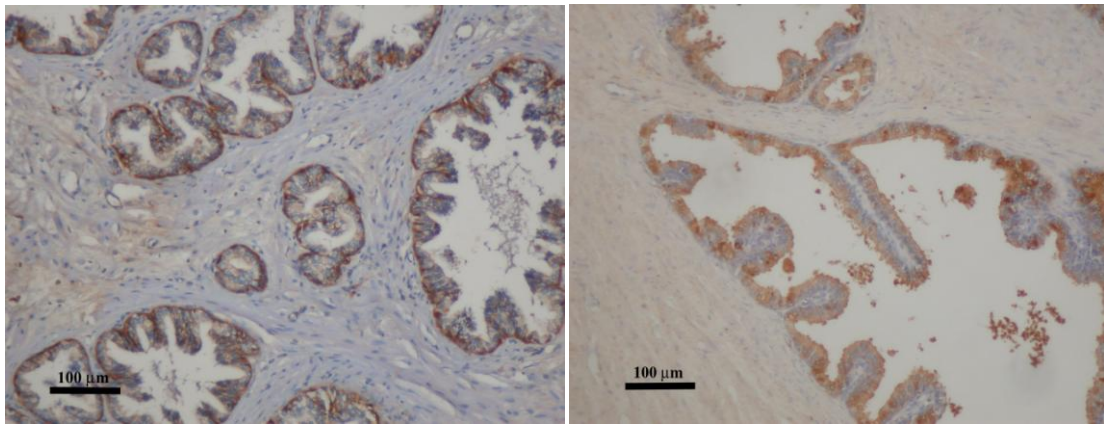
6.5. Zónára jellemző markerek

A peanut (mogyoró) agglutinin (PNA) szelektíven kötődik a sejtek felszínén elhelyezkedő proteoglikán molekulák Gal β 1,3GalNAc szénhidrát csoportjához (Hudson és mtsai 1995). Vizsgálatunkban biotinnal konjugált PNA-t használtunk a korábbi szerzők munkájához hasonlóan. A prosztatata mindhárom zónájának és a vesicula seminalis egyes luminális és bazális sejtjei is marker pozitívak lettek. A festődés erőssége és a pozitív sejtek gyakorisága is eltért. A perifériás zónában a festődés intenzitása erősebb volt a bazális sejtrétegben, míg a centrális zónában a festődés a luminális sejtrétegben volt intenzívebb (16. ábra). A vesicula seminalisban az expressziót mutató sejtek nagy része a luminális sejtrétegben volt. A perifériás és a tranzicionális zónában mindkét sejtrétegben közel azonos számú sejt festődött (17. ábra). A PNA festés csak az epitheliumra korlátozódott, a stroma elemekben expressziót nem észleltünk (5. táblázat).



16. Ábra PNA kötődés a prosztata centrális zónájában (200x nagyítás; DAB + hematoxilin háttérfestés).

Az erősen baktericid hatású laktoferrin korábbi vizsgálatok szerint legerősebben a vesicula seminalisban és a centrális zónában expresszálódik. A mi vizsgálatunkban erős festődést észleltünk a vesicula seminalis luminalis rétegében és valamivel gyengébb festődést láttunk a centrális zónában (17. ábra). A festődést csak szemikvantitatív módszerrel határoztuk meg. A laktoferrin expresszió a luminális sejtek apikális 1/3-ban volt a legerősebb a prosztatában és az ondóhólyagban egyaránt. A vesicula seminalis epitheliális sejtjeinek több mint 70%-a volt pozitív laktoferrin festésre, míg ez az arány 31.2% volt a centrális zónában és 2.1% a perifériás zónában. Úgy tűnik, hogy a laktoferrin a perifériás zónában szinte nem is expresszálódik, azaz a perifériás zóna nem szekretálja ezt a proteint. Ez a különbség statisztikailag is jelentős volt mindhárom terület között. A tranzicionális zónában nem sikerült értékelhető eredményt elérni ezzel a festéssel. A PNA-hoz hasonlóan a laktoferrin nem expresszálódott a stromában.

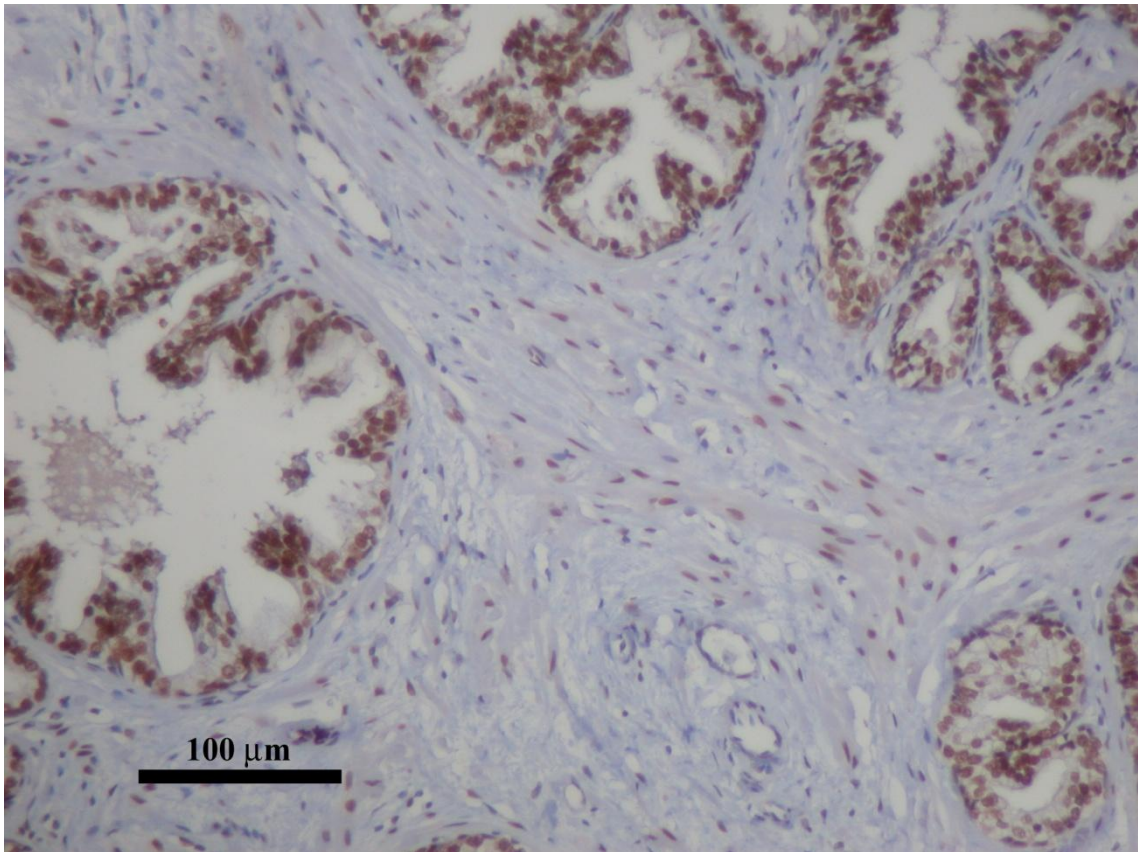


17. Ábra A PNA (peanut agglutinin) kötődése a perifériás zóna bazális sejtrétegéhez (bal oldali kép; 100x nagyítás). Laktoferrin ellenes antitest festés a prosztatában (jobb oldali kép; 100x nagyítás; DAB + hematoxin háttérfestés).

6.6. Mesenchymális sejtmarkerek

6.6.1. Androgén receptor expressziója a stromában

Az androgén receptor (AR) expresszióját vizsgáltuk a prosztatában és a vesicula seminalis stromájában. A stromában nem vizsgáltuk a vascularis elemek, a nyirokelemek és a neuronok festődését. Az AR a sejtek magjában expresszálódott (18. ábra). A prostata három zónája és a vesicula seminalisok között nem találtunk statisztikailag különbséget (6. táblázat). A simaizomsejtek és a mesenchymális sejtek festődése között sem észleltünk különbséget az AR expressziójának erősségét és a sejtek számát illetően. Ahogy az a táblázatból is jól látható a sejtek közel 50%-a (43-53%) pozitív volt AR festésre. A vesicula seminalis stromájában a sejtek nagyobb arányban expresszálták az androgén receptort, de ez lényegesen nem különbözött a prostata zónáitól. A prosztatában a stroma sejtjeinek 45%-a volt pozitív AR-ra.



18. Ábra Androgén receptor expresszió a prosztata perifériás zónájában (200x nagyítás; DAB + hematoxin háttérfestés).

6.6.2. Az SMA, dezmin és vimentin expresszió a stromában

Megfigyelésünk szerint a prosztatában a simaizomsejtek expresszálják a simaizom α -aktint (SMA) és a dezmint, de a fibroblast sejtek ritkán pozitívak. A myofibroblastok is pozitívak SMA-ra. A dezmint csak a simaizomsejtek expresszálták. Tehát a három sejtípus e két markerrel különíthető el. A centrális zóna stroma sejtjei nagyobb számban voltak pozitívak SMA-ra, mint a tranzicionális és perifériás zóna stromális sejtjei. Ez a különbség statisztikailag is jelentős volt. Tehát ebben a két zónában (TZ és PZ) a simaizomsejtek száma alacsonyabb, mint a centrális zóna hasonló sejtjeinek a száma. Különös módon az ondóhólyag ebben a tekintetben inkább a PZ-hoz és TZ-hoz volt hasonló. A dezmin expresszió a vesicula seminalis mesenchymális sejtjeiben volt a leggyakoribb. A dezmin expressziója az ondóhólyag stromában volt a legmagasabb, 72.6% (átlag), míg a prosztatában 61.4%. A különbség statisztikailag is jelentős volt. Az aktin expresszáló sejtek aránya a prosztata stromában 60.5% és a vesicula seminalisban

61.1%. Az azonos zónákban a dezmin és az aktin expressziója között nem volt különbség. Ezzel a típusú módszerrel nem sikerült a prosztatában számottevő myofibroblast sejtet identifikálni.

6.7. Sejtkinetikai markerek

Vizsgálatunkban a Ki67-et használtuk a proliferáció tanulmányozására. A Ki67-tel festődő sejtek a perifériás és a tranzicionális zónában közel azonos számban voltak, arányuk körül-belül 0.8% volt. A centrális zónában és a vesicula seminalisban a pozitív sejtek ritkábban fordultak elő, arányuk 0.5% volt. A különbség statisztikailag szignifikánsan eltért. A Ki67 pozitív sejtek a prosztatata három zónájának stromájában közel azonos volt. A prosztatata stromájának proliferációs aktivitása kb. 50%-kal magasabb volt, mint a vesicula seminalis stromájának osztódási aktivitása. Az apoptotikus sejteket TUNEL teszttel tanulmányoztuk a prosztatata három zónájában. A pozitívan festődő sejtek dominánsan a luminális rétegben helyezkedtek el. Az epitheliális sejtek apoptózis indexe kb. 2% volt a perifériás (2.2%) és a tranzicionális zónában (2.1%), míg a centrális zónában ez az érték 0.9% volt. A különbség statisztikailag szignifikánsan eltérő volt, mind a CZ és PZ, mind pedig a CZ és TZ vonatkozásában (6. táblázat). A TUNEL tesztet nem sikerült kivitelezni a vesicula seminalison, mivel ezek a metszetek leáztak a tárgylemezről a festés során.

Vizsgálatunk során a proliferációs aktivitást tanulmányoztuk a bazális sejtekben, melyet CD44-gyel, CK14-gyel és CK19-cel jelöltünk. A CD44 expresszáló sejtekben a proliferációs aktivitás a perifériás zónában vizsgáltuk. Az osztódást mutató sejtek 89%-a bazális sejtrétegben foglalt helyet. A CK14 pozitív sejtek proliferációs aktivitása a tranzicionális zónában volt a legmagasabb (2.1%), míg a centrális zónában 1%. A két zóna között statisztikai különbséget észleltünk. A perifériás zónában ugyanez az érték 1.8% volt, de statisztikailag nem különbözött a másik két zónától. A vesicula seminalis negatív volt CK14 festésre. A centrális zóna tartalmazta a legnagyobb arányban a CK19 és Ki67 pozitív sejteket (1.4%), de a zónák között nem volt statisztikai különbség.

5. Táblázat A citokeratin, neuroendokrin és zonális markerek festési eredményei. Az eredmények százalékban vannak feltüntetve (átlag \pm átlag szórása [standard error of mean, SEM], NEG – negatív, N/A – nincs adat).

	Vesicula seminalis	Centrális zóna	Perifériás zóna	Tranzicionális zóna
Bazális sejtek (az epitheliális sejtek %-ban)				
Citokeratin 5	34 \pm 1.1	31.1 \pm 1.8	26.8 \pm 2.0	32.2 \pm 1.9
Citokeratin 14	NEG	20.9 \pm 2.1	26.3 \pm 2.7	26.3 \pm 4.0
Citokeratin 19	25.9 \pm 3.6	23.6 \pm 1.5	24.3 \pm 4.7	24.4 \pm 5.6
Neuroendokrin sejtek (az epitheliális sejtek %-ban)				
Chromogranin A	NEG	0.93 \pm 0.12	1.4 \pm 0.24	1.6 \pm 0.12
Szerotonin	NEG	0.87 \pm 0.16	1.6 \pm 0.37	1.9 \pm 0.17
Zóna specifikus markerek				
Laktoferrin (az epitheliális sejtek %-ban)				
PNA (bazális sejtek %-ban)	74.2 \pm 8.9	31.2 \pm 8.6	2.1 \pm 1.0	N/A
PNA (luminális sejtek %-ban)	2.4 \pm 1.0	9.4 \pm 4.1	37.4 \pm 3.1	31.6 \pm 1.6
PNA (luminális sejtek %-ban)	62.9 \pm 2.0	53.8 \pm 9.3	43.1 \pm 7.6	24.1 \pm 11.5

6. Táblázat. A stroma és a sejtkinetikai festések eredményei. Az eredmények százalékban vannak feltüntetve (átlag \pm átlag szórása [standard error of mean, SEM], NEG – negatív, N/A – nincs adat).

	Vesicula seminalis	Centrális zóna	Perifériás zóna	Tranzicionális zóna
Stroma sejtek (a stroma sejtek %-ban)				
Androgén receptor	53.5 \pm 4.1	43.4 \pm 5.6	44.9 \pm 4.3	46.6 \pm 6.2
Dezmin	72.6 \pm 3.5	63.1 \pm 1.6	62.3 \pm 0.9	58.9 \pm 2.6
Simaizom α-aktin	61.1 \pm 3.2	68.5 \pm 3.3	58.0 \pm 3.1	55.0 \pm 2.6
Proliferáció és apoptózis				
Ki-67 (az epitheliális sejtek %-ban)	0.49 \pm 0.14	0.50 \pm 0.05	0.81 \pm 0.08	0.79 \pm 0.02
Ki-67 (a stroma sejtek %-ban)	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.15	1.0 \pm 0.15	0.9 \pm 0.13
TUNEL (az epitheliális sejtek %-ban)	N/A	0.9 \pm 0.2	2.2 \pm 0.4	2.1 \pm 0.3

6.8. CD44 expresszió a prosztatában

A nyolc BPH-s mintákat CD44 v5 és CK14 és CK19 markerekkel vizsgáltuk. A sejteket itt is megszámloltuk. A CD44v5 expressziója mind a nyolc mintában pozitív volt. Számos területen a bazális sejtrétegben a CK14 és CD44 koexpressziója volt megfigyelhető. A CD44 v5 expressziója megfigyelhető volt az intermedier sejtrétegben is (az intermedier sejtek a luminális sejtek alatt, de a bazális sejtréteg felett elhelyezkedő sejteket tekintettük). Ezek a sejtek magasabbak, mint a CK14 pozitív bazális sejtek és láthatólag a bazális sejtréteget már elhagyták. Ezek a megfigyelések a korábbi megfigyelésekkel összhangban vannak (Hudson és mtsai 2001).

További normál prosztataszövetet is megvizsgáltunk a CD44 immunhisztokémiával. A prosztatata mind a három rétegében észleltünk CD44v5 expressziót és K14 festődést. Mind a BPH-s mind a normál prosztatata szövetben észleltünk K14 pozitív két rétegben elhelyezkedő sejteket, melyekről úgy gondoljuk, hogy bazális sejt hyperplasiás területek. Ezeken a területeken a CD44v5 fokozott

expresszióját észleltük. Néhány esetben találtunk CD44v5 negatív, CK14 pozitív bazális sejteket is. A minták mindegyikében a CD44 pozitív sejteket a lumen felől elfedték a luminális sejtek.

Más CK14 negatív sejtek is érdekes mintázatot mutattak egyéb prosztatata asszociált szövetben. A ductus ejaculatorius epitheliumában a bazális sejtek intenzíven expresszálták a CD44v5 és a CK19-et. A prostatikus urethra legkülső sejtrétegén kívül minden sejtrétege erősen festődött CD44 és minden rétege CK19 markerekkel. A prosztatata proximális kivezető csatornái, melynek az urethrához közel esnek és urotheliummal fedettek több réteg bazális sejtrétegből és egy réteg ellapult, esernyő sejtekből áll. Ezen a területen a CD44v5 erősen expresszálódott minden bazális sejten, de az ún. esernyő sejtekben nem. Azokon a területeken, ahol csak egy bazális sejtréteget sikerült azonosítani a sejtek CK19-cel festődtek.

A CD44 izoformok vizsgálatánál sajnos a CD44v10 festésnél nem volt értékelhető festődés egyik metszeten sem. A CD44 v4, v3 és v7/8 a v5-höz hasonló festődési mintázatot mutat. A CK14 pozitív sejtek a CD44 egyik izoformját sem expresszálták jellemzően, mely arra utal, hogy a CD44 minden izoformját a jobban differenciált K14 negatív sejtek expresszálják.

További immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk a prosztatata epithelium CD44 expressziójának vizsgálatára Pre2.8 benignus prosztatata sejtvonal és BPH sejtkultúra vonalak használatával. A sejtek proliferatív fázisában a gyenge CD44 expressziót figyeltünk meg a sejtkapcsoló szerkezetek (junctionalis complex) vizsgálatával. Helyenként gyenge CD44 v5 expresszió volt megfigyelhető. A sejtek differenciálódási fázisában a sejtek méretének növekedésével megjelentek a sejtfelszíni CD44 molekulák, melyek csaknem az összes sejten megjelent. A BPH sejtkultúrában a sejtek a differenciálódás különböző fokain vannak. A sejtek nagy részén a CD44 kimutatható. A CD44 v5 izoformja mutatta a legerősebb expressziót azokon a sejteken, melyek más sejtek (látszólag bazális) felett helyezkedtek el.

7. Megbeszélés

Vizsgálatunkban szövet és szerv specifikus markerek expresszióját vizsgáltuk a prosztatata különböző zónáiban és a vesicula seminalisban. A prosztatata anatómiai modelljénél a McNeal által leírt prosztatata anatómiát vettük alapul (McNeal 1981a, McNeal 1981b).

7.1. A bazális és luminális sejtek az epitheliumban

Citokeratin festést alkalmaztunk a bazális és a luminális sejtek elkülönítésére. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget e tekintetben a zónák között. A prosztatata mirigyhámjában kb. háromszor annyi luminális sejt volt, mint bazális sejt a prosztatata összes zónájában. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábbi citokeratinnal végzett tanulmányokkal (Wernert és mtsai 1986). A korábbi tanulmányok szerint a luminális sejtek mindegyike expresszálja a PSA-t és a PSAP-t, amit mi is igazoltunk a vizsgálatunkban. A zónák között itt sem találtunk különbséget a fenti két fehérje expresszióját tekintve. A PSA és a PSAP nem expresszálódott a vesicula seminalis luminális sejtjeiben.

7.2. Neuroendokrin sejtek a prosztatában

A neuroendokrin (NE) sejtek funkciója nem ismert. Számos tanulmány feltételezte, hogy a NE sejtek által termelt neuropeptideknek szerepe van a BPH vagy a prosztatatarák kialakulásában és progressziójában (Santamaria és mtsai 2002, Islam és mtsai 2002, Wernert és mtsai 1990, Bostwick és mtsai 2002). Megfigyelésünk szerint a perifériás és tranzicionális zónában a neuroendokrin sejtek száma azonos volt, míg a centrális zónában kevesebb sejtet figyeltünk meg, a vesicula seminalisban pedig nem találtunk neuroendokrin sejteket chromogranin A és szerotonin immunhisztokémiát használva. A chromogranin A pozitív sejteket vizsgálva a perifériás a centrális zónában statisztikailag szignifikáns volt a különbség ($P=0.019$; Mann-Whitney U-test). Santamaria és munkatársai kiszámolták a neuroendokrin sejtek arányát az egyes zónákban, feltételezve, hogy a szövetmetszetek az adott szövetet térben is megfelelően reprezentálják (sztereometria). Eredményeik szerint a neuroendokrin sejtek sűrűsége tízszer nagyobb volt tranzicionális zónában, mint a perifériás és centrális zónában. Mi

ezt a különbséget nem észleltük a zónák között, bár tény, hogy a szövetszövetmintáinkban kevesebb tranzicionális zónát jellemző mirigyállományt tudunk megkülönböztetni biztosan. Ezek ellenére a tanulmányozott átmeneti zónában nem sikerült jelentősen több neuroendokrin sejtet kimutatni.

A neuroendokrin sejtek különösen nagy számban fordultak viszont elő az utriculus prostaticus környékén. Itt a NE sejtek aránya tízszer nagyobb volt, mint a prosztata egyéb részein. Ez az eredmény teljesen összhangban van a korábbi kutatók eredményeivel (Islam és mtsai 2002, Wernert és mtsai 1990, Guy és mtsai 1998). Érdekes megjegyezni, hogy a NE sejtek a vesicula seminalis, a centrális zóna, perifériás zóna és az utriculus prostaticusban jelentősen eltérően expresszáldtak. Ez a különböző struktúrák eltérő embriológiai eredetére utalhat, de ennek pontos magyarázatát nem tudjuk.

7.3. A zonális markerek jelentősége

Két antitestet is használtunk, melyek zonálisan eltérő festődését már kimutatták korábbi vizsgálatokban. A laktoferrin a formalin fixált prosztata centrális zónájában erősebb, míg a perifériás és tranzicionális zónában gyengébb festődést mutat (Reese és mtsai 1992). Vizsgálataink hasonló eredményt mutatnak: a perifériás és a centrális zóna eltérő festődését mi is megfigyeltük. Immunhisztokémiai vizsgálatunk szerint a vesicula seminalis epitheliális sejtjeinek 3/4-e laktoferrin pozitív sejt. Korábbi vizsgálatok szerint a mogyoró agglutinin (peanut agglutinin) festés pozitív a centrális zónában, de negatív a perifériás zónában (McNeal és mtsai 1988). Vizsgálatunkban ugyan láttunk különbséget a zónák között mind intenzitásban, mind a pozitív sejtek arányában. Nem volt azonban a zónák közötti különbség olyan látványosan különböző, mint ahogy azt a korábbi szerzők leírták. A korábbi megfigyelésekkel ellentétben viszont, mi a centrális sejtek luminális sejtjeiben és a perifériás sejtek bazális sejtjeiben találtunk erős festődést. A korábbi leírások szerint a perifériás zóna sejtjei nem mutattak festődést.

Két másik antigénről is leírták, hogy a zónák epitheliumát különböző módon festi, ezek a pepszinogén II (Reese és mtsai 1988) és a szövetszöveti plazminogén aktivátor (tPA) (Reese és mtsai 1988). Mindkét antigén a centrális zónában erőteljes festődést mutattak, míg a perifériás zónában hiányoztak. A centrális zóna és a vesicula seminalis hasonló pepszinogén festődést mutattak, ellenben a plazminogén aktivátor igen kevés sejtet festett meg a vesicula seminalisban. Mi a tanulmányunkban formalinban fixált

mintákat használtunk, melyek a más szerzők által használt Bouins oldatos fixációjától eltért. A mi eltérő eredményeinket az eltérő szöveti fixációval is magyarázhatjuk.

7. Táblázat A McNeal által leírt prosztatata zonális anatómiájának immunhisztokémiai alátámasztása (Kobayashi és mtsai 1991, McNeal és mtsai 1988a, Reese és mtsai 1986, 1988, 1992)

	Vesicula Seminalis	Centrális Zóna	Stroma	Perifériás zóna	Tranzicionális zóna
Pepszinogén II	+	+		-	-
Lipokróm	+	+		+/-	+/-
Laktoferrin		+		-	+/-
tPA	+	+		-	-
α1-adrenoceptor		+/-		+	
Lektinek:					
• PNA	+	+		-	
• SNA	+	+		-	
• S-WGA	+	+		-	
Transzglutamináz				+	+
Endothelin					
ET_A-receptor			+		
ET_B-receptor		+			
K8, K18				Stroma:-	Stroma:+

Az α - és β -ösztrogén receptor (ER) eloszlása is különbözik a perifériás és a tranzicionális zónában. Két korábbi vizsgálatban az α -ER csak a perifériás zóna stroma sejtjeiben volt jelen (Leav és mtsai 2001, Tsurusaki és mtsai 2003). Ezzel ellentétben az β -ER a perifériás és a tranzicionális zónájának mind a stromájában, mind az epitheliumában is jelen van (Tsurusaki és mtsai 2003). Arra is van bizonyíték, hogy az α 1-receptorok különbözőképpen oszlanak el a prosztatata zónái között (Kobayashi és mtsai 1991).

McNeal és mtsai tíz különféle lektint használtak fel a prosztatata zónáinak, ill. a vesicula seminalis összehasonlítására (McNeal és mtsai 1988). Egyetlenegy kivételtől eltekintve a centrális zóna és a vesicula seminalis azonos módon festődött. Ezek az

eredmények is azt támasztják alá, hogy a két szövetnek azonos az embriológiai eredete, mindkettő a Wolff-csőből származik. Jelen vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a centrális zóna eltérően a vesicula seminalistól expresszálja a PSA-t és a PSAP-t a perifériás és a tranzicionális zónához hasonlóan. Továbbá a centrális zóna epitheliuma neuroendokrin sejteket is tartalmaz eltérően a vesicula seminalistól, bár kétségtelen, hogy a NE sejtek elfordulási aránya fele a perifériás zónáinak.

8. Táblázat A prosztata, ductus ejaculatorius és a prostaticus utriculus eltérő festődése korábbi szerzők nyomán (hivatkozást ld. szövegben).

	Prosztata	Ductus Ejaculatorius	Útrculus prostaticus
CK18	+++ (luminális)	++	+++
CK8	+++ (luminális)	+/- (fokális)	+++
SZEROTONIN	++	-	++
CHROMOGRANIN A	++	-	++
PROGESZTERON RECEPTOR	+++ (stroma mag) ++ (luminális)	-	++ (stroma sejtmag) ++ (epithelium citoplazma)
CK19	++ (fokális luminális és bazális)	++ (fokális)	+++
CK7	++ (bazális)	+++ (bazális és luminális)	+++ (foltos bazális)
PSA	+++ (luminális)	-	++ (luminális)
PAP	++ (luminális)	-	++ (luminális)
AR	++ (luminális és kevés bazális)	++ (luminális)	++ (luminális és kevés bazális)
CK14	+(bazális)	-	-
ER	+(stroma)+(bazális sejtek)	++ (luminális citoplazmatikus/apikális)	++ (bazális sejtmag)
CK5/6	++ (bazális)	++ (bazális)	++ (bazális)

7.4. A zónák és a vesicula festésének klinikai jelentősége

Újabb kutatási eredmények más antigének használatával is megerősítették a centrális zóna és a vesicula seminalis azonos embriológiai eredetét. Quick és mtsai (Quick és mtsai 2010) normál prosztata, BPH és prosztatarák szövet PAX-2 expresszióját vizsgálta. Amellett, hogy az immunhisztokémiai festések során a ductus ejaculatorius, a vesicula seminalis és a centrális zóna hasonló jellegzetességeket hordozott, a PAX-2 használatával lehetőséget láttak a prosztatarák elkülönítésére vesicula seminalis és ductus ejaculatorius epitheliumától. A kérdés azért is fontos, mivel

a prosztatata túbiopsziák során a prosztatatarákat nehéz elkülöníteni a vesicula seminalis és a ductus ejaculatorius normális hámjától. E két képlet felelős az álpozitív biopsziák nagy részéért (Leroy és mtsai 2003). Tekintve, hogy a prosztatata biopsziák kb. 5%-ban tartalmaznak vesicula seminalis vagy ductus ejaculatoriust a mintában (Coyne és mtsai 1987), az eltérő eredetű és immunhisztokémiai jellegzetességgel, de hasonló konvencionális hisztopatológiai megjelenéssel rendelkező struktúrák elkülönítése igen fontos. Leroy és mtsai a MUC6 expresszióját vizsgálva a prosztatát negatívnak, a ductus ejaculatoriust és a vesicula seminalis hámját viszont pozitívnak találták. Eredményeikben megjegyzik, hogy a mintázat szinte ellentétes a PSA festéssel, bár véleményük szerint a prosztatatarák elkülönítésére a DE-től és VS-től jobb módszer a MUC6 használata, mivel a PSA a magas grádusú daganatok 5-6%-ban negatív (Leroy és mtsai 2003, Bostwick és mtsai 1994).

7.5. Sejtkinetikai eltérések

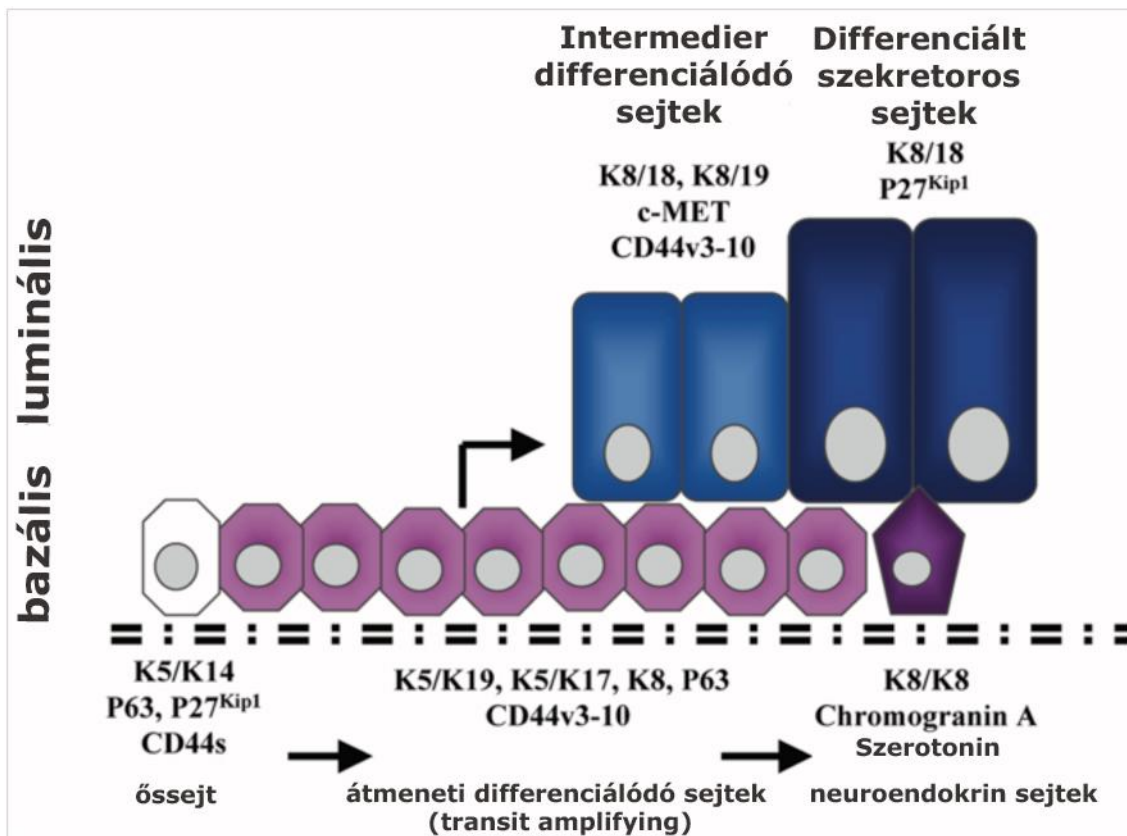
A perifériás és tranzicionális zóna magas fogékonysága a BPH és prosztatatarák iránt és a centrális zóna valamint a vesicula seminalis relatív ellenálló képessége a betegségeknek lehetséges, hogy a sejtkinetikai magyarázatai vannak. A sejtproliferációt jellemző Ki67-tel vizsgálva a mirigyhámot, a Ki67 pozitív sejtek aránya a centrális zónában és a vesicula seminalisban 50%-kal alacsonyabb, mint a perifériás zónában. Egy egész emberéletet tekintve ez a különbség a perifériás és átmenti zóna jóval magasabb osztódási arányát és megújulási ciklusát (turnover) jelenti. Az apoptózis index vizsgálata is hasonló eredményhez vezet. Bár a számok különböznek, hasonló különbséget figyelt meg korábbi vizsgálataik során Colombel és mtsai a perifériás zóna és a centrális zóna összehasonlításával (Colombel és mtsai 1998), viszont eredményeik szerint az átmeneti zóna sejtkinetikai jellemzői a centrális zónához hasonlítottak.

A centrális zóna mind a prosztatata perifériás zónájának mind a vesicula seminalishoz hasonló jellegzetességeket hordoz. A perifériás és átmenti zónához képest a centrális zóna alacsonyabb sejtmegújulási ciklusa a betegségek (prosztatatarák, BPH) alacsonyabb megjelenési arányával járhat együtt.

7.6. A CD44 expresszió vizsgálata a sejtdifferenciálódás folyamatában

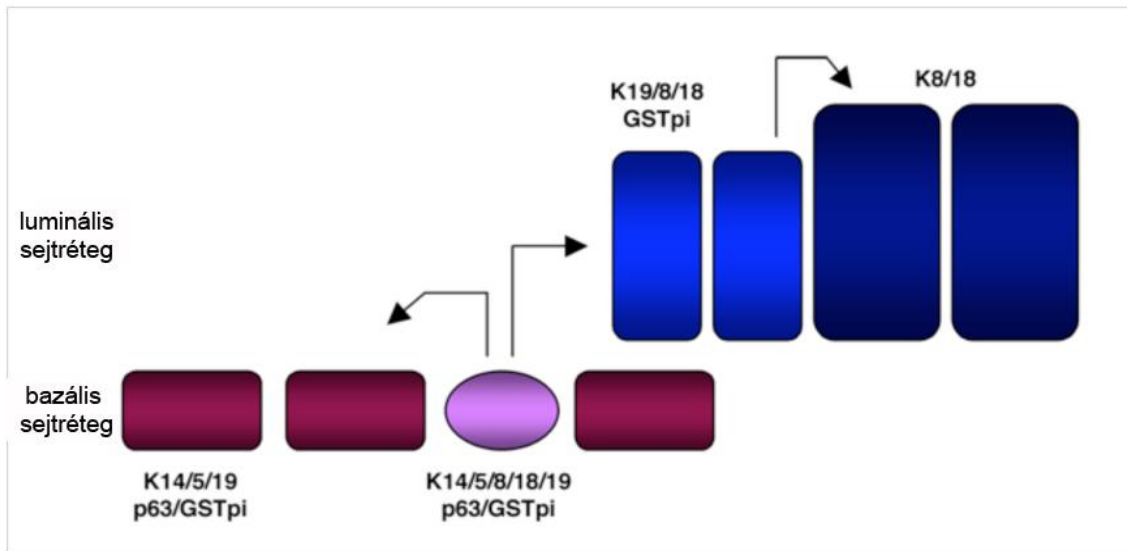
A prosztata a leggyakoribb helye a férfiak benignus és malignus megbetegedéseinek. A BPH és a prosztaták is a differenciálódásban és a proliferációban bekövetkező eltéréséből fakad. Számos szerző vizsgálta a prosztata epitheliumának differenciálódását (Isaac és mtsai 1989, Bonkhoff és mtsai 1996, Hudson és mtsai 2001), de kevés ismertünk van a normális prosztata epitheliuma növekedésének, fejlődésének és differenciálódásának kontrolljáról (20. ábra). Ezen ismeretek nélkül a beteg prosztata működésének és kialakulásának megértése szinte lehetetlen feladat.

A CD44 expresszióját számos daganatban részletesen tanulmányozták, így a prosztatákban is. A nem malignus szövetekben a CD44 expressziója viszont nem olyan részletesen tanulmányozott (Heider és mtsai 1995, Noordzij és mtsai 1997). Vizsgálatunkban a fenti markereken kívül a CD44 különböző izoformjainak expresszióját is vizsgáltuk a prosztata epithelium differenciálódása szemszögéből. A prosztata normál epitheliuma és a BPH-s szövet hámrétege is a CD44 négy izoformját expresszálta. Eredményeink szerint a CD44 v5 izoformját a BPH-s szövet bazális sejtrétege expresszálja, mely megerősíti korábbi vizsgálok eredményeit (Mackay és mtsai 1994). Számos CD44 v5 pozitív sejt negatív volt CK14-re, mely a legkevésbé differenciált bazális sejteket reprezentálja. Ezeken felül a CD44 v5 pozitív sejtek egy olyan középső kompartmentben helyezkedtek az epitheliumon belül, mely a bazális és a luminális sejtréteg között helyezkedett el. Ezek a sejtek nagyobbak, mint a bazális sejtrétegben elhelyezkedő lapos orsó alakú sejtek. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy ezek a sejtek (CD44 v5+, CK14-) a bazális sejtrétegből a luminális sejtrétegbe differenciálódó sejtek populációja. Korábbi vizsgálatok már megmutatták, hogy az intermedier sejtek a CK19-t is expresszálják és a prosztata epitheliumában a differenciálódó sejtek populációját reprezentálják (Hudson és mtsai 2001). Más szerzők egy olyan intermedier sejtpopulációt jellemeztek, melyek CK8 és CK5 expressziója gyenge (van Leenders és mtsai 2000) és hiányzik a p27^{kip1}, melyet minden egyéb prosztata epitheliális sejt expresszál (De Marzo és mtsai 1998). A késői differenciáltságú sejtek a prosztata őssejtek markerét is expresszálják (Tran és mtsai 2002) de eddig nem mutattak ki az intermedier sejtekre jellemző sejt felszíni markert. A 19. ábra mutatja a prosztata mirigyhámjának hipotetikus differenciálódási folyamatát a keratin és CD44 expresszió tükrében.



19. **Ábra** A prosztata epithelium differenciálódásának újabb modellje az újabb sejt expressziós eredmények alapján (Hudson és mtsai 2001).

Korábbi szerzők a hasnyálmirigy rák vizsgálatából azt a következtetést vonták le, hogy a CD44 v5 variánsa a rosszindulatú folyamatok markere lehet (Gansauge és mtsai 1995). Mi a vizsgálatunkban normál prosztata szövetben is kimutattunk CD44 v5 expressziót. A CD44 V3-v10 izoformjai széleskörűen expresszálódik proliferáló és terminálisan differenciált keratinociták sejt kultúrájában (Hudson és mtsai 1995). A CD44 v5 izoformjának a keratinocitákhoz hasonlóan valószínűleg a sejtek sejtkapcsoló szerkezeteinek fenntartásában van szerepe. Korábban kimutatták, hogy a normál prosztatában a luminális sejtréteghez közelebb elhelyezkedő intermediér sejtek c-met és HGF-receptor (hepatocyt growth factor) expressziót is mutatnak (van Leenders és mtsai 2002). Érdekes tudni, hogy a HGF indukált szignál transzdukció a HGF és CD44 v3 összekapcsolódása révén valósul meg (van der Voort és mtsai 1999). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a CD44 expressziója a sejt differenciálódás folyamán szükséges motilitásbeli változás, mely során a sejtek a bazális rétegből a luminális rétegbe kerülnek.



20. Ábra A prosztata hámrétegének differenciálódási folyamata (Wang és mtsai 2001).

A bazális és luminális sejtek közötti átmenetről, a sejtek differenciálódásáról kevés az ismeretünk. A fenti adatok bizonyítékkul szolgálnak a sejt differenciálódással összefüggő CD44 expressziós változásról. Korábban a CD44-et a luminális és bazális sejtek immuno-magnetikus elválasztására használták (Collins és mtsai 2001). A CD44 izoformjainak sejtfelszíni expressziójának vizsgálata a prosztata sejtek differenciálódása során további értékes vizsgálati eszközt biztosíthat számunkra a differenciálódási folyamat pontos jellemzéséhez.

8. Következtetés

8.1. A prosztata zonális anatómiája szövettani elemzés alapján

A prosztata zónái a prosztata anatómia ismeretében, a metszetek pontos metszeti síkjának ismeretében és a H&E festés alapján elkülöníthetők. Számunkra legnagyobb kihívást az átmenteti zóna azonosítása jelentette. Ennek a területnek szövettani szerkezete a normális prosztatában a perifériás zónához hasonlított. A patológusokkal folytatott konzultáció alapján a tranzicionális zóna a kor előrehaladtával és a BPH megjelenésével válik egyre szembetűnőbbé. A feldolgozott anyagunkban a kilenc mintából összesen 6 mintában sikerült teljes biztonsággal az átmeneti zónát elkülöníteni. A prosztatától a vesicula seminalis könnyen elkülöníthető, és a centrális zóna morfológiailag a vesicula seminalishoz is hasonlít. Ezek alapján mondhatjuk, hogy a korábban McNeal által leírt zonális prosztata anatómia reprodukálható felosztást tesz lehetővé a prosztata egyes területeit tekintve. A zónák elkülönítésében a metszeti sík szintjének ismerete és az azonos prosztatából származó különböző zónák megjelenése kulcsfontosságú. A morfológiai kép alapján a centrális zóna hasonlít a vesicula seminalishoz, mely a korábbi eredmények birtokában ahhoz a konklúzióhoz vezethet, hogy ezek azonos embriológiai eredettel bírnak. Tekintettel arra, hogy a betegségek klinikai kivizsgálását és kezelését a prosztata zonális anatómiája nem befolyásolja, a zonális szerkezet ismerete és annak szövettani és egyéb elemzésének fontossága még nem ismeretes. Megjegyzendő, hogy a prosztatarák előfordulásának területi megoszlása alapján dolgozták ki a prosztata biopsziák sémáját, mely a prosztata perifériás részére helyezi a hangsúlyt (Stamey és mtsai 1995). A prosztata zonális anatómiájának egyéb klinikai jelentősége egyelőre nem tisztázott. A zónák pontos ismerete és annak összefüggései a prosztata megbetegedéseivel további előrelépést jelenthetnek a prosztata betegségeinek megismerésében és eredményesebb kezelésében.

8.2. A citokeratin expresszió a prosztatában és a vesicula seminalisban

Különböző citokeratinokat vizsgáltunk, hogy a prosztata különböző differenciáltságú epitheliális sejtjeit elkülönítsük. Nem találtunk lényeges különbséget a sejtek zonális eloszlásában. A prosztatán belül a különböző differenciáltságú sejtek azonos arányban fordulnak elő. A vesicula seminalis epitheliuma viszont lényeges eltért

a prosztatata mirigyhámjától. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy zónák közti eltérő érzékenység a betegségek iránt nem magyarázhatók az eltérően differenciált sejtek különböző eloszlásával. A vesicula seminalisban lévő alacsonyabb számú bazális (osztódó) sejt, a VS hámjának alacsonyabb megújulási hajlandóságával magyarázható. Ez is magyarázhatja a rosszindulatú daganat és egyéb epitheliumából kiinduló eltérések alacsony számát a vesicula seminalisban.

8.3. A prosztatata zónái a zonális markerek tükrében

A korábban McNeal munkacsoportja által használt zonális markerek közül kettőt használtunk. A laktoferrin és a PNA is eltérő festődést mutatott, bár eredményeink nem teljesen egyeztek meg a korábbi vizsgálatok következtetéseivel. A prosztatán belül ezek a markerek használhatók, mint zóna specifikus markerek. Ugyanakkor kétségeink vannak, hogy ezek a markerek használhatók-e egy prosztatata terület pontos zonális helyzetének meghatározásához. Vizsgálatunkban a festések igen érzékenyek voltak de csak egy prosztatán belül voltunk határozott különbséget tenni a zónák között. Korábban már számos egyéb markert is használtak a prosztatata zónáinak elkülönítésére, melyek hitelessége nem vonható kétségbe (Leav és mtsai 2001, Tsurusaki és mtsai 2003, Reese és mtsai 1986, Reese és mtsai 1988, Kobayashi és mtsai 1991, McNeal és mtsai 1988). Ugyanakkor tapasztalatunk szerint a zónák elkülönítése csupán erre támaszkodva nem lehetséges. Egy olyan markert sajnos nem sikerült találni, amely alapján például egy tárgylemezen lévő prosztatata szövetről meg tudnánk mondani annak zonális származását. A zónák eltérő festődése eltérő embrionális eredetet és eltérő mirigyfunkciókat vet fel. Következézetésül elmondhatjuk, hogy a fenti festések segítenek a zonális elkülönítésben, de önmagukban nem alkalmasak egy ismeretlen prosztatata szövet zonális eredetének meghatározásában. Az IHC festéseink alapján elmondhatjuk, hogy a teljes harántmetszeti prosztatában a centrális zóna a vesicula seminalishoz hasonlított, mely alapján megerősödik az a véleményünk, hogy a két terület azonos embrionális eredetű (Wolff-cső).

8.4. A funkcionális markerek szerepe

A funkcionális markerek közül a PSA-t és a PSAP-t vizsgáltuk. Mindkét fehérjét a differenciált luminális sejtek expresszálják. Legnagyobb koncentrációban a luminális

sejtek lumen felőli 1/3-ban voltak jelen. Egyik fehérjét sem expresszáta a vesicula seminalis. Ugyanakkor a centrális zóna mindkettőre erős festődést mutatott. Ezek alapján a funkcionalitás kérdésében a centrális zóna a perifériás és az átmeneti zónához jobban hasonlít, mint a vesicula seminalishoz. A mirigy funkcióját tekintve a centrális zóna a prosztatata másik két zónájához hasonlít és a vesicula seminalistól egyértelműen elkülönül. Ha azonos embriológiai eredetet is feltételezünk (CZ és VS), a működésben egyértelmű a különbség a két terület között.

8.5. Az utriculus prostaticus különleges megjelenése

Az utriculus prostaticus területén a NE sejtek száma igen magas. Hasonlóan korábbi vizsgálatokhoz a vizsgálatunkban a NE sejtek száma közel négyszer nagyobb, mint a prosztatata egyéb mirigyes területén (Guy és mtsai 1998). Ismert tény az is, hogy a periurethrális mirigy kivezető csöveiben a NE sejtek száma magasabb. A mi vizsgáltunk is megerősítette a korábbi eredményeket, vagyis a NE sejtek száma a fő ductusokban magasabb. Az utriculus prostaticus még a kivezető csöveknél is több NE sejtet tartalmazott. Egyes vélemények szerint a NE sejteknek fontos szerepe van a megtermékenyítésben. Az általuk termelt hormonaktív anyagok stimulálhatják a spermiumok motilitását és egyéb fiziológiai folyamatait. Vizsgálatunk szerint az utriculus prostaticus NE festődése olyan jelentősen eltér a prosztatata többi részének festődésétől, hogy ez alapján azt az elméletet támogatjuk, mely szerint az utriculus más embriológiai szervből származik. Vizsgálatunk szerint is az utriculus a Müller-cső származéka lehet (Wernert és mtsai 1990).

8.6. A mesenchyma sejtjei

A perifériás zóna és a tranzicionális zóna több simaizomsejtet tartalmaz, mint a centrális zóna. A vesicula seminalis a két előbbi zónához hasonlít inkább e tekintetben. A stroma és az epithelium közötti interakciók igen komplex rendszernek tűnnek. A BPH a tranzicionális zónában jelentkezik. A tranzicionális zóna nem különbözik jelentősen a másik két zónától a stroma vonatkozásában az általunk vizsgált markerekkel. Ezek alapján mondhatjuk, hogy zónák közötti sejtpopulációs különbségek nem játszanak közre a BPH kifejlődésében. Az androgén receptor expressziós vizsgálataink sem magyarázhatják a zónák eltérő viselkedését.

8.7. Sejtdifferenciálódási markerek a zónák között

8.7.1. Citokeratin expresszió a zónák epitheliumában

A luminális és bazális sejtek között a prosztata három zónájában nincs különbség. A vesicula seminalis viszont jelentősen eltér a prosztatától. A citokeratin expressziós vizsgálataink összhangban korábbi vizsgálati eredményekkel azt mutatják, hogy a luminális és bazális sejtek aránya az epitheliumban 2.6:1. A citokeratin expressziós vizsgálataink alapján nem tudunk a zónák között különbséget tenni a különböző differenciáltsági fokú sejtek tanulmányozásával. A bazális, az intermedier, a luminális és NE sejtek száma és aránya a prosztata három zónájában közel azonos volt. Ezek alapján a sejtek differenciáltsági foka az egyes zónákban nem befolyásolhatja azok betegségek iránti fogékonyságát.

8.7.2. Neuroendokrin markerek eltérései a zónákban

Bár a neuroendokrin sejtek funkciója a prosztata működésében nem ismert, számos közlemény tulajdonít fontos szerepet ezeknek a sejtek differenciálódásának, az epithelium működésének és a prosztata betegségei kialakulásának szabályozásában. Megfigyeléseink szerint perifériás és a tranzicionális zónában a sejtek aránya közel azonos volt, a centrális zónában a NE sejtek száma valamivel alacsonyabbnak mutatkozott. A vesicula seminalisban viszont egyáltalán nem találtunk ilyen sejteket korábbi tanulmányokhoz hasonlóan. Ellentétben korábbi szerzőkkel az NE sejtek száma nem volt jelentősen magasabb az átmeneti zónában (Santamaria és mtsai 2002). Ugyanakkor az utriculus prostaticusban az NE sejtek száma közel tízszer magasabb volt, ahogy azt mások is észlelték (Islam és mtsai 2002, Wernert és mtsai 1990, Guy és mtsai 1998). Felmerül a kérdés, hogy a korábbi szerzők nem ezt a területet vélték-e a tranzicionális zónának. Ahogy korábban is hangsúlyoztuk számunkra szintén igen nehezen megfogható volt a tranzicionális zóna elkülönítése a normál prosztatában. Itt is kiemelendő, hogy a vesicula seminalis alacsony fogékonysága a betegségekre összefüggésbe hozható a NE sejtek hiányával. Az is világos, hogy e tekintetben is hasonlít a centrális zóna és a vesicula seminalis. Az utriculus prostaticus festődéséből ugyanakkor arra következtethetünk, hogy a NE sejtek előfordulási gyakorisága nem

feltétlenül jelenti a betegségek gyakoribb előfordulását, ugyanis az utriculus prostaticus betegségei igen ritkák. Vizsgálataink alapján arról sem lehet nyilatkozni, hogy a NE sejtek normál prosztatán belüli eloszlása befolyásolhatja-e a prosztaták progresszióját.

8.7.3. CD44 expressziós eredményeink

A CD44 szerepe és jelentősége is felmerült a prosztaták fejlődésében és progressziójában. Korábbi RT-PCR és DNS szekvenálási vizsgálatok már fényt derítettek arra, hogy normál prostata, a BPH és benignus sejtenyészetek (Pre2.8) a CD44 négy izoformját expresszálják (Alam és mtsai, 2004). Ezen vizsgálatok során az is felmerült, hogy a CD44 v3-v10 izoformok szerepet játszanak a normál sejtek differenciálódási folyamataiban. A eredményeink azt támasztják alá, hogy a CD44 v5 expresszió a prostata epitheliumának bazális sejteiben látható, melyek a proliferáló kompartmentje a mirigyhámnak. Azonban számos sejt CD44 v5 negatív volt a CK14-et expresszáló sejtek közül (a CK14-et e legkevésbé differenciált bazális sejteknek gondoljuk). Ezen felül CD44v5 pozitív sejteket láttunk a lumenális és a bazális sejtréteg között is, mely sejtek nagyobbak is voltak. Ezek alapján gondoljuk, hogy ezek a sejtek egy intermedier állapotban lévő, differenciálódó sejtek. A korai differenciáltságú sejteket még nem jellemezték korábban sejtfelszíni antigénnel. Vizsgálatunkban sikerült kimutatni ezt a sejtpopulációt normál és benignus prostata szövetben. A prostata zónái között nem találtunk eltérést. Tekintve, hogy a prostata zónái között jelentős a különbség a proliferációs aktivitás tekintetében, további vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy ezek a korai differenciáltságú sejtek a zónák között pontosan hogyan oszlanak el és további koexpressziós vizsgálatok szükségesek a korai differenciáltságú sejtek pontos szerepének meghatározásához a normál prostata, a BPH, és a prosztaták sejtdifferenciálódásában.

8.8. A proliferáció és az apoptózis eltérései

A Ki67-tel vizsgált proliferációs aktivitás a perifériás és a tranzicionális zónában magasabb volt, mint a centrális zónában és az ondóhólyagban. A Ki67 pozitív sejtek aránya a stromában a prosztatában egységesen magasabb volt, mint a vesicula seminalisban. A TUNEL teszttel vizsgált apoptózis a perifériás és tranzicionális zónában magasabb volt, mint a centrális zónában. Bár értékelhető eredményt nem

tudtunk produkálni az ondóhólyag apoptózisát tekintve, a fentiek alapján elmondható, hogy a PZ és a TZ magasabb sejt „turnover”-rel rendelkezik. A vesicula ebben a tekintetben hasonlít a centrális zónához. A sejtkinetikai vizsgálatok alapján a CZ és a VS hasonló tulajdonsággal bírnak. A két területen (PZ és TZ) előforduló nagyobb arányú sejtmeújulás a betegségek gyakoribb előfordulását magyarázhatják. Tekintve, hogy a több sejtosztódáshoz több genetikai hiba társulhat, mely a prosztaták kialakulásában is előfeltétel, a fenti állításunk ezzel is magyarázható. A BPH vonatkozásában nem ilyen egyértelmű a kép.

9. Összefoglalás

A prosztata a férfiak megbetegedéseinek leggyakoribb helye. A prosztata normál működésének és fejlődésének megértése nélkülözhetetlen feltétel a betegségek pontos megértéséhez. A prosztata két leggyakoribb eltérése a benignus prosztata hyperplasia (BPH) és a prosztatarák. A prosztata három mirigyes zónából és egy fibromuscularis területből áll. Ezek fogékonysága a prosztata betegségeire eltérő. A prosztatarák dominánsan a perifériás zónában, míg a BPH a tranzicionális zónában keletkezik. A prosztata hámrétege három alapsejtet tartalmaz: luminális, bazális és neuroendokrin sejtek. Ezek pontos differenciálódásának menete és a zónák közötti differenciálódás különbségei nem tisztázottak pontosan. A vizsgálatunk során a prosztata epithelium három alapsejtjének fenotípus markereit, sejtkinetikai markereket és egyéb zóna specifikus markereket használtunk. A prosztata epitheliumában a különböző differenciáltsági fokú sejteket citokeratin 5, 14, 17, 19 és CD44 antigének expressziójával vizsgáltuk. A három zóna között sem sikerült a különböző differenciáltsági fokú sejtek tekintetében különbséget észlelni. A vesicula seminalis viszont lényegesen eltért a prosztatától. Számos korábban publikált immunhisztokémiai marker festődést reprodukálni tudtunk, ugyanakkor eltérést is észleltünk a korábbi megfigyelésektől. A peanut agglutinint és a laktoferrint használtuk, mint zóna specifikus antigének. A funkcionális markerek közül a PSA és a prosztatikus savanyú foszfataz is a prosztata epitheliumában azonos módon expresszálódott, míg a vesicula seminalisban nem mutatott expressziót. A centrális zóna több szempontból is a vesicula seminalishoz hasonlít, amit a két struktúra azonos, Wolff-cső eredete magyarázhat. Ezzel is magyarázható a két terület alacsony fogékonysága adenocarcinomára. A mesenchymális markerek expressziójában lényeges különbséget nem észleltünk a zónák között. A perifériás és a tranzicionális zóna epitheliumát nagyon hasonlóknak találtuk vizsgálatunkban. A luminális és bazális sejtek aránya, proliferációs és apoptózis indexek alapján a két zóna nem különbözik egymástól. A két zónában megfigyelhető magasabb sejtmegújulás („turnover”) lehet az alapja a betegségek gyakoribb előfordulásának. A zónák epitheliumában a neuroendokrin sejtek is eltérően fordultak elő. A vesicula seminalisban nem találtunk neuroendokrin sejtet, a centrális zónában pedig kevesebbet, mint a prosztata másik két zónájában. A prosztata zónái eltéréseinek vizsgálata fontos a mirigy pontos működésének megismeréséhez. A zónák és a vesicula seminalis további vizsgálata a prosztata betegségeinek pontosabb megértéséhez adhat alapot.

10. Summary

Mens' health problems occur most frequently in the prostate. Understanding of function and development of prostate is crucial in accurate understanding of prostatic diseases. The prostate cancer and the benign prostatic hyperplasia (BPH) are the most common diseases of the prostate. The prostate consists of three glandular zones and an anterior fibromuscular stroma. Disease susceptibility of these areas are different. Prostate cancers arise in the peripheral zone while benign prostatic hyperplasia occurs in the transition zone. The prostate epithelium contains three types of cells, namely luminal, basal and neuroendocrine cells. The differentiation of these cells and the differences in cell differentiation between the zones are not well understood in details so far. In our study we examined fenotypic, cell kinetic and zone specific markers of these three cell types. Citokeratin 5, 14, 17, 19 and CD44 expression were used to identify the cells at different levels of differentiation. No differences of cell differentiation between the zones were found, while the seminal vesicles were significantly different from the prostate regarding the numbers of differentiated cells. Similarly to previous published date we could reproduce numerous immunohistochemical staining, although some of our results slightly differed from earlier observations. Peanut agglutinin and lactoferrin were used to identify the McNeal's zones. The functional markers as the prostate specific antigen and the prostatic acid phosphatase expressed similarly in the epithelium, while no expression was seen in the seminal vesicles. The central zone is very similar to the seminal vesicle which can be explained by the presumed common Wolffian origin of these two structures. This may explain the low cancer incidence in these two areas. The mesenchymal markers showed no differences between the zones examined. The peripheral and the transitional zone epithelium is very similar in our observations. No difference was seen between these two zones regarding the rate of luminal and basal cell, proliferation and apoptotic indices. The high turnover rate of the peripheral and transition zones may be responsible for the higher proliferative disease incidence in these zones. Neuroendocrine (NE) cells were not present in the seminal vesicles, and low NE cell number was detected in the cenral zone. Further study of prostatic zones and the seminal vesicles is important to understand the function and diseaseses of these organs.

11. Irodalomjegyzék

Abrahamsson, PA. (1996) Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer. *Prostate Suppl* 6: 3-8.

Alam TN, O'Hare MJ, Laczko I, Freeman A, Al-Beidh F, Masters JR, Hudson DL. (2004) Differential Expression of CD44 During Human Prostate Epithelial Cell Differentiation, *J. Histochem. Cytochem.* 52: 1083-1090.

Arenas MI, Romo E, de Gaspar I, de Bethencourt FR, Sánchez-Chapado M, Fraile B, Paniagua R. (1999) A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Glycoconj J* 16(7): 375-82.

Aumüller G, Seitz J, Bischof W. (1983) Immunohistochemical study on the initiation of acid phosphatase secretion in the human prostate. *Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases IV. J Androl* 4: 183-191.

Aumüller G, Seitz J, Lilja H, Abrahamsson PA, von der Kammer H, Scheit KH. (1990) Species- and organ-specificity of secretory proteins derived from human prostate and seminal vesicles. *Prostate* 17: 31-40.

Aumüller G, Seitz J. (1990) Protein secretion and secretory processes in male accessory sex glands. *Int Rev Cytol* 121: 127-231.

Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, Santaquilani M; EUROCORE Working group. (2007) Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCORE-4 study. *Lancet Oncol* 8(9): 773-83.

Biagini G, Preda P, Lo Cigno M, Soli M, Bercovich E. (1982) Ultrastructural aspects of human prostate in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 3: 99-108.

Bonkhoff H. (1996) Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: a stem cell concept for the development of prostate cancer. *Eur Urol* 30: 201-205.

Bonkhoff H, Remberger K. (1993) Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 422: 35-38.

Bonkhoff H, Remberger K. (1996) Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 28: 98-106.

Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. (1994a) Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum Pathol* 25: 42-46.

Bonkhoff H, Stein U, Remberger K. (1994b) The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 24: 114-118.

Bonnet D, Dick JE. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 3(7): 730-7.

Bostwick DG, Qian J, Pacelli A, Zincke H, Blute M, Bergstralh EJ, Slezak JM, Cheng L. (2002) Neuroendocrine expression in node positive prostate cancer: correlation with systemic progression and patient survival. *J Urol* 168(3): 1204-11.

Bostwick DG, Brawer MK. (1987) Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer* 15;59(4): 788-94.

Brawer MK, Peehl DM, Stamey TA, Bostwick DG. (1985) Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res* 45(8): 3663-7.

Brenner H, Francisci S, de Angelis R, Marcos-Gragera R, Verdecchia A, Gatta G, Allemani C, Ciccolallo L, Coleman M, Sant M; EUROCORE Working Group. (2009) Long-term survival expectations of cancer patients in Europe in 2000-2002. *Eur J Cancer* 45(6): 1028-41.

Bui M, Reiter RE. (1998-1999) Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 17(4): 391-9.

Buick RN, Pollak MN. (1984) Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes. *Cancer Res.* 44(11): 4909-18.

Chan PS, Chan LW, Xuan JW, Chin JL, Choi HL, Chan FL. (1999) In situ hybridization study of PSP94 (prostatic secretory protein of 94 amino acids) expression in human prostates. *Prostate* 41: 99–109.

Cohen RJ, McNeal JE, Edgar SG, Robertson T, Dawkins HJ. (1998) Characterization of cytoplasmic secretory granules (PSG), in prostatic epithelium and their transformation-induced loss in dysplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 29(12): 1488-94.

Cohen RJ, McNeal JE, Redmond SL, Meehan K, Thomas R, Wilce M, Dawkins HJ. (2000) Luminal contents of benign and malignant prostatic glands: correspondence to altered secretory mechanisms. *Hum Pathol* 31(1): 94-100.

Collin SM, Martin RM, Metcalfe C, Gunnell D, Albertsen PC, Neal D, Hamdy F, Stephens P, Lane JA, Moore R, Donovan J. (2008) Prostate-cancer mortality in the USA and UK in 1975-2004: an ecological study. *Lancet Oncol* 9(5): 445-52.

Collins AT, Habib FK, Maitland NJ, Neal DE (2001) Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci* (114): 3865-3872.

Colombel M, Vacherot F, Diez SG, Fontaine E, Buttyan R, Chopin D. (1998) Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia. *Br J Urol* (82): 380–385.

Colombo P, Patriarca C, Alfano RM, Cassani B, Ceva-Grimaldi G, Roncalli M, Bosari S, Coggi G, Campo B, Gould VE. (2001) Molecular disorders in transitional versus peripheral zone prostate adenocarcinoma. *Int J Cancer* (94): 383–389.

Coyne JD, Kealy WF, Annis P. (1987) Seminal vesicle epithelium in prostatic needle biopsy specimens. *J Clin Pathol* 40: 932.

De Marzo AM, Meeker AK, Epstein JI, Coffey DS. (1998) Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol*. 153(3): 911-9.

De Medina S, Salomon L, Colombel M, Abbou CC, Bellot J, Thiery JP, Radvanyi F, Van der Kwast TH, Chopin DK. (1998) Modulation of cytokeratin subtype, EGF receptor, and androgen receptor expression during progression of prostate cancer. *Hum Pathol* 29(9): 1005-12.

di Sant'Agnese PA. (1992) Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 23: 287-296.

Döbrössy B, Kovács A, Budai A, Cornides A, Döbrössy L. (2007) Indokolt-e a népegészségügyi prosztataszűrés? *Orv Hetil* 36: 1707-11.

Eden CG, Richards AJ, Ooi J, Moon DA, Laczko I. (2007) Previous bladder outlet surgery does not affect medium-term outcomes after laparoscopic radical prostatectomy. *BJU Int* 99(2): 399-402.

Erbersdobler A, Huhle S, Palisaar J, Graefen M, Hammerer P, Noldus J, Huland H. (2002a) Pathological and clinical characteristics of large prostate cancers predominantly located in the transition zone. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5: 279–284.

Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, Graefen M, Hammerer P, Huland H, Henke RP. (2002b) Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: Differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 41: 40–46.

Ellis DW, Leffers S, Davies JS, Ng AB. Multiple immunoperoxidase markers in benign hyperplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Am J Clin Pathol* 81(3): 279-84.

English HF, Santen RJ, Isaacs JT. (1987) Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate* 11: 229-242.

Fonseca I, Moura Nunes JF, Soares J. (2000) Expression of CD44 isoforms in normal salivary gland tissue: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol* 114: 483-488.

Franks LM. (1954) Benign nodular hyperplasia of the prostate: A review. *Ann R Coll Surg* 14: 92–106.

Foulds L. (1957) Tumor progression. *Cancer Res* 17(5): 355-6.

Gansauge F, Gansauge S, Zobywalski A, Scharnweber C, Link KH, Nussler AK, Beger HG. (1995) Differential expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and in normal pancreas. *Cancer Res* 55(23): 5499-503.

Giczi J, Sághi G (szerk.): *Időskorúak Magyarországon*, KSH, Budapest, 2004: 114-115.

Googe PB, McGinley KM, Fitzgibbon JF (1997). Anticytokeratin antibody 34 beta E12 staining in prostate carcinoma. *Am J Clin Pathol* 107, 219-223.

Greene DR, Fitzpatrick JM, Scardino PT. (1995) Anatomy of the prostate and distribution of early prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 11(1): 9-22.

Grignon DJ, Sakr WA. (1994) Zonal origin of prostatic adenocarcinoma: Are there biologic differences between transition zone and peripheral zone adenocarcinomas of the prostate gland? *J Cell Biochem Suppl* 19: 267–269.

Guy L, Bégin LR, Al-Othman K, Chevalier S, Aprikian AG. (1998) Neuroendocrine cells of the verumontanum: a comparative immunohistochemical study. *Br J Urol* 82(5): 738-43.

Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, Narayan P. (1995) Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31: 14-24.

Heider KH, Dammrich J, Skroch-Angel P, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP, Herrlich P, Ponta H. (1993a) Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 53: 4197-4203.

Heider KH, Hofmann M, Hors E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. (1993b) A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 120: 227-233.

Heider KH, Mulder JW, Ostermann E, Susani S, Patzelt E, Pals ST, Adolf GR. (1995) Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumour cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys. *Eur J Cancer* (31A): 2385-2391.

Holmberg L, Robinson D, Sandin F, Bray F, Linklater KM, Klint A, Lambert PC, Adolfsson J, Hamdy FC, Catto J, Møller H. (2011) A comparison of prostate cancer survival in England, Norway and Sweden: A population-based study. *Cancer Epidemiol. Cancer Epidemiol* (Epub ahead of print)

Hricak H, Dooks GC, McNeal JE, Mark AS, Marotti M, Avallone A, Pelzer M, Proctor EC, Tanagho EA. (1987) MR imaging of the prostate gland: Normal anatomy. *AJR Am J Roentgenol* 148: 51–58.

Hudson DL, Guy AT, Fry P, O'Hare MJ, Watt FM, Masters JR. (2001) Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *J Histochem Cytochem* 49: 271-278.

Hudson DL, O'Hare M, Watt FM, Masters JR. (2000) Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Lab Invest* 80: 1243-1250.

Hudson DL, Sleeman J, Watt FM. (1995) CD44 is the major peanut lectin-binding glycoprotein of human epidermal keratinocytes and plays a role in intercellular adhesion. *J Cell Sci* 108(Pt 5): 1959-1970.

Hudson DL, Speight PM, Watt FM. (1996) Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinomas and cell lines derived from them. *Int J Cancer* 66: 457-463.

Iczkowski KA, Bai S, Pantazis CG. (2003) Prostate cancer overexpresses CD44 variants 7-9 at the messenger RNA and protein level. *Anticancer Res* 23: 3129-3140.

Isaacs JT, Coffey DS. (1989) Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 2: 33-50.

Islam MA, Kato H, Hayama M, Kobayashi S, Igawa Y, Ota H, Nishizawa O. (2002) Are neuroendocrine cells responsible for the development of benign prostatic hyperplasia? *Eur Urol*. 42(2): 79-83.

Kobayashi S, Demura T, Nonomura K, Koyanagi T. (1991) Autoradiographic localization of alpha 1-adrenoceptors in human prostate: Special reference to zonal difference. *J Urol* 146: 887–890.

Kobayashi S, Tang R, Wang B, Opgenorth T, Stein E, Shapiro E, Lepor H. (1994) Localization of endothelin receptors in the human prostate. *J Urol* 151: 763–766.

Koslin DB, Kenney PJ, Koehler RE, Van Dyke JA. (1987) Magnetic resonance imaging of the internal anatomy of the prostate gland. *Invest Radiol* 22: 947–953.

Krill D, DeFlavia P, Dhir R, Luo J, Becich MJ, Lehman E, Getzenberg RH. (2001) Expression patterns of vitamin D receptor in human prostate. *J Cell Biochem* 82: 566–572.

Laczko I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. (2005) Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate* 62: 260-266.

Leav I, Lau KM, Adams JY, McNeal JE, Taplin ME, Wang J, Singh H, Ho SM. (2001) Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol* 159: 79–92.

Le Duc IE. (1939) The anatomy of the prostate and the pathology of early benign hypertrophy. *J Urol* 42: 1217-1241.

Lee F, Siders DB, Torp-Pedersen ST, Kirscht JL, McHugh TA, Mitchell AE. (1991) Prostate cancer: Transrectal ultrasound and pathology comparison. A preliminary study of outer gland (peripheral and central zones) and inner gland (transition zone) cancer. *Cancer* 67(Suppl 4): 1132–1142.

Leroy X, Ballereau C, Villers A, Saint F, Aubert S, Gosselin B, Porchet N, Copin MC. (2003) MUC6 is a marker of seminal vesicle-ejaculatory duct epithelium and is useful for the differential diagnosis with prostate adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 27(4): 519-21.

Lesley J, Hyman R, Kincade PW. (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54: 271-335.

Liu AY, True LD, LaTray L, Ellis WJ, Vessella RL, Lange PH, Higano CS, Hood L, van den Engh G. (1999) Analysis and sorting of prostate cancer cell types by flow cytometry. *Prostate* 40: 192-199.

Lowsley OS. (1912) The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder. *Am J Anat* 13: 299–349.

Lu PJ, Lu QL, Rughetti A, Taylor-Papadimitriou J. (1995) bcl-2 overexpression inhibits cell death and promotes the morphogenesis, but not tumorigenesis of human mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 129: 1363-1378.

Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Gunthert U. (1994) Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol* 124: 71-82.

Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, Buick RN. (1983) A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays. *J Natl Cancer Inst* 70(1): 9-16.

Masters JR, Alam T, Foley CL, Laczkó I, Hudson DL. Stem cells and differentiation in human prostate cancer. In: Bangma, CHH, Newling, DWW (szerk), *Prostate and renal cancer, benign prostatic hyperplasia, erectile dysfunction and basic research*. The Parthenon Publishing Group, London. 2003: 145-154.

Matsumura Y, Tarin D. (1992) Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340: 1053-1058.

McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML. (1992). Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6940-6944.

McNaughton Collins M, Barry MJ. (1998) Epidemiology of chronic prostatitis. *Curr Opin Urol* 8(1): 33-7.

McNeal JE. (1968) Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 49: 347–357.

McNeal JE. (1978) Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 15(4): 340-5.

McNeal JE. (1980) Anatomy of the prostate: an historical survey of divergent views. *Prostate* 1: 3-13.

McNeal JE. (1981a) Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology* 17: 11-16.

McNeal JE. (1981b) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 2: 35-49.

McNeal, J. E. (1984) Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res* 145: 27-53.

McNeal JE, Leav I, Alroy J, Skutelsky E. (1988a) Differential lectin staining of central and peripheral zones of the prostate and alterations in dysplasia. *Am J Clin Pathol* 89: 41–48.

McNeal JE. (1988b) Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinoma. *Semin Ultrasound CT MR* 9: 329-334.

Mirowitz SA, Hammerman AM. (1992) CT depiction of prostatic zonal anatomy. *J Comput Assist Tomogr* 16: 439–441.

Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. (2000) AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(13): 7521-6.

Moon TD, Hagen L, Heisey DM. (1997) Urinary symptomatology in younger men. *Urology*. 50(5): 700-3.

Nagabhushan M, Pretlow TG, Guo YJ, Amini SB, Pretlow TP, Sy MS. (1996) Altered expression of CD44 in human prostate cancer during progression. *Am J Clin Pathol* 106: 647-651.

Nagle RB, Ahmann FR, McDaniel KM, Paquin ML, Clark VA, Celniker A. (1987) Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res* 1;47(1): 281-6.

Nagle RB, Brawer MK, Kittelson J, Clark V. (1991) Phenotypic relationships of prostatic intraepithelial neoplasia to invasive prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 138: 119-128.

National Cancer Institute. SEER: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program [Internet]. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2010 [mégnezve 2011.10.21.] .
Megtalálható: http://seer.cancer.gov/about/SEER_brochure.pdf

Noguchi S, Kubota Y, Kondoh I, Harada M, Masuda M, Uemura H, Hosaka M. (2000) Pathologic 'fused gland' as a prognostic factor for prostate cancer. *Urol Int* 65(2): 84-8.

Noordzij MA, van Steenbrugge GJ, Schroder FH, van der Kwast, TH. (1999) Decreased expression of CD44 in metastatic prostate cancer. *Int J Cancer* 84: 478-483.

Noordzij MA, van Steenbrugge GJ, Verkaik NS, Schroder FH, van der Kwast TH. (1997) The prognostic value of CD44 isoforms in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 3: 805-815.

Nowell PC. (2002) Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol.* 12(4): 261-6.

Okada H, Tsubura A, Okamura A, Senzaki H, Naka Y, Komatz Y, Morii S. (1992) Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421(2): 157-61.

O'Malley FP, Grignon DJ, Shum DT. (1990) Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight cytokeratin in the differential diagnosis of small-acinar lesions of the prostate gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417(3): 191-6.

Ottó S, Kásler M. (2005) A hazai és nemzetközi daganatos halálozási és megbetegedési mutatók alakulása *Magy Onkol* 49(2): 99-107.

Peehl DM, Sellers RG, McNeal JE. (1996) Keratin 19 in the adult human prostate: tissue and cell culture studies. *Cell Tissue Res* 285: 171-176.

Peehl DM, Stamey TA. (1986) Serum-free growth of adult human prostatic epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 82-90.

Peehl DM, Wong ST, Stamey TA. (1988) Clonal growth characteristics of adult human prostatic epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 530-536.

Quick CM, Gokden N, Sangoi AR, Brooks JD, McKenney JK. (2010) The distribution of PAX-2 immunoreactivity in the prostate gland, seminal vesicle, and ejaculatory duct: comparison with prostatic adenocarcinoma and discussion of prostatic zonal embryogenesis. *Hum Pathol* 41(8): 1145-9.

Reese JH, McNeal JE, Redwine EA, Samloff IM, Stamey TA. (1986) Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and the seminal vesicle. *J Urol* 136: 1148-1152.

Reese JH, McNeal JE, Redwine EA, Stamey TA, Freiha FS. (1988) Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones, within the human prostate gland. *Prostate* 12: 47-53.

Reese JH, McNeal JE, Goldenberg SL, Redwine EA, Sellers RG. (1992) Distribution of lactoferrin in the normal and inflamed human prostate: An immunohistochemical study. *Prostate* 20: 73-85.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.

Robinson EJ, Neal DE, Collins AT. (1998) Basal cells are progenitors of luminal cells in primary cultures of differentiating human prostatic epithelium. *Prostate* 37: 149-160.

Romics I. (2010a) A prosztaták kezelése. *Orv Hetil* 151(14): 580-3.

Romics I. (2010b) A benignus prostatáhyperplasia kezelése. *Orv Hetil* 151(12): 506-8.

Santamaria L, Martin R, Martin JJ, Alonso L. (2002) Stereologic estimation of the number of neuroendocrine cells in normal human prostate detected by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10: 275–281.

Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12160-12164.

Selman SH. (2011) The McNeal Prostate: A Review. *Urology* (Epub ahead of print).

Shannon BA, McNeal JE, Cohen RJ. (2003) Transition zone carcinoma of the prostate gland: a common indolent tumour type that occasionally manifests aggressive behaviour. *Pathology* 35(6): 467-71.

Sherwood ER, Berg LA, Mitchell NJ, McNeal JE, Kozlowski JM, Lee C. (1990) Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J Urol* 143: 167-171.

Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M. (2000) p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* 157(6): 1769-75.

Sommer FG, McNeal JE, Carrol CL. (1986) MR depiction of zonal anatomy of the prostate at 1.5 T. *J Comput Assist Tomogr* 10: 983–989.

Stamey TA. (1995) Making the most out of six systematic sextant biopsies. *Urology* 45(1): 2-12.

Timms BG, Mohs TJ, Didio LJ. (1994) Ductal budding and branching patterns in the developing prostate. *J Urol* 151(5): 1427-32.

Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H. (1993) Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 21: 1225-1229.

Tsurusaki T, Aoki D, Kanetake H, Inoue S, Muramatsu M, Hishikawa Y, Koji T. (2003) Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1333–1340.

Tran CP, Lin C, Yamashiro J, Reiter RE. (2002) Prostate stem cell antigen is a marker of late intermediate prostate epithelial cells. *Mol Cancer Res* 1: 113-121.

Van de Voorde WM, Van Poppel HP, Verbeken EK, Oyen RH, Baert LV, Lauweryns JM. (1995) Morphologic and neuroendocrine features of adenocarcinoma arising in the transition zone and in the peripheral zone of the prostate. *Mod Pathol* 8: 591–598.

van der Kwast TH, Amin MB, Billis A, Epstein JI, Griffiths D, Humphrey PA, Montironi R, Wheeler TM, Srigley JR, Egevad L, Delahunt B; ISUP Prostate Cancer Group. (2011) International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 2: T2 substaging and prostate cancer volume. *Mod Pathol* 24(1): 16-25.

van Leenders, G., Dijkman, H., Hulsbergen-van de Kaa, C., Ruiters, D., and Schalken, J. (2000) Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Lab Invest* 80: 1251-1258.

van Leenders GJ, Schalken JA. (2001) Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int* 88 Suppl 2: 35-42.

Verhagen AP, Aalders TW, Ramaekers FC, Debruyne FM, Schalken JA. (1988) Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate* 13: 25-38.

Verhagen AP, Ramaekers FC, Aalders TW, Schaafsma HE, Debruyne FM, Schalken JA. (1992) Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6182-6187.

Vernet S. Gil: Patologia urogenital: Biología y Pathología de la prostata. Madrid: Paz-Montalvo; 1953.

Villers A, Steg A, Boccon-Gibod L. (1991) Anatomy of the prostate: review of the different models. *Eur Urol* 20(4): 261-8.

Villers A, Terris MK, McNeal JE, Stamey TA. (1990) Ultrasound anatomy of the prostate: The normal gland and anatomical variations. *J Urol* 143: 732-738.

Wang Y, Hayward S, Cao M, Thayer K, Cunha G. (2001) Cell differentiation lineage in the prostate. *Differentiation* 68: 270-279.

Wernert N, Seitz G, Goebbels R, Dhom G. (1986) Immunohistochemical demonstration of cytokeratins in the human prostate. *Pathol Res Pract* 181(6): 668-74.

Wernert N, Kern L, Heitz P, Bonkhoff H, Goebbels R, Seitz G, Inniger R, Remberger K, Dhom G. (1990) Morphological and immunohistochemical investigations of the utriculus prostaticus from the fetal period up to adulthood. *Prostate* 17(1): 19-30.

Wu G, Burzon DT, di Sant'Agnes PA, Schoen S, Deftos LJ, Gershagen S, Cockett AT. (1996) Calcitonin receptor mRNA expression in the human prostate. *Urology* 47: 376-381.

Xue Y, Smedts F, Debruyne FM, de la Rosette JJ, Schalken JA. (1998a) Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate. *Prostate* 34: 292-301.

Xue Y, Smedts F, Verhofstad A, Debruyne F, de la Rosette J, Schalken J. (1998b) Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate Suppl* 8: 62-73.

Yang XJ, Lecksell K, Gaudin P, Epstein JI. (1999b) Rare expression of high-molecular-weight cytokeratin in adenocarcinoma of the prostate gland: a study of 100 cases of metastatic and locally advanced prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 23: 147-152.

12. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Alam TN, O'Hare MJ, Laczko I, Freeman A, Al-Beidh F, Masters JR, Hudson DL. (2004) Differential Expression of CD44 During Human Prostate Epithelial Cell Differentiation. *J Histochem Cytochem* 52: 1083-1090. **IF: 2,513**

Laczkó I, Hudson DL, Freemanm A, Feneley MR, Masters JR. (2005) Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics *Prostate*. 62(3): 260-6. **IF: 3,602**

Laczkó I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. (2006) Különbségek a prosztatata zónái és az ondóhólyagok között a betegségek tükrében – immunhisztokémiai tanulmány. *Uroonkológia*. 3(2): 37-42.

Az értekezés témájában megjelent idézhető könyvrészlet:

Masters JR, Alam T, Foley CL, Laczkó I, Hudson DL. Stem cells and differentiation in human prostate cancer. In: Bangma CHH, Newling DWW (szerk), *Prostate and renal cancer, benign prostatic hyperplasia, erectile dysfunction and basic research*. The Parthenon Publishing Group, London, 2003: 145-154.

Nem az értekezés témájában megjelent közlemények:

Juhász A, Laczkó I, Karányi Zs, Kovács P. (2000) Felodipin ER kezeléssel szerzett tapasztalataink. *Magy Belorv Arch* 53: 61-65.

Eden CG, Richards AJ, Ooi J, Moon DA, Laczko I. (2007) Previous bladder outlet surgery does not affect medium-term outcomes after laparoscopic radical prostatectomy. *BJU Int* 99(2): 399-402. **IF:2,751**

13. Köszönetnyilvánítás

Munkám során számos kiváló professzorral, kutatóval, klinikussal és szakemberrel találkoztam, akiknek eltökéltsége, szakma és hivatás iránti szeretete és odaadása mindig is lenyűgözött és munkám során inspirált. Ezúton is köszönöm Önöknek és Nektek, hogy támogattatok, erőt adtatok. Az alábbiakban a fentiek közül néhányat név szerint is szeretnék kiemelni, ami természetesen nem jelenti azt, hogy a többieknek nem vagyok hálás.

Először is köszönetemet kell kifejeznem prof. Romics Imrének, aki 2001-ben az Európai Urológus Társaság (EAU) ösztöndíj programjának bíráló bizottsági tagjaként elősegítette, hogy 2002-2003-ban egy évet a londoni UCL egyetem prosztatatarák kutatási laboratóriumában tölthessek. Professzor Úr a későbbiekben is számtalanszor segítette önzetlenül karrierem alakulását és támogatott doktori munkám elkészítésében.

Köszönet illeti dr. Nyirády Péter tanár úr segítségét is, aki témavezetőként hasznos gyakorlati tanácsokkal látott el. Hálás vagyok Péternek azért is, mert eddigi urológus pályafutásom alatt mindig figyelemmel kísérte szakmai fejlődésemet és ösztönzött a további előrehaladásra.

Tudományos munkám elvégzésében elvülhetetlen érdemei vannak dr. Szőke Barnabás és dr. Szűcs Miklós főorvos uraknak, akik urológiai klinikai munkám mellett lehetőséget biztosítottak az elméleti tudományos munka elvégzésére.

Köszönetemet fejezem ki prof. John Mastersnek és David Hudsonnak, és a laboratórium összes munkatársának, hogy segítettek elmélyedni a prosztata alap kutatások rejtjelmeiben.

A Kenézy Kórház Urológia Osztályán dolgozó orvos kollégáimat is hála illeti, amiért a kutató munkám során elviselték távolléteimet, és ezzel, ha áttételesen is, de lehetővé tették, hogy tudomány iránti érdeklődésemet kiélhessem.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm feleségemnek, Juditnak, lányomnak, Rékának és fiainak, Olivérnek és szüleimnek a kitartó támogatást és türelmet, mellyel egy nyugodt otthont biztosítanak számomra.