

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ, СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ, СОФИЯ
УНИВЕРСИТЕТСКА БОЛНИЦА „АЛЕКСАНДРОВСКА”
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ
И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ**

ДИСЕРТАЦИЯ

Д-Р АНТОАНЕТА ИВАНОВА МЛАДЕНОВА

**ХЕМОСТАЗНИ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ КАРЦИНОМ НА
ПРОСТАТАТА И ОЦЕНКА НА РИСКА
ОТ ТРОМБОТИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ
СЛЕД РАДИКАЛНА ПРОСТАТЕКТОМИЯ**

**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ
НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР”**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ
ПРОФ. Д-Р Д. СВИНАРОВ, ДМН**

**София
2015**

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
1. Анатомия и физиология на простатната жлеза	8
1.1. Анатомия на простатната жлеза.....	8
1.2. Физиология на простата.....	10
2. Исторически данни за карцином на простатната жлеза	11
3. Честота и епидемиология на карцинома на простатната жлеза	11
3.1. Честота.....	11
3.2. Епидемиология	12
4. Съвременни схващания за етиологията на простатния карцином	13
5. Класификация и биологични прояви на простатния карцином	15
5.1. Класификация на карцинома на простатната жлеза.....	15
5.2. Биологични прояви на простатния карцином	17
5.3. Простатна интраепителиална неоплазия (ПИН)	18
6. Клинична диагностика.....	18
6.1. Субективни прояви.....	18
6.2. Обективни прояви.....	18
6.2.1. Ректално туширане	18
6.3. Биохимична и радиоимунологична диагностика	19
6.3.1. Туморни маркери	19
6.4. Микроелементи.....	20
6.5. Нарушения в имунния отговор.....	21
7. Простатен специфичен антиген и карцином на простатата	21
7.1. Исторически аспекти и откриване на ПСА	22
7.2. Биомолекулярна характеристика на ПСА.....	22
7.3. ПСА и карцином на простатата.....	23
7.4. Диагностична стойност на отношение свободен/тотален ПСА	25
8. Злокачествени тумори и простатен карцином.....	26
9. Ангиогенеза, хемостаза и канцерогенеза.....	28
10. Прокоагулационни фактори при злокачествени заболявания	31
11. Инхибитори на коагулацията при карцином.....	34
12. Тъканен фактор и ангиогенеза	36
13. Тромбин и ангиогенеза – съсирването като независим механизъм	39
14. Фибрин и ангиогенеза – зависими от кръвосъсирването механизми.....	42
14.1. Фибриноген и фибрин деградационни продукти (XLF)	43

14.2. Фибрин (оген) и адхезионни молекули	44
14.3. Фибринов матрикс и растежни фактори.....	44
14.4. Мишки с фибриногенов дефицит.....	45
15. Тъканен фактор и тромбин – терапевтично поведение при карциноми	45
16. Тромботични усложнения при антиангиогенните агенти	46
17. Характеристика на Д-димер като прогностичен критерий и туморен маркер.	47
17.1. Биохимия на Д – димер	47
17.2. Клинично значение на Д – димер.....	49
17.3. Бъдещи тенденции.....	50
17.4. Д - димер и карцином на простатата.....	51
17.5. Д - димер в реанимацията.....	52
17.6. Рак и тромбоза, тромбоза и рак.....	52
17.7. Лечение на БТЕ.....	52
18. Биохимия (физиология) на антиромбин III.....	53
19. Методи за изследване на Д - димер и антиромбин III.....	55
19.1. Методи за изследване на Д – димер.....	55
19.1.1. Предлагани в момента Д - димер тестове	55
19.1.2. Стандартизиране на тестове на Д – димер.....	57
19.2. Методи за изследване на Антиромбин III.....	57
19.2.1. Функционални методи	57
19.2.2. Имунологични методи.....	59
19.2.3. Интерпретация на възможностите на методите.....	59
20. Обобщение	59
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	61
IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	62
1. Собствен клиничен материал.....	62
2. Включващи критерии и протокол	62
2.1. Изисквания към пробата за изследване	63
2.1.1. Начин на вземане на биологичен материал.....	63
2.1.2. Транспорт и съхранение.....	64
3. Метод за изследване на Д – димер.....	64
4. Метод за изследване на АТ III.....	66
5. Метод за изследване на фибриноген	68
6. Верифициране на основните аналитични характеристики на използваните методи за количествено определяне на Д - димер и АТ III.....	70
6.1. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичен имунотурбидиметричен метод за определяне на Д – димер	70

6.1.1. Аналитична измервана област (линеен обхват).....	70
6.1.2. Невъзпроизводимост на резултатите	71
6.1.2.1. Повторяемост на резултатите (невъзпроизводимост в серия).....	72
6.1.2.2. Невъзпроизводимост във време	72
6.1.3. Недостоверност.....	72
6.1.4. Референтни интервали	73
6.2. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичен амидолитичен метод STA –Stachrom АТШ.....	74
6.2.1. Невъзпроизводимост на резултатите	75
6.2.1.1. Повторяемост на резултатите (невъзпроизводимост в серия).....	75
6.2.1.2. Невъзпроизводимост във време	75
6.2.2. Недостоверност.....	76
6.2.3. Референтни интервали	76
7. Статистически методи и анализи.....	77
V. РЕЗУЛТАТИ	78
1. Радикална простатектомия – стадий, диференциация, обем и продължителност на операцията, кръвозагуба	78
2. Промени в лабораторните показатели.....	79
3. Тромботични усложнения	81
4. Анализ на пациентите по групи.....	82
5. Мултивариационен регресионен модел на предикторите на тромботични усложнения при карцином на простатата	85
VI. ОБСЪЖДАНЕ	87
1. Клинична интерпретация на стойностите на Д - димер, АТ Ш и фибриноген при патологични състояния	87
2. Ограничения на нашето проучване	92
VII. ИЗВОДИ	93
VIII. ПРИНОСИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	95
IX. БИБЛИОГРАФИЯ	96

Използвани съкращения:

АТ III – антитромбин III

ВТЕ – венозен тромбемболизъм

БТЕ – белодробен тромбемболизъм

ДВТ – дълбока венозна тромбоза

ДИК – дисеминирана интравазална коагулопатия

ДПХ – доброкачествена простатна хиперплазия

ПИН – простатна интраепителиална неоплазия

ПСА – простатен специфичен антиген

ФДП (XLF) – фибрин деградационни продукти

АРГТ – активирано парциално тромбoplastиново време

ВМІ – индекс за телесна маса

LMWH – ниско молекулярен нефракциониран хепарин

РТ – протромбиново време

TF – тъканен фактор

VEGF – съдово ендотелен растежен фактор

VWF – Фон Вилебранд фактор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години въпросът за карцинома на простатната жлеза продължава да привлича вниманието и интереса на учените от цял свят. Той е предмет на обсъждане на почти всички национални и международни научни срещи, симпозиуми и конгреси. Този повишен интерес е резултат от особеното положение, което той заема сред човешката патология.

Съвременните познания за естественото биологично развитие на карцинома на простатата за сетен път показват, че той е уникален и неподражаем по своето протичане. При мъжете над 50 години той прогресира бързо, протича скрито, характеризира се с висока смъртност и непредсказуема еволюция. В този смисъл той не може да бъде сравнен с който и да било друг вид неоплазма.

Карциномът на простатната жлеза е на четвърто място по честота сред неопластичните заболявания при мъжете в България (1). Според Националния онкологичен регистър през последните десетилетия се установява увеличаване на заболеваемостта, с известно снижаване на възрастовата граница, като преобладават новорегистрираните случаи в осмото десетилетие на живота (9).

През последните години прави впечатление, че честотата на простатния карцином нараства бързо. Това най-вероятно се дължи на няколко причини като удължена средна продължителност на живота, по-добрите диагностични възможности и зачестяване на заболяването поради различни фактори. Ето защо в днешно време той е най-често диагностицирания малигнен тумор при мъжа в много страни и е на второ място след тумора на белия дроб като заболяване, което води до летален изход. Очакваното годишно повишаване на неговата честота е 3%. Това води до откриването на около 352 000 нови случая през 2000 година, докато през 1980 година те са били 235 000 (50). За съжаление само една част от това повишаване може да се обясни с удължаването на средната продължителност на живота, докато останалите причини все още остават неизяснени (299).

Ето защо проблемът за ранната диагностика и своевременно лечение на простатния карцином продължава да вълнува медицинската ни общност. Търсенето и въвеждането на нови диагностични методи потвърждава значимостта на заболяването и неговия здравен и социален ефект. Днес основните усилията на учените и клиницистите са насочени към ранната му диагностика и адекватно лечение с оглед неговата радикалност и запазване качеството на живот на пациентите. Усилията в тази посока през последните 20 години ни

въодушевяват, но твърде често и обезверяват. Днес всички постижения в диагностиката и лечението на простатния карцином задължително се потвърждават чрез клиничния опит. Резултатите са окуражителни и ние не трябва да спираме до тук.

Карциномът на простатната жлеза е исторически свързан с аномалии в хемостазата при човека. Редица автори считат, че кръвосъсирващите фактори като антитромбин III, плазминоген, фибриноген, Д - димер са в тясна връзка с туморната ангиогенеза, съдовата плътност на тумора, възможните усложнения след проведеното оперативно лечение и прогнозата за пациента в следоперативния период.

Настоящата дисертация е съвременен и актуален опит на автора да даде своя принос в тази насока, да се опишат и проследят промените в хемостазните показатели преди и след радикална простектомия, да се избере и препоръча качествен и съвременен подход за активно и динамично следоперативно проследяване и антитромботична профилактика с оглед повишаване качеството на живот на пациентите.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. АНАТОМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ НА ПРОСТАТНАТА ЖЛЕЗА

1.1. Анатомия на простатната жлеза

В публикуваната през 1953 г. книга „Biologia y patologia de la prostata” Vernet, S.G. описва подробно анатомията, физиологията и патологичните промени на простатната жлеза (340). Според него тя не е хомогенна, състои се от две части, разделени от междинна линия и епителната хиперплазия на жлезата предполага развитието на доброкачествена простатна хиперплазия.

По-късните публикации на Mc Neal, J. E. потвърждават идеите на Vernet, S.G.. Той разширява познанията за патологоанатомията и патофизиологията на простатната жлеза. McNeal, J. E. 1981 разделя жлезата на „централна”, „периферна” и „преходна” зона, чиито клетки се различават по своя строеж (214). Според него доброкачествената простатна хиперплазия произхожда от переходната зона, а простатния карцином от периферната зона на жлезата.

Простатната жлеза е нехомогенен орган. Тя се определя по-скоро като самостоятелно обособена анатомична област, отколкото като отделен орган. Според Blacklock, N.J. et al. 1977 г. при много животни простатните жлези се различават помежду си (43).

Простатната жлеза се намира в малкия таз. Тя е разположена между основата на пикочния мехур и урегиталната диафрагма. Нейната големина зависи от възрастта. Съставена е предимно от мускулна тъкан. При полово зрели мъже има формата на кестен с приблизителни дължина 3 см, ширина 4 см и дебелина 2,5 см. Теглото и около 20-30 грама. Жлезистата тъкан се развива с напредване на възрастта. Условно и за по-голямо удобство тя се разделя на няколко дяла:

- основа - разположена към шийката на пикочния мехур
- връх - насочен към уретрата и в контакт със сфинктера на уретрата и дълбоката напречно набраздена перинеална мускулатура
- два странични дяла - ляв и десен
- среден дял - разположен между двата странични дяла и насочен към кухината на пикочния мехур

Простатата е здраво фиксирана към околните тъкани и органи. Между нея и костите на таза се намират много съдове и съединителна тъкан. Тя обхваща кръгообразно уретрата непосредствено до пикочния мехур. Мускулни влакна от пикочния мехур преминават върху простатата и оформят m. prostaticus.

Задната повърхност на жлезата се отделя от ректума посредством съединително тъканен слой - фасция на Denonvillier. Това я прави особено достъпна и удобна за туширане през правото черво. При изследване на тази част от нея се опипва бразда, която разделя двата странични дяла на ляв и десен. При доброкачествена простатна хиперплазия тя обикновено се изглажда и изчезва. На горния край на жлезата откъм задната повърхност са разположени семенните мехурчета.

Простатата е покрита от капсула, която е съставена от плътна съединителна тъкан, примесена с гладко мускулни влакна. Тя е естествено продължение на фиброзно-мускулния слой на пикочния мехур. По предната и страничните повърхности тя е срастнала със жлезата, докато в областта на задната повърхност тя е по-хлабава и лесно се отделя от нея. Предната повърхност на простатата се намира на около 2 см зад симфизата и е покрита с богато кръвоснабдена мастна тъкан, която съдържа много вени (*plexus venosus*). Отзад и латерално простатната жлеза е в контакт с *m. levator ani*, а предната ѝ повърхност е фиксирана към симфизата чрез пубопростатните лигаменти, които са продължение на *fascia pelvicalis*.

Простатната жлеза се състои от 30 до 50 жлезни ацини. Каналчетата на отделните жлези се обединяват и накрая образуват 10-15 по-големи канала. Последните се вливат в *colliculus seminalis* разположени в простатната част на уретрата. Стената на жлезните канали е изградена от два вида клетки – секреторни и несекреторни. Освен жлези в нея има съединителна тъкан и гладки мускулни влакна. Те обхващат циркулярно малки групички жлези и при своето съкращение улесняват отделянето на простатния секрет.

Простатната жлеза се кръвоснабдява предимно от клонове на артериите, които хранят пикочния мехур - *a. vesicalis inferior*, *a. rectalis media* и *a. pudenda interna*. От последната се отделя и *a. prostatica*. *A. vesicalis inferior* отделя клонове за долната част на уретера, семенните мехурчета и след това навлиза в простатата в областта на 4 и 8 часа. След това тя се разделя на два основни клона – периферен и централен. Централният клон кръвоснабдява уретралната стена и периуретралната част от жлезата, докато периферният клон кръвоснабдява основната част от простатата.

Венозната система на жлезата се разполага между капсулата и фасцията на простатата - *pl. venosus prostaticus*. Той представлява гъста мрежа отделни клончета, които се вливат в разположените между простатата и ректума венозни сплетения. Венозните сплетения имат директна комуникация с *v. hypogastrica inferior* и *pl. venosus presacralis prevertebralis*.

Лимфните съдове на простатата се намират във връзка с лимфната система на пикочния мехур, външните и вътрешните илиачни съдове и лимфните възли около *n. obturatorius*. Лимфният дренаж се осъществява към илиачните и преаорталните лимфни възли.

Инервацията се осъществява от симпатикови и парасимпатикови нервни влакна. Първите инервират жлезните структури на простатата, а вторите имат отношение към мускулните влакна на органа.

1.2. Физиология на простатата

Простатната жлеза е допълнителна полова жлеза при мъжа с външна секреция.

Нейният секрет е съставна част на еякулата, увеличава неговия обем и има за задача да подпомага жизнеспособността на сперматозоидите. Неговото отделяне става в две фази - фаза на покой и фаза на активност. При полова възбуда секрецията се увеличава. Женските полови хормони предизвикват задръжка на секрецията. Простатния секрет представлява алкална течност с белезникав цвят и характерна миризма. Coffey, D.S. 1978 установява, че той съдържа лимонена киселина, калций, цинк, кисела фосфатаза, фибринолизин и други (74). Секретът се образува непрекъснато и се отделя навън с урината. При ерекция неговият обем се увеличава. По време на еякулация настъпва алфа адренергична стимулация на жлезата и той се смесва със спермата. В резултат на това се отделя течност, съдържаща сперма, която преминава от *ampulla vas deferens* до задната уретра. Същата симпатиковска стимулация предизвиква затваряне на мехурната шийка и изхвърляне на еякулата в задната уретра. Предполага се, че простатния секрет поддържа жизнеспособността на сперматозоидите и има отношение към фертилитета, но според Blandy, J. et al. 1966 все още има много въпросителни в тази насока (45). Според Homonnai, Z.T. 1979, Kvist, U. 1980 простатният секрет е богат на цинк и намаляването на концентрацията му води до намалена подвижност на сперматозоидите и стабилност на ядрата им (146, 179). Установена е и пряка връзка между значението на простатния секрет за мъжкия инфертилитет и имунопатологията. Проучванията на Upadhyaya, M. et al. 1984 показват, че при субфертилни пациенти се открива повишен титър на спермалните антители, които намаляват подвижността на сперматозоидите и възможността за оплождане на яйцеклетката (332).

Остава неразрешен все още въпросът дали простатата притежава и вътрешносекреторна функция. Предполага се, че тя отделя хормон с неустановена досега химична структура. Неговата функция се свързва с някои промените в организма, които настъпват след хирургичното лечение на доброкачествена простатна хиперплазия, включително и намаляването на половата функция при една част от болните.

2. ИСТОРИЧЕСКИ ДАННИ

Според Edwards, L. 1983 Заболяванията на простатната жлеза се коментират още 1500 г. пр.н.(97). По-късно Херофил (около 300 г. пр. н.е.) от Александрия за първи път описва този човешки орган и му дава днешното наименование. Той използва термина „простата”, което означава „този, който стои отпред” и той се запазва до наши дни.

През Ренесанса Ambroise Pare (1510 – 1590 г.) дава своя принос по отношение строежа и структурата на простатната жлеза.

Аденомът на простатната жлеза е описан за първи път от Morgagni, G.V. 1760 според когото той не е новообразуване, а нормален процес в резултат на напредването на възрастта (224). Той споменава и за карцинома на простатата с метастази в слабинната област.

През 1786 г. английският хирург John Hunter от Арден прави първото описание на простатния карцином. Той установява злокачественото образуване чрез ректално туширане и го характеризира на “безболезнен тумор с каменна плътност”, което Fergusson, J.D. et al. 1971 потвърждава (156, 109).

По-късно други автори също правят описание на карцинома на простатата без да дават точна диференциация между него и доброкачествената простатна хиперплазия. През 1949 г. Broide, V.C. споменава за два случая на несъмнен простатен карцином, а през 1851 г. J.Adams (1806 – 1877г.) публикува разликите между карцинома на простатата и ДПХ. През 1861 г. известния за времето си хирург S.H. Thompson споменава за 12 карцинома и подчертава, че това е много рядко за времето си заболяване. Според Aboulker, P. 1971 г. той протича тежко и трудно се разпознава (24).

Днес според нас простатния карцином се среща често, протича скрито и дълго време за съжаление остава недиагностициран.

3. ЧЕСТОТА И ЕПИДЕМИОЛОГИЯ НА КАРЦИНОМА НА ПРОСТАТНАТА ЖЛЕЗА

3.1. Честота

Първата статистика за честотата на простатния карцином е направена от Tanschau 1844 който между 1830-1840 г. в Париж е изследвал 8289 пациенти, починали от заболяването. Той го установява само при 5 пациенти (цитат по Cortcoat, M.J., 1996)

Albaran, I. et al. 1900 в своето хистологично проучване на увеличена простатна жлеза са установили злокачествени промени при 14 % от пациентите (28). Young, H.H. 1903 открива злокачествени промени в простатата при 21 % от 318 пациенти с обструкция на

шийката на пикочния мехур (360). Според редица автори като Маринбах, Е.Б. 1967, Verutti, A. et al. 1980, Mostofi, F.K 1975, Пытель, А.Я 1970 карциномът на простатната жлеза съставлява от 98,6 % до 99,5 % от злокачествените новообразувания на този орган и 4 % от всички злокачествени заболявания у мъжа (6, 41, 228, 12). Според Червенаков, А. и сътр. 1966 сравнението между карцинома на простатата и ДПХ показва съотношение 10:100 (21).

Научната група към Veterans Administration Cooperative Research Group (VACRG) начело с Вуар, D.P 1977 съобщава, че простатния карцином е на второ място след карцинома на белия дроб от всички злокачествени тумори в човешкия организъм при мъжа (60).

3.2. Епидемиология

Най-висока смъртност при различните възрасти и географско разпространение на простатния карцином се установява в Швеция, Швейцария и Норвегия, а най-ниска в Тайван, Филипините и Япония. Тя зависи и от географската ширина. В Северна Канада 23 на 100 000 заболяват от рака на простатата, а в Южна Канада – 46,2 на 100 000. Аналогични са данните и за САЩ.

R. Kuss 1976 съобщава, че 50 % от мъжете до 50 години и 70 % от мъжете до 70 години страдат от това заболяване (161). Според Fergusson, J. D., 1973 карциномът на простатната жлеза има най-голяма смъртност от всички неопластични заболявания на урогениталната система (108).

Сравнителното проучване на разпространението на злокачествените заболявания по континенти, страни и отделните райони в тях се затруднява от различията в разпределението на населението по възрастови групи, пол, ниво на онкологичната помощ и недостатъци на използваните статистически методи. Изучаването на тяхното разпространение може да става само по данни от смъртността и аутопсионни протоколи, които са различни.

Според Miles, B.J. 1989 в САЩ заболеваемостта от простатен карцином сред негроидната раса е 2 пъти по-висока в сравнение с тази при мъжете от европеидната раса (220). Все още причините за тези разлики не са категорично установени. От друга страна жълтата раса страда от това заболяване 2-2,5 пъти по-рядко в сравнение с европеидната раса.

Според Steinberg, G.D et al. 1990 наследствените фактори повишават потенциалния риск от развитие на простатен карцином (315). Те посочват, че 8 % от пациентите с карцином на простатата имат баща или брат със същото заболяване. Неговата честота е в зависимост от възрастта на мъжете и според Скобля, Е.С. 1975 се движи между 15-45 % при мъжете над 50 години, в 75 % между 60-85 години и 80 % над 90 години (16). По принцип той е

заболяване на третата възраст. Напоследък заболяването се среща и в по-младата възраст и по данни на Митров, Г. 1979 се установява при 4-7 % от мъжете (7). Честотата и тежестта на това заболяване се потвърждават от Flamant, R. et. al. 1978, който съобщава, че във Франция годишно умират 8000 мъже от карцином на простатата (114). За нашата страна по данни на Комитета на ЕССИ средно по 370 мъже умират годишно от това заболяване. Днес се приема мисълта на френския уролог Aboulker, P. който казва, че ако един мъж не умре от нищо друго, то той неминуемо ще загине от карцином на простатната жлеза.

По данни на Holman, C. et. al. 1981 през последните няколко десетилетия смъртността от карцином на простатата в Австралия се е увеличила 5 пъти, а в Англия и Уелс – 3 пъти (145).

4. СЪВРЕМЕННИ СХВАЩАНИЯ ЗА ЕТИОЛОГИЯТА НА ПРОСТАТНИЯ КАРЦИНОМ

Днес съществуват схващания, че между функцията на простатната жлеза и хормоналната дейност на тестисите съществува определена тясна физиологична взаимозависимост. Известно е, че след кастрация настъпва атрофия на простатата. Освен това тя се последва и от спиране на нейната секреция. В резултат на това се получава компенсаторно разрастване на периуретралните жлези, което замества атрофиралата простатна тъкан. Обратно при имплантиране на тестисна тъкан или инжектиране на мъжки полови хормони простатата се уголемява и увеличава секрецията си.

За първи обоснована теория за ендокринната генеза на простатния карцином създава Синицин, Ф. И. 1884 (15). Още тогава той установява зависимост между туморите на простатната жлеза и състоянието на тестисите. Основавайки се на тези наблюдения през 1884 г. Ф.И.Синицин прави двустранна кастрация на двама болни с хипертрофия на простатната жлеза. След операцията състоянието на болните се подобрило значително. Във връзка с този резултат той за първи път обръща внимание на хормоналната генеза на заболяването, включително и при карцином на простатната жлеза. По-късно и други автори като Кърджиев, Б. и сътр. 1959, Злобин, А. П и сътр. 1974 потвърждават дисхормоналната природа на атипичните разраствания на епитела на простатната жлеза като предраково заболяване (5, 3).

Чрез използване на опитни животни Ishizuka, O. et al.1996, Igawa, Y. et al.1993 по-късно също доказват, че простатната жлеза влияе върху функцията на тестисите, създава условия за развитието на сперматозоидите и стимулира тяхната подвижност (158, 157).

В значителен брой проучвания като това на Ahluvalia, B. et al 1981 е установено повишено ниво на половите хормони – предимно естрогени – особено при пациенти със злокачествени епителни тумори, включително рак на простатата (26). Дилман, В. 1974 определя ролята на хормоните в две различни направления (7):

- в етиологията на някои форми на рака
- повлияване на вече развилия се рак

Той достига до извода, че хормоните действат като канцерогенни вещества.

Днес съществуват данни от последните 4 десетилетия за успешна хормонално лечение на голяма част от простатните карциноми. Това се приема от Balogh, F. et al. 1968, Franks, L.M. 1973 като факт в подкрепа на хормоналната теория за етиологията на заболяването, която все още не е доказана (35, 118).

В тази посока са извършени и насочени изследвания от Hill, P. et al. 1982 за влиянието на диетата върху хормоналното равновесие у мъже, което би могло да стои в основата на по-голямата честота на простатните карциноми (143).

При светлинно микроскопските проучвания върху патологичните процеси в простатната жлеза Овнатанян, К.Т 1939, Шабад, Л.М. 1954, Hryntschak, T. 1951, Пелова-Мъжлекова, Н. 1967 откриват връзката с хроничните неспецифични, фиброзните и грануломатозни възпалителни процеси (10, 22, 147, 11). Някои автори като Кобелев, А. А. 1974 ги възприемат като предракови заболявания на простатата (4). До известна степен възникването и развитието на простатния карцином Шабад, Л.М. 1954 свързва и с доброкачествената простатна хиперплазия (22).

През последните години все по-упорито се търсят клинично морфологични критерии за определяне на евентуалната етиологична роля на специфичната вирусна инфекция. В това отношение твърде голям интерес представляват данните на Sanford, E. et al. 1979 за наличие на цитомегаловирус – специфичен антиген в клетъчни култури от рак на простатната жлеза (296). Твърде противоречиви са резултатите относно етиологичната роля на херпес вирус тип 2. От една страна се изтъква доста по-високото ниво на антигени срещу херпес вируса у болни с рак на простатата. В други проучвания с такава насоченост на Herbert, J. et al. 1976 подобна зависимост не се установява и то по-точно спрямо херпес вирус тип 2, който е най-честият причинител на вирусни инфекции в половата система (140).

Твърде интересни са и някои ултраструктури проучвания върху неопластични и хиперпластични клетки, както и върху клетъчни култури. Вирусоподобни включвания са намерени от Ohtsuki, I. et al. 1976 само в част от изследваните туморни клетки и в клетките на само 1 от случаите с хиперплазия на простатата (254).

5. КЛАСИФИКАЦИЯ И БИОЛОГИЧНИ ПРОЯВИ НА КАРЦИНОМА НА ПРОСТАТНАТА ЖЛЕЗА

5.1. Класификация на карцинома на простатната жлеза

Заедно с ранната диагностика на простатния карцином трябва да бъде уточнена и неговата научна класификация с оглед събиране на информация и нейното възпроизвеждане във времето. Това увеличава прецизността на комуникацията и обмен на данни между различните научни и клинични центрове.

През 1952 г. Whitmore, W. F. замисля, а през 1956 г. предлага анатомична класификация по системата A, B, C, D за Северна Америка (350):

- стадий A – случайно открит карцином
- стадий B – палпиращ се възел без засягане на капсулата
- стадий C – туморът обхваща и преминава извън простатата и/или засяга семенните мехурчета
- стадий D – далечни метастази

През 1959 г. American Joint Committee for Cancer Staging and End-Results докладва и препоръчва същата система, но използва номерация с римски цифри – I, II, III, IV. През 1977 г. Yuag, D.P. публикува тази класификация и тя се възприема от Veteran Administration Cooperative Research Group (VACRG) (60).

Тази система за класификация на простатния карцином е доста опростена, поради което имаше своите предимства. За по-голяма точност обаче се наложи въвеждане на допълнителни обяснения във всеки отделен стадий. В крайна сметка тази система не даде възможност за по-прецизно определяне и класифициране на основния туморен процес.

T – локален растеж на тумора

Създател на TNM (тумор, нодул, метастаза) системата е французина Pierre Denoix в годините между 1943 и 1952. До 1967 г. са публикувани 9 брошури, съдържащи информация за класификацията. Тяхното оформяне в отделна книжка представлява първото издание на TNM класификацията. Второто и третото издания са съответно допълнени и наново редактирани от UICC 1974, 1987 (330, 331). Четвъртото издание е направено от UICC, 1987 и Hermann, Ed.P., 1987 (329, 141). TNM системата се допълва непрекъснато през следващите години от редица автори като Iversen, P. et al. 1991 (159).

Още през 1950 година Union Internationale Contre le Cancer (UICC) възприема като база за своята работа TNM класификацията. Подкомитет на СЗО през 1952 г. дава основните определения за локалния растеж и малигненост на тумора. Тази класификация е възприета

през 1982 г. от скандинавските страни и EORTC (159). От тогава започват и опитите за международно сътрудничество и уеднаквяване за класификация на човешките тумори. Последователно се представят общите правила на системата TNM, описание на анатомичните области, регионалните лимфни възли, описания на отделните категории при предлечената клинична класификация (TNM) и при следоперативната хистологична класификация (pTNM), хистологичните степени (G) и групирането по стадии.

N – регионални лимфни възли

Nx – липса на достатъчно данни за определяне състоянието на регионалните лимфни възли

N0 – няма данни за засягане на регионалните лимфни възли

N1 – засегнат е само един регионален лимфен възел (по-малък или равен на 2 см.)

N2 – засегнати са множество регионални лимфни възли (по-малки или равни на 5 см.) или наличие на единична метастаза (по-голяма от 2 см., но по-малка или равна на 5 см.).

N3 – данни за фиксирана група възли с размери над 5 см.

M – отдалечени метастази

Mx – няма достатъчно данни за доказване на далечни метастази

M0 – няма клинични симптоми за отдалечени метастази

M1 – наличие на далечни метастази

pTNM патологична класификация –при нея pT, pN и pM отговарят на T, N и M само, че са потвърдени морфологично

G – хистологична степен (grading) на диференциация

Gx – няма грейдинг (степенуване)

G1 – високо диференциран

G2 – умерено диференциран

G3 – ниско диференциран

G4 – недиференциран

Американските автори използват клиничната класификация A, B, C, D, която според Rubin, Ph., 1969 може да бъде приравнена към TNM по следния начин – A – TxNxM0, B – T1-T3NxM0, C – T4N+M0, D – T1-T4NxM1a-b (289).

5.2. Биологични прояви на простатния карцином

Ранното установяване на естествените биологични прояви на простатния карцином се затруднява от анатомично-топографските особености на простатната жлеза. Според McNeal, J.E. et al. 1990 точното определяне на обема и хистологията на жлезата до голяма степен могат да предвидят неговото бъдещо биологично развитие (215).

Локален и регионален растеж

Днес е общоизвестно, че простатния карцином се развива от собствената простатна тъкан. Периферното му разположение определя и тенденцията за ранно засягане на капсулата. Той няма връзка с доброкачествената простатна хиперплазия поради различната им локализация, произход и хормонална зависимост от половите жлези.

Простатния карцином обикновено стеснява лумена на уретрата, встрани обхваща семенните мехурчета, а назад прораста към ректума и понякога затруднява дефекацията.

Наличието на собствена вътрежлезна лимфна мрежа обяснява ранното засягане на регионалните лимфни възли. Според Golimbu, M. et al. 1979 обикновено се засягат илиачните, обтuratorните, пресакралните и преисхиадичните лимфни групи (123).

Narayana, A. et al. 1985 препоръчват състоянието на тазовите лимфни възли да бъде оценено включително и хистологично преди започване на лечението (239). Според Verutti, A. et al. 1980 лимфната система се засяга съответно в 10 % и 70-80 %, когато карциномът на простатата е вътрекапсуларен или преминава границите на капсулата (41).

По данни на Sanford, E. et al. 1979 на второ място по честота карциномът на простатата метастазира в костната система (236). Там той предизвиква остеобластна пролиферация. Честотата на костните метастази е твърде различна и е в пряка зависимост от използваните методи на изследване. Те засягат предимно костите, богати на медуларна субстанция. Това обяснява тяхното избирателно локализиране в тазовите кости и гръбначния стълб. Някои локализации са изключително редки – мозък, кожа, тестиси, епидидим, уретери, уретра, пенис и др. При всички костни метастази се наблюдават остеолитични процеси. Това се потвърждава от наличието на калциемия, калциурия и високо съдържание на алкална фосфатаза.

Освен изброените по-горе промени в различни органи и системи, дължащи се на разпространението на неопластичния процес, простатния карцином предизвиква и изменения от паранеопластичен характер. Според Dodds, R. et al. 1980 в тази група от патологични прояви най-важно значение има намаляване активността на антитромбин III (92). Alving, B. et al. 1976 счита, че това може би стои в основата на възникващите в някои случаи изменения от типа на дисеминираната интравазална тоагулопатия (29). Освен това редица автори като Morganstern, S. et al. 1977, Червенаков, А. и сътр. 1966 описват

масивни кръвоизливи, предимно в тазовата област при пациенти с карцином на простатата (225, 21). До известна степен се установява и взаимовръзка между обема на разпространение на туморния процес и степента на промените в кръвосъсирването (92).

5.3. Простатна интраепителиална неоплазия (ПИН)

Терминът ПИН беше предложен, за да замени “дисплазия”. Това подсказва, че ПИН е ранен стадий от развитието на някои простатни карциноми. Това представлява карцином *in situ*, но развитието му е непредсказуемо и в много случаи заболяването не прогресира. Според Bostwick, D.G. et al. 1987 ПИН бива две степени – ниска и висока (49).

6. КЛИНИЧНА ДИАГНОСТИКА

Ранната клинична диагностика на простатния карцином представлява основна цел на уролозите по цял свят. Според Klein, E.A et al. 1991, Lange, P.H. et al 1987, Voisin, E. et al 1991 това позволява неговото своевременно и адекватно оперативно, а в някои случаи и комбинирано лечение (171, 189, 342).

6.1. Субективни прояви

Те се появяват едва тогава, когато настъпи функционално нарушаване на уринирането. Обикновено те са краткотрайни и пациента не им обръща сериозно внимание. Много често имитират оплакванията при доброкачествена простатна хиперплазия.

- болката в областта на таза с ирадиация към перинеума, ректума и опашната кост е често първото неприятно и тягостно усещане за пациента.

- смущенията в уринирането са характерни, но не специфични симптоми. За разлика от ДПХ при тях липсва тенденция към подобрение. Най-често пациентите се оплакват от чести позиви за уриниране, дизурия и слаба струя.

- костни и неврогенни смущения – те са късни симптоми и са израз на близки и далечни метастази

- съдовоциркулаторни прояви – това са честити тромбофлебити, синдромът на Raynaud, венозна или лимфна стаза на долните крайници, предизвикана от компресия.

6.2. Обективни прояви

6.2.1. Ректално туширане – при 80 % от пациентите опитният уролог поставя диагнозата чрез ректално туширане, който според повечето автори остава основен метод в

диагностиката на простатния карцином. Чувствителността на метода е 50 %, а специфичността - 75 %. Според Pedersen, K.W. et al. 1990, Thompson I.M. et al 1984, Friedman, Gr.D. et al. 1991 при системното му извършване като скрийнинг ректалното туширане може да диагностицира заболяването между 0,5 – 20 % (267, 321, 120). Преобладаващото мнение днес, е че диагнозата простатен карцином може да бъде поставена само чрез морфологично изследване и само тогава може да започне съответното лечение.

6.3. Биохимична и радиоимунологична диагностика

Според нас няма биохимично изследване, което да е строго специфично за карцином на простатата. В някои случаи повишеното ниво на С3 и С4 фракциите на комплемента и трансферина в секрети от простатата се препоръчва от Grayhack, I. et al. 1979 за селектиране на групи с по-висок риск (125). Напоследък някои имунохистохимични особености на простатните карциноми се използват с известен успех от Jobsis, A. et al. 1978 за откриване на метастази при морфологичната диагностика (160). При търсенето на общ морфологичен белег за наличие на туморен процес според Labat-Robert, J. et al. 1981 интерес представлява описаната напоследък промяна в разпределението на фибронектин в базалните мембрани на жлезата, докато той остава непроменен в тези на кръвоносните съдове (182).

6.3.1. Туморни маркери

През последните години усилията на изследователите са насочени неотклонно и последователно към откриването на идеалния туморен маркер за карцином на простатата.

Туморните маркери са антигени, които се образуват в самата туморна клетка или се намират на нейната повърхност. По своя произход те са два вида. Първата група са органно специфични субстанции, произвеждани от самия орган. Такъв е простатно специфичния антиген (ПСА), който се произвежда от здравата простата, но при наличие на простатен карцином неговото ниво се повишава. Втората група туморни маркери представляват патологично възникнали секрети в герминативните клетки, нехарактерни за дадения пол.

В миналото големи надежди се възлагаха на киселата и алкална фосфатази. Това са ферменти, които отцепват неорганични фосфати от органичните фосфорни естери.

Кисела фосфатаза

Според Aubert , J. et al. 1990 повече от половин век киселата фосфатаза е приемана за златен стандарт в диагностиката на простатния карцином (33). При това заболяване тя се повишава значително, което се използваше широко от Fair, W. et al. 1993, Veenema, R. et al. 1977, Cooper, W.H. et al. 1988 за диагностично определяне на клиничния стадий, като прогностичен белег за ранно метастазиране и при мониториране ефекта от провежданото лечение (106, 338, 82).

Алкална фосфатаза

Остеобластичната активност води до повишаване нивото на алкалната фосфатаза в кръвния серум. При голям процент от пациентите с простатен карцином нивото на този туморен маркер е повишено. Според Wejsman, Z. et al.1978 това може да служи и като критерий за наличие на костни метастази (348).

Канцероембрионален антиген

Той е описан за първи път от Gold, P. et al. 1965, Kane, R.D. et al. 1978 и е канцерофетален антиген. Произвежда се по време на ембрионалното и фетално развитие и се подтиска след раждането. Неговото ниво се повишава и при простатен карцином (122, 166).

Простатен специфичен антиген (ПСА)

През 1979 г. Wang, M.C. et al. изолират за първи път простатния специфичен антиген (ПСА) от екстракт от човешка простата (344). Според Stamey, T.A. et al. 1987 след няколко годишно клинично изпитване ПСА е най-добрия критерий при диагностицирането на простатния карцином и ДПХ (312). Той е гликопротеин с молекулно тегло 34 килодалтона. ПСА се образува предимно в простатната тъкан и се увеличава при карцином на простатата. Ford, T.F. et al. 1985, Stein, B.S. et al. 1982 установяват, че той е органоспецифичен, но не е туморно специфичен критерий (314, 115).

Гама семино протеин

Той е гликопротеин, изолиран за първи път от Naga, M. et al. 1966 (132). Според Siddall, J.K. et al. 1986 неговата надеждност за мониториране и прогноза на простатния карцином е висока (309).

6.4. Микроелементи

Интерес представляват промените в нивото на микроелементите в простатната тъкан при карцином на простатната жлеза. Те намират приложение за мониториране прогресирането на туморния процес.

Селен

Днес е установено, че серумното ниво на селен при пациенти с простатен карцином е понижено. Според Broghamer, W.L. et al. 1976 колкото е по-ниско, толкова е по-голям риска от метастази на основното заболяване, рецидив и ранна смърт (54).

Цинк

При пациенти с карцином на простатата нивото на цинк в серума е намалено, а на кадмия увеличено.

Мед

Според Lightman, A et al. 1986, Цветков, М. 1998 използването на серумното ниво на медта като диференциално диагностичен критерий при злокачествени заболявания на простатата все още не е добре изяснено (200, 17).

В заключение можем да кажем, че референтните стойности на олигоелементите в биологичните течности и тъкани и информативното им съдържание при простатен карцином предизвикват подчертан интерес към тяхното изследване.

6.5. Нарушения в имунния отговор

Савинов, В.А. и сътр. 1985, 1986 препоръчват промените в имунния отговор да бъдат използвани като допълнителни критерии при диагностиката на метастатичния простатен карцином (13, 14).

Напоследък Starling, J. et al. 1982 откриват моноклонални антитела, които реагират специфично срещу туморните клетки в простатната жлеза и не проявяват активност спрямо останалите клетки в човешкия организъм (313). Установени са и антитела, които реагират специфично спрямо антигените на простатната жлеза.

7. ПРОСТАТЕН СПЕЦИФИЧЕН АНТИГЕН И КАРЦИНОМ НА ПРОСТАТАТА

Проблемът за диагностиката и лечението на рака на простатата продължава да се проучва от световната медицина. Откриването и въвеждането на нови диагностични и терапевтични методи доказва значимостта на заболяването и неговия здравен и социален ефект. Основните усилия са насочени към ранната диагностика и минимално инвазивно лечение със запазване качеството на живот на пациентите. Въвеждането на ПСА в диагностиката на простатната жлеза доведе до откриване на карцинома в ранен стадий. Разработването на този туморен маркер и въвеждането на свободната фракция на ПСА

позволи по-точно разграничаване на доброкачествените заболявания на простатата от аденокарцинома.

7.1. Исторически аспекти и откриване на ПСА

Първоначално ПСА е открит от Nara, M. et al. в Япония през 1971 г (131). Откривателите считат, че този новооткрит компонент на човешката семенна течност е гама протеин. Две години по-късно Li, T.S. et al. 1973 успяват да изолират протеина и установяват, че той има ниско молекулно тегло от около 34 килодалтона (199). През 1978 г. Sensbaugh, G.F. първи характеризира този протеин като използва електрофореза и определя точното му молекулно тегло от 30 килодалтона и изоелектричните му точки между 6,5 и 8,0 (302). През 1979 Wang, M.C. et al. изолират антигена от простатната тъкан, пречистват го и демонстрират неговата специфичност (344). Той е серумна протеаза от каликреиновата група белтъци, която се секретира от нормалните, доброкачествените и злокачествените епителни клетки на простатата. Според Nadji, M. et al. 1981, Watt, K.W.K. et al. 1986 от там тя попада в семенната течност, простатния секрет, серума и урината (235, 347). Papsidero, L.D. et al. 1980 успяват да идентифицират ПСА в човешки серум и да верифицират неговата идентичност с ПСА, изолиран директно от простатната тъкан (265). Според Kuriyama, M. et al. 1980, Wang, M.C. et al. 1981 ПСА има действие, което напомня това на трипсина (178, 346).

При нормални физиологични условия много малка част от ПСА попада в общата циркулация на организма. Напоследък чрез използването на нови висококачествени методи може да се определят с висока точност дори минимални количества от попадналия в серума ПСА. Това определя и увеличеното в последно време клинично значение на този гликопротеин.

7.2. Биомолекулярна характеристика на ПСА

Ензимно активните форми на ПСА могат да взаимодействуват с протеазни инхибитори в човешкия серум и да образуват ПСА-инхибиторни комплекси. Такъв серумен протеазен инхибитор е алфа-1-антихимотрипсина (АХТ). Той е основната форма, в която съществува специфичният антиген в серума на болни от рак на простатата. Според Oesterling, J.E. et al. 1993, Stamey, T.A. et al. 1987 този комплекс има полуживот 2-3 дни (252, 312). Според Dejter, S.W. et al. 1988, Maatman, T.J. 1989 друга важна характеристика на ПСА е, че няма денонощен ритъм (90, 205).

От чисто биохимична гледна точка според Murphy, G.P. 1991, Bilhartz, D.L. et al. 1991 ПСА е едноверижен гликопротеин, който съдържа 240 аминокиселини (93%) и 4

карбохидратни странични вериги (7%) (233, 42). Lilja, H. 1985, Watt, K.W.K. et al. 1986 определят аминокиселинната последователност при ПСА, която е с висока степен на хомоложност с другите неутрални серумни протеази и неговата функция е може би да лизира семенните коагули (201, 347). Wang, M.C. et al. 1982 определя триизмерната структура на ПСА чрез използването на моноклонални антитела (345). В допълнение към това генното кодиране на ПСА е локализирано в 19-та хромозома. Различни проучвания на Lundwall, A. Et al. 1987, Riegman, P.H.J. et al. 1988, Schedlich, L.J. et al. 1987 показват изключителна хомоложност между ПСА и протеазите от каликреиновото семейство (203, 285, 298). Papsidero. L.D. et al. 1980 използвайки имунопероксидазно оцветяване демонстрират, че ПСА е локализиран само в епителните клетки на простатната жлеза (265).

7.3. ПСА и карцином на простатата

ПСА може да бъде открит в серума на млади мъже с малки, нехиперпластични простати, възрастни мъже с ДПХ и такива с локализиран или метастатичен простатен карцином. Като знаем ролята на ПСА в диагностиката на пациенти с простатен карцином е важно да определим значението му за диференциране на доброкачествени от злокачествени простатни заболявания.

Напоследък много автори като Brawer, M.K. et al. 1992, Catalona, W.J. et al. 1991, Labrie, F. et al. 1992, Mettlin, C. et al. 1993 препоръчват серумния ПСА за ранно откриване на простатния карцином при мъже без симптоматика, но в рисковата възраст за това заболяване (52, 63, 183, 218). В резултат на това Американската урологична асоциация, Американското дружество за борба с рака и Американският комитет по радиология в лицето на AUA 1992, Mettlin, C. et al. 1993 горещо препоръчват изследването на ПСА в комбинация с ректалното туширане за оценка на простатната жлеза при мъже над 50 години (218, 32). Все пак трябва да отбележим, че неговата стойност може да е значително над референтните граници при други заболявания и манипулации - остър простатит, инфаркт или исхемия на простатата, ДПХ, уретроцистоскопия, биопсия и масаж на простатата. Ето защо след такива манипулации Ynan, J.J. et al. 1992 препоръчва период от 2-3 седмици преди да се извърши определяне нивото на ПСА (358).

След като ПСА не е специфичен маркер за карцином на простатата, а за простатната тъкан той не е идеалният туморен маркер. От друга страна ПСА е от голяма полза за ранна диагностика на простатния карцином и лечимо начално заболяване. С други думи ПСА трябва да притежава висока чувствителност и специфичност, малък брой фалшиво негативни и позитивни резултати и висока отрицателна и положителна стойност за

откриване и отдиференциране на простатния карцином от ДПХ. Това са идеалните характеристики на всеки туморен маркер за простатен карцином. Според Bazinet, M. et al. 1994, Venson, M.C. et al. 1992 стойностите на ПСА, говорещи за простатен карцином, трябва да бъдат съобразени с обема на простата (37, 40).

Изследването PLESS според Roehrborn, C.G. et al. 1999 показва, че ПСА се произвежда изключително от епителните клетки в простатата и повишените нива са типични за пациенти с ДПХ и простатен карцином (287). Според Roehrborn, C.G. et al. 2000 г. ПСА може да бъде използван като прогностичен фактор за бъдещ растеж на простатната жлеза. Днес с направените задълбочени проучвания вече са доказани възможностите на ПСА и ректалното туширане като методи за ранна диагностика на простатния карцином (288). Тези методи се използват от общопрактикуващите лекари при първичните прегледи и оценки на мъжете с оплаквания от страна на долните пикочни пътища.

Доказателството за взаимовръзка между ПСА и обема на простатата и напредване на възрастта дава възможност за лесно диагностициране в урологичната практика на риска от карцином на простатата. Ето защо Mochtar, C.A. et al. 2003, Hochberg, D.A. et al. 2000 считат, че определянето на серумния ПСА е сравнително евтин и лесно приложим метод за тази цел (221, 144). Според Цветков, М. и сътр. 1995 ректалното туширане може да се прилага в комбинация с ПСА като скрийнингово изследване на пациентите за ранна диагностика на простатния карцином (19). Скрийнинговите клинични тестове трябва да притежават 90% чувствителност и специфичност, до 10% фалшиво негативни резултати и до 20% фалшиво позитивни резултати. Brawer, W.H. et al. 1989, Cooner, W.H. et al. 1990 посочват, че само комбинацията на ректално туширане и трансректална ехография би могла да повиши диагностичната достоверност на ПСА от 60% на 80% (53, 83).

Според Bruskevitz, R. et al. 1999 повишени нива на ПСА се установяват при пациенти с големи простатни жлези или простатен карцином (58). Според Lange, P.H. et al. 1989, Partin, A.W. et al. 1990 чувствителността на ПСА като диагностичен маркер при нива над 4 ng/ml. е 57%, а при нива над 10ng/ml. е 96%, а като прогностичен маркер съответно 49% и 75% (188, 266).

По данни на Meigs, J.V. et al. 2001 повече от една четвърт от мъжете над 50 години се оплакват от СДПП (217). Обикновено ПСА се повишава при пациенти с карцином на простатата, но неговите завишени стойности прогнозираат увеличен обем на жлезата, риск от остра ретенция на урината и необходимост от оперативно лечение.

Според Ochiai, A. et al. 2005 при направените от него проучвания на антропометричните параметри установява, че нивото на ПСА е в корелация с обема на простатната жлеза (250). В заключение той счита, че различните нива на ПСА се влияят от размерите на

тялото и по-специално от плазмения обем, но при постоянни стойности на възрастта и обема на простатата. При тези условия ПСА може да бъде прогностичен критерий за карцином на простатната жлеза.

7.4. Диагностична стойност на отношение свободен/тотален ПСА

Безспорно е, че изследването на ПСА в ежедневната практика води до откриване на простатния карцином в ранен стадий. Според Luboldt, H.J. et al. 2001, Reissigl, A. et al. 1996 прилагането на съотношението свободен/тотален ПСА и определяне на гранична стойност за наличие на карцином подобрява ранната диагностика и предпазва пациентите от ненужна биопсия особено в границите на ПСА тотален 4 -10 ng/ml. (202, 277).

Catalona, W.J. et al. 1997, Martinez-Pineiro, L. et al. 2004 определят гранична стойност на съотношението между 0,23 -0,27 и считат, че така се открива карцинома на простатата в 94.4% (64, 212). Авторите отбелязват, че съотношението се променя от възрастта на пациента и обема на простатата.

Haese, A. et al. 2002 прилагат съотношението при ПСА тотален от 2 - 4ng/ml и при 4 - 10ng/ml. (129). Те определят гранична стойност за съотношението между 0,18 - 0,20. Според тях за доказване на простатен карцином при първата група не са необходими значително повече простатни биопсии. Uzzo, R.G. et al 2003 откриват в 32% от пациентите с ПСА тотален между 2 - 4 ng/ml и с отрицателно дигитално ректално изследване на простатата простатен карцином, като пациентите имат гранична стойност на съотношението под 0,27 (334).

Ролята на съотношението свободен/тотален ПСА се изследва от някои автори и в границите на тотален ПСА между 10 – 20 ng/ml. Според Morote, J. et al. 2002, които определят гранична стойност на съотношението 0,25, ролята му при двете групи пациенти с тотален ПСА между 4 - 10 и 10 - 20 ng/ml е съпоставима с резултатите, получени от извършената простатна биопсия (226).

Akdas, A. et al. 1997 заключават, че съотношението свободен/тотален ПСА подобрява диагностиката на простатния карцином в по-голяма степен от изследването само на тотален ПСА (27). Съотношението е особено показателно при пациенти с постоянен уретрален катетър и променливи стойности на ПСА тотален. Подобно мнение споделят Recker, F. et al. 1998, които изтъкват значението на съотношението свободен тотален ПСА пред ПСА тотален при пациенти с повишен ПСА тотален между 4 - 10 ng/ml. (276).

Проучванията на редица автори в тази насока показват наличието на положителна корелация между нивото на ПСА, антиромбин III, Д-димер, плазминоген, фибриноген и следоперативното кървене.

8. ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ТУМОРИ И ПРОСТАТЕН КАРЦИНОМ

Смъртността, която се дължи на туморните заболявания се е увеличила чувствително през последните години в сравнение с началото на века (4% през 1909 г. срещу 20% през 1990 г.). Днес злокачествените заболявания заемат второ място след сърдечно-съдовите като причина за смъртта.

В тази тъжна статистика делът на урологичните тумори не е малък. Според Hill, C. et al. 1989, Moskovitz, B. et al. 1987, Robel, P. 1988, Struve, I. 1993 карциномът на простатната жлеза заема второ или трето място като причина за смъртта при мъжа (142, 227, 286, 317). Според Becker, N. Et al. 1984 той е на четвърто място от всички тумори на човешкия организъм след рака на белите дробове, гърдата и стомаха (38). От 100 000 починали 16 пациенти са с карцином на простатата, 5 с карцином на бъбрека, 5 с рак на пикочния мехур и 2 с тумор на тестиса. Въпреки всички новости в медицината ранната диагностика на туморните заболявания практически е много затруднена. В ранните стадии почти всички ракови заболявания протичат безсимптомно, поради което не се търси консултация с лекар.

Отдавна се правят опити да се определят обективни прогностични критерии и туморни маркери, чрез които своевременно да се диагностицират малигнената клетъчна трансформация и прогресивното развитие на заболяванията, колкото е възможно по-рано. В резултат на продължителни търсения редица автори като Lamerz, R. 1989 стигат до идеята за откриване и въвеждането на туморни маркери за тази цел (185). Обикновено тяхната поява в организма и промени в концентрацията са свързани с генезата и растежа на злокачествени тумори у човека. Те могат да бъдат разделени на два вида – клетъчни и хуморални:

- клетъчните туморни маркери са локализирани по повърхността на клетъчната мембрана

- хуморалните туморни маркери са вещества, които могат да бъдат открити в концентрации, превишаващи нормалните им нива в серума, урината и други телесни течности. Те се секретират и отделят от туморната тъкан, освобождават се при туморната дезинтеграция или се формират като реакция на организма към тумора.

Според Cooper, W.H.. 1993, Fornara, P. 1989 прогностичните критерии и туморни маркери трябва да отговарят на следните условия: висока специфичност и чувствителност, корелация между клиничния стадий, обема на туморната маса и прогнозата, надеждна прогностична стойност, възможност за стандартизиране и репродуциране (81, 116). В този смисъл те могат да намерят приложение в следните насоки:

1. Скринингово изследване при пациенти с или без симптоматични оплаквания от определени рискови групи.
2. Поставяне на първична насочваща диагноза.
3. Локализиране и прогнозиране прогресивното развитие на процеса – повишени или намалени стойности.
4. Определяне на корелацията с клиничния стадий на процеса.
5. Постоянен динамичен контрол на ефекта от лечението и прогресията на заболяването.

През втората половина на миналия век усилията на редица изследователи като Vihko, P. et al. 1981 са насочени неотклонно и последователно към откриването на достоверен прогностичен критерий за карцинома на простатата (341). Според Stamey, T.A. 1989 считаната за идеален диагностичен и прогностичен критерий простатна кисела фосфатаза (ПКФ) има своите недостатъци като получаването на фалшиво положителни и отрицателни резултати (311).

През 1979 г. Wang, M.C. et al. изолират за първи път простатния специфичен антиген (ПСА) от екстракт от човешка простата (344). Според Stamey, T.A. et al. 1987 след няколко годишно клинично изпитване ПСА изглежда като най-добрия критерий при диагностицирането на простатния карцином и ДПХ (312). Той е гликопротеин с молекулно тегло 34 килодалтона. ПСА се образува предимно в простатната тъкан и се увеличава при карцином на простатата и ДПХ. Ford, T.F. et al. 1985, Stein, B.S. et al. 1982 установяват, че той е органоспецифичен, но не е туморно специфичен критерий (115, 314). Според тях той е особено ценен за ранна диагностика на заболяванията на простатната жлеза.

Цветков, М. и сътр. 1996, Младенов, Д. и сътр. 1997 го използват най-често за ранна диагноза на простатния карцином и ДПХ, за динамичен контрол на прогресивното им развитие и ефекта от лечението (18, 8). Повишените стойности на ПСА насочват за наличие на туморен растеж до 6 месеца преди останалите рутинни диагностични методи. Той е особено ценен при пациенти с костни метастази и неизвестна локализация на туморния процес. ПСА притежава висока чувствителност. Той може да служи за скрийнингово изследване на рискови групи, каквито са мъжете над 50 години. ПСА има и висока прогностична стойност. Серумните му нива се повишават и при ДПХ. ПСА е по-чувствителен от ПКФ при карцином на простатата, но и по-често повишението му е по-изразено при доброкачествени заболявания на простатата. Нормалните му стойности са между 2,5-4 ng/ml. Обикновено много малка част от ПСА се открива в общата циркулация на организма. Днес са въведени нови висококачествени методи, които откриват малки ко-

личества от попаднал в серума ПСА. Установено е, че той е добър и надежден туморен маркер.

9. АНГИОГЕНЕЗА, ХЕМОСТАЗА И КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Още преди 130 години се установява връзката между злокачествените заболявания и нарушенията в кръвосъсирването. Хемостазната система е анатомично и функционално неразделна част от съдовата система. Ето защо коагулопатията и ангиогенезата, разглеждани досага като два различни процеса може в действителност да се окажат свързани както са кръвосъсирването и фибринолизата.

Терминът “ангиогенеза” е въведен от считания за баща на съвременната хирургия шотландски хирург Джон Хънтър. Наблюденията му нямат нищо общо с онкологията – още през далечната 1787 година той се е интересувал от процеса на заздравяване на костите и е наблюдавал растежа на нови кръвоносни съдове в рогата на елените. За първи път през 1939 г., в навечерието на Втората световна война, един друг хирург публикува снимка на туморната ангиогенеза, като не се знае дали той или сътрудниците му са се досетили, че има някакъв фактор, отделен от тумора, за да си набавя кръвоносни съдове. След това през 1971 г. д-р Джуда Фолкман първи предложил теорията, че растежът на тумора зависи от ангиогенезата. Теорията му се състояла в това, че туморите, които нямат собствена кръвоносна мрежа, се намират в „спящо“ състояние и едва след като отделят един специфичен фактор, те започват да растат и да се разпространяват. През следващите 2 десетилетия учените работят върху изолирания от Фолкман фактор. Едва през 1989 г. Наполеоне Ферара и учени от „Дженентек“ (компания, вече изцяло собственост на фармацевтичната фирма „Рош“) успяват да изолират този фактор. Въпреки многото идеи за блокиране на ангиогенезата единственият подход, който дава резултат в клиничната практика, е блокирането на самия фактор който се нарича съдов ендотелен растежен фактор.

Идеята за използване на хемостазните показатели като туморни маркери при рак на простатата играе съществена роля. Като водещи механизми и причини се приемат увеличеното производство на тъканен и тромбоцитарен фактори. Това води до освобождаване на големи количества про- тромботични и фибринолитични вещества в кръвния ток. Ето защо нарушенията в хемостазата са често срещано явление при пациенти с простатен карцином. Тук се включват дисеминираната вътресъдова коагулация,

венозната тромбоемболия или следоперативното кървене. Тези видове нарушения водят до повишена смъртност по време на операцията или в ранния следоперативен период.

Проучванията на Trousseau, A. 1865 г. показват, че пациентите със злокачествени заболявания са изложени на висок риск от развитие на ВТЕ и това е вече научно доказана и призната закономерност (324). За съжаление едва през последните години изследователите насочват своите усилия, за да направят количествено определяне на риска при тези пациенти.

В действителност е много трудно да се определи риска на *de novo* ВТЕ при пациенти с карцином, особено когато рисковия процент при пациенти без рак не е точно известен (той е приблизително 100/100000) (324). По данни на Medicare Levitan, N. et al. 1999 установява, че при тумори на панкреас, мозък, яйчници и др. е налице висок риск от поява на ВТЕ и той може да бъде 10 пъти по-голям в сравнение с пациентите без рак (*m.e.* приблизително 100/10 000) (198). Най-точни резултати за общата честота на ВТЕ са получени в големи проспективни проучвания на пациенти с рак на гърдата и симптоматичен ВТЕ. Rickles, F.R. et al. 1992 посочва, че той варира от 0,1% при нелекувани пациенти в I стадий на заболяването до 18% при пациенти в стадий III / IV и лекувани с химио- и хормонотерапия (282).

Клинично доказаните нарушения в кръвосъсирването много често са първия признак на злокачествено заболяване (270, 293). Честотата на недиагностицирания клинично карцином е 2,2 - 12% при пациенти със симптоматичен идиопатичен венозен тромбемболизъм. Извършването на скрийнигово изследване на пациенти за тромбемболизъм при съмнение за злокачествено заболяване би улеснило ранната диагноза и намалило средното време за поставяне на диагнозата от 11 до 1 месец. Според Monreal, M. 2007 независими рискови фактори за диагностициране на карцином са напредналата възраст при настъпване на венозната тромбоза и идиопатичния тромбемболизъм (223). Schulman, S. 2000 счита, че повишен риск за диагностициране на карцином след първия епизод на тромбоемболизъм е налице през следващите 2 години при проследяване на пациента (300).

Днес продължават да се провеждат големи, ретроспективни, рандомизирани, плацебо контролирани проучвания при пациенти с предстояща оперативна интервенция по повод на карциноми. Rickles, F.R. et al. 2001 установява, че риска от симптоматичен ВТЕ при пациенти на антикоагулантна профилактика е също по-висок при тези с карцином, отколкото при тези без злокачествено заболяване (приблизително 2,2 пъти увеличен риск) (283). Prandoni, P. et al. 2002 посочват, че честотата на повторната поява на ВТЕ е

проследена в голямо 11 годишно проучване и е доказано, че тя е значително увеличена при пациенти с рак в сравнение с тези без рак (съотношение на риска 3:2 при 95%) (273). Prandoni, P. et al. 1992 подчертават, че проследените пациенти имат значително по-висок риск (от четири до девет пъти) за карцином в рамките на 6 месеца до 1 година от появата на симптоматичния ВТЕ (272). Наблюденията показват, че рискът за развитие на карцином е особено висок при пациенти с втори епизод на ВТЕ, за който няма установено предразположение.

Редица изследвания показват, че патогенезата на ВТЕ при наличие на карцином е сложна. Това се отнася предимно за прокоагулационните свойства на туморните клетки от самия тумор, на ендотелните и възпалителните клетки. В допълнение настъпват отклонения и в нормалните защитни механизми на организма (напр. съдов застой, съдови дефекти, намаляване на циркулиращите инхибитори и клетъчно свързаните антикоагуланти и фибринолитични активатори). Според Rickles, F.R. et al. 2000 те предразполагат пациентите с карцином към свръх съсирваемост (281).

Промените в лабораторните показатели, които показват активиране на коагулацията при пациенти с карцином са резултат от растежа на тумора, неоангиогенезата и нарушената функция на засегнатия орган. Проучванията на редица автори показват, че до 50% от всички пациенти със злокачествени заболявания и до 90% от тези с метастатични лезии имат нарушения в хемостазните параметри. В достъпната литература тези аномалии често се определят като „рак коагулопатия” или „паранеопластичен синдром” (353). От друга страна прилагането на химиотерапевтични препарати също могат да доведат до нарушения в хемокоагулацията. Според Kvolik, S. 2010 всички пациенти със злокачествени тумори имат повишен риск от тромбоемболични събития и усложнения от кървене (181).

Днес се приема, че има два ключови участника в тези процеси:

1. Ензимът тромбин има основна роля в хемостазата на организма и е с широка субстратна специфика като поддържа различни клетъчни реакции, свързани с растежа на тумора и метастазите т.е. той е мощен митогенен фактор на клетъчните функции и оказва влияние върху поведението на раковите заболявания.

2. Тъканныят фактор (TF) е основен инициатор на външния път на коагулационната каскада. Неговото мощно присъствие като трансмембранен рецептор на различни клетки създава възможност за активиране на тромбина в много патологични ситуации.

Според съвременните проучвания на Rickles, F. R. тромбинът и тъканния фактор (TF) повлияват съществено туморната ангиогенеза. Те въздействат върху ангиогенезата чрез два механизма (279):

1. Пряко засягат сигнални пътища, които влияят върху клетъчните функции.

2. Подпомагат образуването на тромб, като по този начин осигуряват среда за растеж на туморни клетки.

Чрез съсирване-зависими и независими пътища, TF и тромбина са в състояние да предизвикат ангиогенезата, да генерират нови кръвоносни съдове от съществуващи такива, което е от съществено значение за растежа на тумора и метастазите.

Ето защо повечето изследователи считат, че антикоагулантите могат да бъдат ефикасни при лечението на карцином, поради способността им да намаляват характерното при злокачествени заболявания активирано кръвосъсирване и да променят биологията на рака. В тази връзка се търсят терапевтични подходи за регулиране на образуването на тромбин при рака, което може да постигне две цели: предотвратяване на тромбозата и предотвратяване на растежа на тумора и метастазите.

В настоящия обзор ние ще разгледаме по-важните промени в коагулационните параметри, свързани с туморния растеж и неговото лечение. Най-често това са хемостазните нарушения, свързани с АТ III, Д – димер и фибриноген.

10. ПРОКОАГУЛАЦИОННИ ФАКТОРИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ (ПАТОГЕНЕЗА НА ХИПЕРСЪСИРВАЕМОСТТА)

Множествените съдови лезии в структурата на тумора предизвикват каскадно активиране на плазмената коагулация чрез механизма на външния коагулационен път. Лезиите в малките съдове са местата на вътресъдова коагулация, запушване на кръвотока, образуване на екстравазати и кървене. В резултат на това кръвоснабдяването на тумора започва да става чрез аберентни съдове.

Различни комплексни механизми участват във взаимовръзката между туморните клетки и трансформирането на хемостазния баланс към свръхсъсирваемост и увеличена продукция на прокоагулантни фактори. Ендотелните клетки и моноцитите – макрофаги нормално не експресират тъканен фактор, докато не бъдат стимулирани. Стимулацията се осъществява от ендогенни агонисти (туморно свързани макрофаги и ендотелни клетки или възпалителни ендогенни агонисти – TNF - α , IL – 1,8) или екзогенни агонисти (напр. бактериален ендотоксин или туморно специфични антигени).

Голямата туморна маса, неоангиогенезата и наличните метастази корелират право пропорционално с образуването на прокоагулационните фактори.

Тъканният фактор (TF) активира външния път на коагулационната каскада. Той е прокоагулант, който се открива, както в нормалните ендотелни клетки, така и в изобилие в туморните клетки. Тъканният фактор образува комплекс с активирания фактор VIIa (TF / VIIa) и чрез протеолитично активиране на фактор IX и фактор X и други извънсъдови плазмени кръвосъсирващи протеини предизвикват образуването на тромбин.

Тромбинът (фактор II) е мощен протеолитичен ензим и прокоагулантен фактор и трансформира фибриногена до фибрин. Той от своя страна активира про-MMP-2, който разрушава базалната мембрана и води до пролиферация на ендотелните клетки в новия туморно-фибринов матрикс. Според Nakashima, J. et al. 1995 след това тромбинът предизвиква разпадане на фибриногена до фибринов мономер като образува извънклетъчна фибринова преграда (238). Фибриновият стабилизиращ фактор F XIII създава нови пептидни връзки и образува фибринов съсирек, който е механично по-здрав и устойчив на въздействието на фибринолитичните ензими. Според Dvorak, H.F. 2003 наличието на извънсъдови фибринови натрупвания силно повлиява туморните кръвоносни съдове, които стават силно пропускливи за фибриногена и от там за останалите плазмени протеини (93).

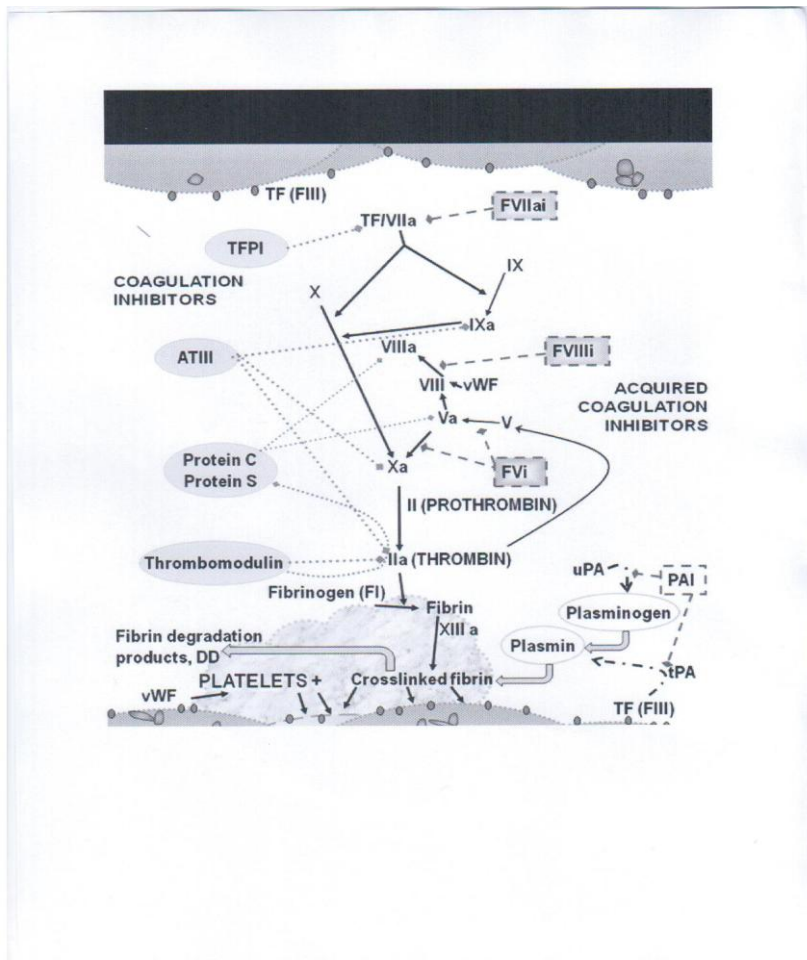
Според Dvorak, H.F. 2003, Verheul, H.M. et al. 2000 други съставни части от туморната тъкан също са показателни за промени в хемостазата: повишени количества богата на протеини плазмена интерстициална течност, структурни протеини, които не се откриват нормално в зрялата строма (фетални форми на фибронектин, тенасцин, абнормни протеоглигани) и различен брой възпалителни клетки (339, 93). Wojtukiewicz, M.Z. et al. 2003, Zanetta, L. et al. 2000 откриват зависима от тъканния фактор активация на извънсъдовата коагулация с активна ангиогенеза места при инвазивния рак на гърдата и карцинома на стомаха (352, 364). Verheul, H.M. et al. 2000, Kuenen, B.C. et al. 2002 обясняват повишените нива на циркулиращи разтворими тъканни фактори при пациенти със злокачествени заболявания с повишената тромбогенеза при тях (339, 175).

В своите проучвания Verheul, H.M. et al. 2000, Kim, H.K. et al. 2004, Nijziel, M.R. et al. 2003 установяват, че като резултат на повишената прокоагулационна активност серумните нива на плазмения разтворим фибринов мономерен комплекс, фибриногена и фибрин деградационните продукти (Д-димер) са значително по-високи при пациенти с карцином, отколкото при контролната група от здрави пациенти (339, 169, 246). Средното ниво на Д-димер, повлияно от локалното образуване на тромбин и фибрин, постепенно се увеличава

с напредване стадия на тумора. Според Huang, S.F. et al. 2002, Oya, M. et al. 1998 то е значително по-високо при пациенти с много големи тумори и при злокачествени образувания с дълбоко проникване в стената на органа (150, 260). Kvolik, S. 2005 обяснява по-високите стойности на Д-димер или канцероембрионалния антиген при колоректалния карцином с обхващането на лимфните възли, метастазите в тях или черния дроб и дисеминацията на процеса в перитонеума (180). Всички тези пациенти са с повишен риск от тромбоза, която се дължи както на повишението на фибриногена в плазмата, така и на повишеното образуване на тромбин.

Von Willebrand Factor (VWF) представлява голям гликопротеин, който се произвежда от ендотелните клетки и мегакариоцитите. Той участва в тромбоцитната агрегация и адхезията към субендотелиалния матрикс. Според Zanetta, L. et al. 2000 VWF антиген се открива в малките кръвоносни съдове на тъканите в близост до първичния тумор (364). Damin, D.C. et al. 2002 обяснява високите стойности на VWF фактора със свързаната с наличието на тумор ангиогенеза и дисеминираните по хематогенен път туморни клетъчни метастази (87). Повишената синтеза на VWF фактор е свързана с прогресивното развитие на тумора и се открива при различни видове карцином. Според Eppert, K. Et al. 2005, Mannucci, P.M. et al. 2003 при тях се установява и активиране на ендотелните клетки (102, 208). Стойностите на VWF фактор показват тенденция към увеличаване едновременно с прогресирането на туморния процес (102). Chiarugi, V. et al. 2000 установяват, че те могат да бъдат още по-високи при пациенти със злокачествени тумори, поради недостатъчна активност на VWF прилежащата протеаза (VWF-ср, ADAMTS-13) (68).

Според Saltz, L.B. et al. 2008 множеството съдови микроинфаркти и недостатъчния кръвоток могат да доведат до повишена апоптоза и некроза в тумора (294). Miesbach, W. Et al. 2006 установява, че по време на апоптозния процес анионните фосфолипиди като кардиолипин и фосфатидилсерин се преместват от вътрешната към външната повърхност на клетъчната мембрана (219). Тези промени водят до повишено производство на антифосфолипидни антитела. Heath, E.I. et al. 2006, Chojnowski, K. et al. 1999 препоръчват откриването на антифосфолипидни антитела да се използва за ранно диагностициране на пациенти със злокачествено заболяване и повишен риск от тромботични усложнения (137, 69, 181) (фиг. 1).



Фиг. 1. Коагулационната каскада при пациенти с карцином (Kvolik, S. 2010).

11. ИНХИБИТОРИ НА КОАГУЛАЦИЯТА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Намалената продукция на инхибитори на коагулацията или тяхната повишена консумация може да ускори прокоагулационната им активност при пациенти с карцином. Антитромбин III и вит. К зависимите коагулационни инхибитори, протеин С и S, регулират повишената прокоагулационна активност.

Антитромбин III е най-важният естествен тромбинов инхибитор. Той дезактивира тромбина чрез необратима реакция, което води до образуването на тромбин-антитромбинови комплекси. По данни на Appel, I.M. et al. 2008, Nijziel, M.R. et al. 2000 повишаване на техните нива са наблюдавани при пациенти с остра левкоза (31, 247). Според Zangari, M. et al. 2002 намаляване концентрацията на антитромбин III без

увеличаване на тромбин-антитромбиновите (ТАТ) се установява при пациенти с дисеминирани злокачествени заболявания (365).

Според Zanetta, L. et al. 2000 протеин С е инхибитор на коагулационната верига, наблюдавана върху повърхността на туморните клетки и малките съдове на тумора (364).

Активираната форма на протеин С неутрализира активираните фактори V и VIII. Damin, D.C. et al. 2002, Ozturk, M. et al. 2003 установяват, че нивото на протеин С е значително повишено при карциноми, но предизвиканото активиране на коагулацията при тумори води до хиперкоагулитет, особено при пациенти с дисеминиран злокачествен процес (87, 261).

От друга страна туморно предизвикания хиперкоагулитет може да бъде повлиян от тъканно базираната резистентност на активираната форма на протеин С и нарушения в хемостатичния баланс при различни злокачествени заболявания. Той може да бъде определен количествено чрез тест за резистентността на активираната форма на протеин С, измервайки ефекта му върху тромбиновото производство. Необходимата активирана протеин С резистентност е налице при почти една четвърт на новодиагностицираните пациенти с миеломна болест (261). Oya, M. et al. 1998, Zangari, M. et al. 2002 наблюдават значителна резистентност на активирания протеин С, която е открита при карцином на гърдата в сравнение със здрави пациентки и корелира с нивото на Д-димер (260, 365).

Другият коагулационен инхибитор S се открива в съдовете на тумора и е значително увеличен при пациенти с метастази в сравнение със здрави пациенти и такива без метастази (260).

Фибринолитична система

Компонентите на фибринолитичната система се активират по време на туморния растеж, ангиогенезата и активирането на верижната коагулация. Този процес води до разтваряне на излишъка от фибринови съсиреци и предотвратяване на тромбозата в увредените кръвоносни съдове на туморната тъкан. Ендотелните клетки на тумора участват във фибринолизата чрез синтезиране, съхраняване и свързване на фибринолитичните протеини. По данни на Nijziel, M.R. et al. 2003, Gonzalez-Gronow, M. et al. 2002 средната обща фибринолитична активност, определена чрез количеството на произведения Д-димер е често повишена в плазмените проби при пациенти с карцином (246, 124).

Фибринолитичния процес зависи в голяма степен от плазмин протеолитичната активност. Harvey, S.R. et al. 2003, Kim, H.K. et al. 2004, Oya, M. et al. 1998, Baker, E.A. et al. 2007 откриват плазмина в плазмата в неактивна форма (плазминоген), който се активира от отделения от тъканите плазминогенов активатор (tPA), проурокиназа или урокиназен

плазминогенов активатор (uPA) (134, 169, 260, 34). Плазминът разтваря фибрина, фактор V и фактор VII. Два вида плазминоген играят различни роли при верижната коагулация при туморите. Плазминоген 1 намалява функцията на тъканния фактор в 1-LN човешките клетки на простатния карцином. Плазминоген 2 участва в регулиране производството на матрикса на металопроотеиназа - 9 от тези клетки (34).

Активността на плазминогеновите активатори се контролира на две нива:

- от наличието на специфични рецептори и

- от група специфични инхибитори на плазминогеновите активатори (PAI-1), които предотвратяват активирането на плазминогена.

Harvey, S.R. et al. 2003, Oya, M. et al. 1998 установяват, че компонентите на плазминоген активиращата система са с по-високи стойности при пациенти с карциноми поради локалната туморна продукция (134, 260). Урокиназния плазминогенов активатор (uPA) и урокиназния плазминогенов активаторен рецептор (uPAR) са също значително по-високи при тумори, отколкото в нормална тъкан. Според Kim, H.K. et al. 2004 това корелира със стадирането на тумора и стойностите на TNF (169). Редица проучвания на Harvey, S.R. et al. 2003, Kakkar, A.K. et al. 2004 показват, че пациентите с карцином имат свръхпродукция на uPA и uPAR и показват тенденция към ниска преживяемост (134, 162). Baker, E.A. et al. 2007 установяват значително по-високи стойности на uPA, uPAR и PAI-1 при сквамозни клетки от карцином, отколкото в нормалната тъкан (34). Kakkar, A.K. et al. 2004 откриват, че тъканната концентрация на компонентите на плазминоген активаторната система корелират с клиничните и патологични симптоми на туморната агресия, диференциация и степен на злокачественост (162).

12. ТЪКАНЕН ФАКТОР И АНГИОГЕНЕЗА

Както е широко известно тромбинът се генерира при наличието на тъканен фактор (TF). Той предизвиква образуване на тромб, активира тромбоцитите и посредници за ускоряване на отделните етапи от кръвосъсирването. Това в крайна сметка води до отлагане на фибрин.

Предполага се, че нетипичното повишение на TF може да допринесе за системната хиперкоагулация, присъща за много пациенти с карцином.

Механизъм на нетипично повишение на TF в туморите

Нетипично повишения TF е резултат от взаимодействието между злокачествените и нормалните клетки - домакини в отговор на възпалителни или ремоделирани сигнали (*напр.* свързани с тумора ендотелни клетки, моноцити, макрофаги и фибробласти). Ето

защо не е изненадващо, че цитокини и растежни фактори, генерирани от възпалителни и злокачествени клетки предизвикват повишен TF, което променя поведението на клетките (268). Раковите клетки, с променена под влияние на тъканния фактор ДНК, проявяват злокачествен фенотип както *in vitro* така и *in vivo* в сравнение с клетките в други човешки тумори (рак на гърдата, недребноклетъчен рак на белия дроб, левкемия, рак на дебелото черво и рак на панкреаса (231, 163, 164, 127, 128, 112,204). По принцип те не се намират в съответните нормални тъкани (328, 80).

Повишеният TF в туморите е свързан с неблагоприятни прогностични показатели като повишена ангиогенеза, напреднал стадий на заболяването, както и множество лекарствено устойчиви фенотипове. Всичко това допринася за по-малката преживяемост на пациентите с туморни заболявания (297).

Тъканния фактор и VEGF играят решаваща роля във физиологията и патофизиологията на ангиогенезата. Туморът освобождава субстанции под формата на растежни фактори, които действат като ключов сигнал за кръвоснабдяването му. От своя страна те подават сигнал за растеж на кръвоносните съдове и затова се наричат съдови ендотелни растежни фактори (VEGF – vascular endothelial growth factors) (93, 339, 175). Кръвоносните съдове имат специални рецептори по своята повърхност за получаване на сигнал от VEGF. Когато те получат сигнал кръвоносният съд образува разклонения и създава нови кръвоносни съдове в посока към тумора. Процесът се нарича туморна ангиогенеза и обезпечава нарастването на тумора и процесът на метастазирание. Например съдовия ендотелен растежен фактор А (VEGF-A) е мултифункционален цитокин, който се открива в големи количества в туморните клетки (93). Той действа чрез рецепторите (VEGFR-1, VGFR-2 и неврилин), които се намират извънсъдово, базалната повърхност на съдовия ендотелиум и някои други клетки. VEGF-A регулира действието на ендотелно клетъчните протеази, които разграждат базалните съдови мембрани. Това предизвиква разрастване и изтъняване на ендотелните клетки, които покриват големи съдови повърхности и действат като мощен проангиогенезен фактор (93). В резултат на това плътността на съдовата мрежа е много по-висока в тумора отколкото в здравата тъкан. Този процес играе възлова роля в патофизиологията на някои тумори и е индиректен прокоагулант, който променя хемостатичните качества на ендотелните клетки (339). VEGF-A повишава микросъдовата пропускливост, репрограмира генната експресия и удължава преживяемостта на ендотелните клетки (93).

По данни на редица автори при пациенти с напреднал колоректален карцином се установява повишение на тъканния фактор, което корелира пряко с повишените съдова

плътност и съдови ендотелни растежни фактори (VEGF) (231). Подобна взаимна връзка е установена при недребноклетъчен рак на белия дроб и рака на гърдата.

Добре установено е, че дефицитът на тъканен фактор и VEGF предизвикват ембрионален леталитет, поради нарушена съдова цялост и отклонения в развитието на жълтъчната торбичка (172, 130, 237). Промененият ангиогенен фенотип води до промяна в баланса между ендогенни проангиогенни и антиангиогенни фактори, които регулират растежа и развитието на кръвоносните съдове. Повишеният тъканен фактор в тумора допринася за повишаване на проангиогенния VEGF белтък и за регулиране на антиангиогенния тромбоспондин протеин. Пациентите с колоректален карцином и повишен тъканен фактор имат по-висока плътност на микросъдовете и VEGF (304, 303).

Тъканен фактор и VEGF са открити в туморните клетки на човешки бял дроб и рак на гърдата. Редица задълбочени проучвания при рак на гърдата и меланом показват значително изразена корелация между ниво на синтеза на VEGF и TF *in vitro*. Тези проучвания подкрепят хипотезата, че TF регулира VEGF синтеза и допринася за туморната ангиогенеза (231, 167, 327).

Според нас тъканния фактор и VEGF участват в един порочен кръг, включващ образуване на тромб и растеж на тумора. Установено е, че не само тъканния фактор води до увеличаване на VEGF, но обратното също е в сила - VEGF регулира увеличаването на тъканния фактор върху ендотелните клетки чрез активиране на растежа.

Blum, S. et. al. 2001 проучват механизма за активиране на тъканния фактор в ендотелните клетки от човешка пълна вена при здрави хора и такива с патологични отклонения (46). При здрави пациенти те установяват, че растежните фактори, непрекъснато активират фосфатидил phosphatidyl 3-киназата (PI3-K), което води до подтискане на производството на тъканен фактор при нормалните ендотелни клетки. При туморни заболявания влиянието на PI3-K намалява, поради лошата перфузия и ограничен достъп до плазмените компоненти. Намаленото влияние на PI3-K и увеличеното влияние на p38 и Erk-1/2 митоген-активирана протеин киназа (MAPK) предизвикват положително повлияване на тъканния фактор от VEGF в структурата на тумора. Kim, I. et al. 2002 съобщават, че ангиопоетин-1, който е активатор на вътреклетъчната PI3-K, инхибира влиянието на VEGF върху тъканния фактор в ендотелните клетки (170).

Зависими и независими от съсирването пътища на индуцираната от тъканния фактор ангиогенеза

Ние приемаме, че тъканния фактор влияе върху туморната ангиогенеза чрез зависими и независими от съсирването механизми.

Зависимите от съсирването пътища най-вероятно въздействат чрез активиране на рецепторите на тъканните фактори чрез свързващ лиганд, производство на тромбин и образуване на съсирек (323, 59, 23). Съсирване по независими пътища се наблюдава при фосфорилиране на цитоплазмената област на рецепторите на тъканния фактор и последващите надолу по веригата процеси - производство на тромбин или образуването на съсирек. И двата механизма могат пряко и / или косвено да повлияят върху ангиогенезата и прогресията на тумора (303).

Пряката връзка между TF и VEGF предлага още една възможност за влиянието на TF върху туморната ангиогенеза, тъй като VEGF е едни от най-мощните регулатори на ангиогенезата.

Определени механизми могат да контролират индуцираното от тъканен фактор регулиране на VEGF по време на физиологичната и патологична ангиогенезата. Ollivier, V. et al. 1998, 2000, Ferrara, N. Et al. 1996 съобщават, че индуцираното от тъканния фактор производство на VEGF води до активиран фактор VII, последващо активиране на фактор X и образуване на тромбин (257, 256, 62, 113, 284). Въпреки това в някои (но не всички) клетъчни линии от малигнен меланом, медираната от TF регулация на VEGF се регулира независимо от съсирването на кръвта (61). Това става чрез активиране на цитоплазмената опашка на TF, а не чрез лиганд-свързващата екстрацелуларна област. Сериновите остатъци върху цитоплазмената опашка на рецептора на TF могат да се фосфорилират с помощта на протеин киназа C (PKC)-медиран механизми (327).

Цитоплазмената опашката на TF най-вероятно регулира независими от съсирването механизми, включително клетъчното реструктуриране, съдовото ремоделиране, ангиогенезата и клетъчните метастази. Bromberg, M.E. et al. 1995 показват в модел *in vivo*, че цитоплазмената опашка на TF е от съществено значение за метастазите на тумора (55, 56, 368). В своите проучвания Mueller, B. M. et al. 1998 изследват трансфектирани клетки на китайски хамстери (232, 307). Те стигат до заключението, че екстрацелуларната протеолитична дейност на рецепторите на TF има значение и за зависимите от тъканния фактор метастази.

13. ТРОМБИН И АНГИОГЕНЕЗА - СЪСИРВАНЕТО КАТО НЕЗАВИСИМ МЕХАНИЗЪМ

Тромбинът посредничи в редица допълнителни клетъчни отговори, включително и ангиогенезата. Той има връзка с протеазо-активирани рецептори (Pars), които са свързани с различни стъпки за сигнализация. Освен в хемостазата той участва и в повишената

съсирваемост (hypercoagulability) при пациенти с карцином. Fernandez, P. E. 2003 установил, че тромбинът има централна патобиологична роля за растежа на тумора и неговите метастазите (110).

Тромбинът е най-известен със своето пряко участие и роля при образуване на тромби чрез тромбоцитната активация и отлагането на фибрин. Той също така регулира и клетъчното поведение, независимо от кръвосъсирването, чрез активиране на G-чифтните парс протеини и отключване на каскадната мрежа за сигнализация.

Според Maragoudakis, M.E. et al. 2002, Tsopanoglou, N.E. et al. 1993, Haralabopoulos, G.C. et al. 1997 голяма част от влиянието на тромбина при пациенти с карцином се осъществява чрез активиране на ангиогенезата *in vivo*, независимо от неговия кръвосъсирващ ефект, активиране създаването на микросъдове и морфологична диференциация на ендотелни клетки в пъпната вена *in vitro* (210, 326, 133).

Вече е установено, че в най-физиологични условия, ендотелните клетки се намират в латентно състояние. В отговор на съдово нараняване, тромбинът активира пролиферацията и миграцията на ендотелните клетки за възстановяване на раната. В резултат на това тези действия водят до клетъчна пролиферация и създаване на нови кръвоносни съдове в развиващия се тумор. Раковите клетки секретират проангиогенен proangiogenic VEGF фактор за привличане на нови съдове. Последното води до активиране на ангиогенезата.

Тромбинът стимулира освобождаването на VEGF (както и други фактори на растежа) от алфа гранулите на тромбоцитите. Mohle, R. et al. 1997, Maloney, J.P. et al. 1998 подчертават, че той регулира и косвено транскрипцията на VEGF чрез предизвикване производството на реактивни на кислород видове, както и на индуцирания от хипоксия фактор-1 алфа комплекс (222, 207). Последният се свързва с гена на VEGF и предизвиква неговото транскрибиране. Според Richard, D.E. et al. 2001, Huang, Y.Q. et al. 2001, Yamahata, H. et al. 2002 тромбинът регулира освобождаването на VEGF чрез активиране на пар протеините и ангиопетин 2 (проангиогенен proangiogenic фактор, който противодейства на стабилизиращия ефект на angiopoietin -1 върху кръвоносните съдове) (278, 152, 357). Тромбинът стимулира обратимото закръгляване на ендотелните клетки и повишава съдовия пермеабилитет. Huang, Y.Q. et al. 2002, Tsopanoglou, N.E. et al. 1999, Bogatcheva, N.V. et al. 2002, Coughlin, S.R. 2000 считат, че това се предизвиква от наличието на плазмени протеини и развитието на временна проангиогенна proangiogenic матрица (153, 325, 47, 84).

Ангиогенезата включва активиране на ендотелните клетки, инвазия им през базалната мембрана и миграцията им към дисталните краища. Проучванията *in vitro* на

Naralaboroulos, G.C. et al. 1997, Maragoudakis, M.E. et al. 2001 показват, че тромбинът участва през всички етапи на процеса (133, 209). Той намалява адхезията на ендотелните клетки към протеините в базалната мембрана чрез цикличния аденозин монофосфат, което ги прави по-подвижни. Тромбинът мобилизира адхезионните молекули (*напр.* P-селектин) спрямо ендотелната повърхност, което улеснява адхезията на тромбоцитите и туморните клетки. Имобиализиращите функции на тромбина (като хемоатрактант *chemoattractant*) спрямо ендотелните клетки предизвикват тяхната индуцирана миграция и инвазия към по-високи концентрации на сериновата протеаза. Последната се открива в мястото на нараняването или в патологичната тъкан на тумора. Ендотелните клетки се прикрепят към тромбина чрез ангиогенен $\alpha\beta 3$ интегрин, който се регулира от тромбина. Това прикрепване осигурява на ендотелните клетки преживяемост по време на тяхната миграция. Тромбинът улеснява преминаването през базалната мембрана чрез активиране на колаген тип IV разграждащ ензим, *gelatinase A*, известен като матрица металопротеиназа MMP -2. Интересното е, че според Naralaboroulos, G.C. et al. 1997, Maragoudakis, M.E. et al. 2001, Brooks, P.C, et al. 1996 $\alpha\beta 3$ и MMP-2 могат да съжителстват функционално на повърхността на ангиогенните капиляри (133, 209, 57).

Тромбинът драстично увеличава растежа и метастатичния потенциал на туморните клетки, въпреки че тези ефекти могат да се приписват отчасти към неговите проангиогенни *proangiogenic* свойства. Според Tsopanoglou, N.E. et al. 1999, Even-Ram, S, et al.1998, Wojtukiewicz, MZ, et al.1992, Wojtukiewicz, MZ, et al.1993, Hughes, P.E, et al. 1998, Hattori, R, et al. 1989, Stenberg, P.E, et al.1985, Henn, V, et al. 1998 чрез мобилизиране на адхезионните молекули, като $\alpha\beta 3$ интегрин, P-селектин и CD 40 лиганд към клетъчната повърхност, тромбинът подобрява адхезията между туморните клетки, тромбоцитите, ендотелни клетки и извънклетъчния матрикс като допринася за туморната прогресия (325, 104, 355, 354, 154, 135, 316, 139). Daniel, T.O. et al. 1986, Papadimitriou, E. et al. 1997 установяват, че тромбинът води до освобождаване на растежни фактори, химокини и на извънклетъчни протеини, които засилват пролиферацията и миграцията на туморните клетки (88, 264). Възможностите на тромбина да стимулира метастазите са доказани с експериментални модели за белодробни метастази *in vivo*. Според Wojtukiewicz, M.Z. et al. 1993, Nierodzik, M.L. et al. 1991, Nierodzik, M.L. et al. 1992 те показват значително увеличаване на белодробните метастази при пациенти, лекувани с тромбин в сравнение с нелекуваните с този препарат. PAR-1 като основен рецептор на тромбин се приема като причина за този резултат (354, 245, 244). По-голямата част от клетъчните реакции, предизвикани от тромбин, се осъществяват чрез активиране и последваща каскадна трансдукция на членовете на PAR групата. Nierodzik, M.L. et al.

1998 предполага, че протеолитичната активност на тромбина е от съществено значение за осъществяването на тези ефекти (243).

Тромбин PAR рецептори

Повишаването на PAR-1 като основен рецептор на тромбина е свързано с наличието на злокачествен фенотип. Even-Ram, S. et al. 1998 изследват клетъчни линии от рак на гърдата. Те установяват пряка корелация между повишените PAR-1 рецептори и инвазивния потенциал на тумора (104). Резултатите показват, че нормалните или премалигнени образци от гърдата нямат повишени PAR-1, докато инфилтриращите дуктални карциноми на гърдата показват много високи нива.

Тромбин и трипсин са често срещани протеази, секретирани от злокачествените клетки като се смята, че те допринасят за метастазирването на рака и неговото прогресиране. Наличието на PAR-1 и PAR-2 рецептори е установено в туморните клетки, ендотелните клетки, съдовите гладко-мускулните клетки, гладко-мускулни актин-положителни стромни фибробласти, мастоцити и макрофаги в рамките на метастатичната туморна тъкан. Според D'Andrea, MR, et al. 2001 тези рецептори не се откриват в нормални (доброкачествени) епителни клетки или нормални стромни фибробласти (85). Тези резултати показват, че туморната микросреда може да бъде възприемчива към PAR медирана генна индукция. Това предлага потенциални механизми за развитие на метастазите, стимулирани от тромбин.

14. ФИБРИН И АНГИОГЕНЕЗА - ЗАВИСИМИ ОТ КРЪВОСЪСИРВАНЕТО МЕХАНИЗМИ

Тромбинът е ефективен активатор на ангиогенезата чрез двата независими и зависими от кръвосъсирването механизми.

Независимият от кръвосъсирването механизъм зависи от PAR активирането и последващата след това сигнална трансдукционна каскада.

От друга страна зависимият от кръвосъсирването механизъм включва тромбоцитната активация и отлагането на фибрин. Туморните съдове са наследствено пропускливи вследствие на хиперпермеабилитета на VEGF (съдов фактор, който регулира пропускливостта).

Плазменият протеинов фибриноген може да преминава в извънсъдовите тъкани въпреки голямото си молекулно тегло. След това той се свързва със специфични рецептори върху

възпалителните и туморните клетки и се разцепва от тромбина, генериран в микросредата на тумора. Този фибрин може да се открие в съдовия ендотел на новосъздадените съдове в тумора. Според Contrino, J. et al. 1996, Nagy, J.A. et al. 1989 той се свързва и с възпалителните и туморните клетки или се отлага около туморните клетки и служи като основа за по-нататъшната ангиогенезата (80, 236).

Първото разцепване на фибриногена от тромбина води до образуване на фибринопептид А. Неговите плазмени нива варират право пропорционално в зависимост от туморния растеж и обратното развитие на карцинома. Това е в съответствие с направените досега съобщения от Myers, T.J. et al. 1981, Edwards, R.L. et al. 1981, Edwards, R.L. et al. 1979, Rickles, F.R. et al. 2001, Edwards, R.L. et al. 1990, Yoda, Y, et al. 1981 за повишен фибриноген в плазмата, при тези пациенти (234, 99, 100, 280, 98, 359). Според Dvorak, H,F, et al. 1983, Contrino, J. et al. 1996, Shoji, M. 1998, Nagy, J.A. et al. 1989, Bardos, H, et al. 1996 отлагането на кръстосано свързан фибрин (XLF) е характерно за различни видове човешки злокачествени тумори, включително на гърдата, на белия дроб, на мозъка и простатата (96, 80, 308, 236, 36). В хистологични проби от пациенти с рак на гърдата или доброкачествени тумори на гърдата, Contrino, J. et al. 1996, Wojtukiewicz, M,Z, et al. 1991 установяват XLF в ендотела на новите съдове при агресивни форми на карцином, но не и в съдовете на доброкачествени тумори (80, 356).

14.1. Фибриноген и фибрин деградационни продукти (ФДП)

Някои биологично активни плазмин и / или тромбин разпадни продукти от фибриногена и / или XLF стимулират или подтискат ангиогенезата, което допринася за бързото зарастване на раните или прогресирането на туморите. Според Bootle-Wilbraham, C.A. et al. 2000, Thompson, W.D. et al. 1992 фибриногена или фрагменти от фибрин Е може в някои случаи да стимулират ангиогенезата *in vitro* и *in vivo* (48, 322). В други случаи те могат количествено да инхибират ангиогенезата, подобно на ендостатина - ендогенен пептид, изследван в редица клинични проучвания за рака (48).

Оуа, М. et al. 1998, Taguchi, О. et al. 1997, Blackwell, К. et al. 2000 споделят, че повишени плазмени нива на D-димер могат да бъдат от прогностично значение при пациенти с напреднал стадий на колоректален и белодробен карцином или рак на гърдата (260, 318, 44). Едно от последните проучвания на Dirix, L.Y. et al. 2002 в тази насока показва значимата корелация между повишени плазмени нива на D-димер и фибриноген, броят на метастазите, размера на тумора, неговата прогресия и преживяемостта на пациентите с рак на гърдата (91). Серумните нива на VEGF, серумния интерлевкин-6 и количеството на

VEGF в тромбоцитите също показват положителна корелация с плазмените нива на D-димер в това проучване (91).

14.2. Фибрин (оген) и адхезионни молекули

Разцепването и разпадането на фибриногена и фибрина разкриват скритите места в молекулите, което улеснява адхезията към повърхностните клетъчни рецептори. Medved, L. et al. 2001, Degen, J.L. et al. 2001 подчертават, че взаимодействията чрез фибринови мостове между клетка-матрикс, които са от съществено значение за физиологичните и патологичните процеси като възпаление, хемостаза, зарастване на раните и туморната ангиогенеза се осъществяват чрез многофункционални части в рамките на фибрин (оген) (216, 89). Така например, свързването на ендотелните клетки с фибрин чрез адхезионната молекула на съдовия ендотелен кадхерин (cadherin) може да е необходимо за образуването на капиляри, което е основна стъпка в ангиогенезата. Според Martinez, J. et al. 2001, van Hinsbergh, V.W. et al. 2001 фибриновият матрикс, който се образува около туморите осигурява временна проангиогенезна основа, която поддържа образуването на кръвоносни съдове и стимулира клетъчната ендотелна пролиферация и миграция (211, 335).

По повърхността на ендотелните клетки се установяват различни адхезионни молекули. По време на зарастването на раните, фибриновия матрикс предизвиква ангиогенен отговор чрез регулиране експресията на $\alpha\beta_3$ рецепторите. Според Clark, R.A. et al. 1996 това улеснява ендотелната инвазия и формирането на капилярните съдове (72). Dallabrida, S.M. et al. 2000 споделя, че $\alpha\beta_3$ интегрините предоставят сигнали за оцеляване на ендотелните клетки по време на тяхното взаимодействие с фибрин (86). Проучванията *in vitro* на Feng, X. et al. 1999 показват, че $\alpha\beta_3$ в човешки РНК кожни микросъдови клетки е по-стабилен във фибринови отколкото в колагенови гелове (107). При заместване на фибрина в съсирека на раната от богата на колаген зряла грануляционна тъкан откриването на интегрин върху ендотелните клетки се променя, което сигнализира края на тъканното възстановяване. Според Myers, T.J. et al. 1981, Dvorak, H.F. et al. 1987, Dvorak, H.F. 1986 туморите се характеризират като "рани, които не зарастват", защото непрекъснатото отлагане на фибрин около тумора, предизвикано от VEGF-индуцирано съдова пропускливост създава постоянна проангиогенезна (proangiogenic) среда (234, 94, 95).

14.3. Фибринов матрикс и растежни фактори

Фибриновия матрикс функционира като мултифункционална основа (насърчава взаимодействието между матрикс – клетка, което е от съществено значение за неоваскуларизацията) и като "депо" за проангиогенезни (proangiogenic) растежни фактори,

(bFGF - основен фактор за растежа на фибробластите), VEGF и инсулино-подобен растежен фактор-1). Според Sahni, A. et al. 2000 извлечените растежни фактори в рамките на фибриновия матрикс са защитени от протеолитично разграждане (290). Разграждането на матрикса от протеолитични ензими, генерирани по време на инвазията от ендотелни и туморни клетки, освобождава растежни фактори. По данни на Sahni, A. et al. 1999, Sahni, A. et al. 2000 те се свързват със сродните рецептори от нахлуващите клетки и водят до клетъчна пролиферация и миграция на туморната ангиогенеза (291, 292). Lalla, R.V. et al. 2001, Contrino, J. et al. 1997 установяват, че фибринът стимулира синтеза и секрецията на проангиогенезни фактори (интерлевкин-8) от туморните клетки и насърчава "автокринната" прокоагулационна тенденция чрез предизвикване на TF експресия в ендотелните клетки (184, 79).

14.4. Мишки с фибриногенов дефицит

Фибрин (огенът) играе ключова роля в туморната ангиогенеза и прогресия. Проучвания при мишки с фибриногенов дефицит установяват неговата възможна, но не и задължително необходима роля. Palumbo, J.S. et al. 2000 проучват сравнително туморния растеж при експериментални мишки с фибриногенов дефицит и контролна група (263). Според Palumbo, J.S. et al. 2001 въпреки, че липсата на фибриноген не повлиява растежа и ангиогенезата на първичния тумор той значително намалява белодробните метастази, което може би се дължи на намалено сцепление и стабилност на метастатичните клетки (262). Тромбиновият инхибитор хирудин допълнително намалява метастатичните възможности при мишки с фибриногенов дефицит. Предполага се, че възможностите на тромбина да активира кръвосъсирването (например активиране PAR) може да повлияе значително метастатичния процес.

15. ТЪКАНЕН ФАКТОР И ТРОМБИН – ТЕРАПЕВТИЧНО ПОВЕДЕНИЕ ПРИ КАРЦИНОМ

Селективното въздействие на TF върху съдовите ендотелни и туморни клетки при злокачествени тумори представлява идеална възможност при лечението на туморните заболявания. В своите проучвания ин vivo Nilsson, F. et al. 2001, Hu, Z. et al. 1999, Hu, Z. et al. 2001, Huang, X. et al. 1997, Zhang, Y. et al. 1996 установяват, че повлияването на TF може да бъде ефективно при лечението на туморните заболявания (245, 148, 149, 151, 369). Hu, Z. et al. 2001 създават имуносвързана молекула, която се състои от мутирал

фактор VII при мишки и Fc ефекторен домейн на IgG₁ Ig (149). Тя е била инжектирана в човешки простатен карцином и човешки туморен меланомен ксенотрансплантат, отглеждани в мишки с тежка комбинирана имунна недостатъчност. Поставената избирателно молекула до произвеждащи TF туморни клетки предизвиква цитолитичен имунен отговор срещу Fc домейна, което води до значително намаляване на тумора. Nilsson, F. et al. 2001 използват антияло-медирано насочване на TF към онкофетален екстрадомейн В фибронектин, произведен от кръвоносните съдове в злокачествени тъкани, за да предизвикат селективна тромбоза в туморния процес (248). Този подход води до значително намаляване размерите на тумора, въпреки че остатъчната тъкан нараства отново при някои от експерименталните мишки. Това лечение е с ниска токсичност и затова приложението на по-високи дози може да подобри ефективността му. Досега TF – насоченото лечение е провеждано само при животни. Днес проучванията във фаза I продължават. Те представляват нов подход и стратегия като метода притежава значителни възможности за лечение на пациентите с карцином.

Тромбин насочената антикоагулантна тактика е предназначена да повлияе растежа и протромботичните свойства на тумора. От друга страна метастатичните му възможности са оценявани в редица предклинични и клинични проучвания в продължение на много години. Към днешна дата обаче, нито един от авторите като Zacharski, L.R. et al. 1996, Zacharski, L.R. et al. 1998, Smorenburg, S.M. et al. 1999, Zacharski, L.R. et al. 2000 не е представил убедителни доказателства, че този подход може предсказуемо да подобри преживяемостта при рак (363, 361, 310, 362). Последните ретроспективни анализи отново стимулират интереса за антитромботично лечение на туморните процеси.

Направени са сравнителни проучвания в преживяемостта на пациенти с карцином и лекувани краткосрочно с нискомолекулярен (LMWH) и нефракциониран хепарин по повод на проксимална дълбока венозна тромбоза. Според Hull, R.D. et al. 1992, Green, D. et al. 1992 общата смъртност на хоспитализираните пациенти от първата група е 4,7 % , а от втората група е 9,6% (p = 0,05) (155, 126). Prandoni, P. et al. 1992 отчитат при пациенти с карцином и лекувани с LMWH обща смъртност 7%, а тези лекувани с UFH - 12%, което не е статистически значимо (271). Lensing, A.W. et al. 1995 съобщават общ процент смъртност от 3,9% за пациентите (197).

16. ТРОМБОТИЧНИ УСЛОЖНЕНИЯ ПРИ АНТИАНГИОГЕННИТЕ АГЕНТИ

Според съвременните схващания ангиогенезата на тумора е причина за неговото развитие, прогресиране и метастазиране. Ето защо разработването на антиангиогенни агенти срещу

туморната васкуларизация се превърна в нова стратегия за лечение на много видове рак. Те предизвикват малко токсични странични ефекти за разлика от познатите химиотерапевтични препарати. Напоследък обаче в редица клинични проучвания на Zangari, M. et al. 2002, Zangari, M. et al. 2001, Osman, K. et al. 2001, Marx, G.M. et al. 2002, Kuenen, B.C. et al. 2002 се съобщава за неочаквано висока честота на артериална и венозна тромбоза при пациенти, лекувани с антиангиогенни агенти и стандартна химиотерапия (367, 366, 258, 213, 176). Според Zangari, M. et al. 2002, Zangari, M. et al. 2001 Marx, G.M. et al. 2002, Kuenen, B.C. et al. 2002, Cavo, M. et al. 2002, Kaushal, V. et al. 2002, Escudier, B. et al 2002, Urbauer, E. et al. 2002 това сериозно усложнение се наблюдава при няколко обещаващи антиангиогенни агенти, включително и SU5416, който е мощен инхибитор на рецепторите VEGF 2 и талидомид (367, 366, 213, 176, 65, 168, 103, 333).

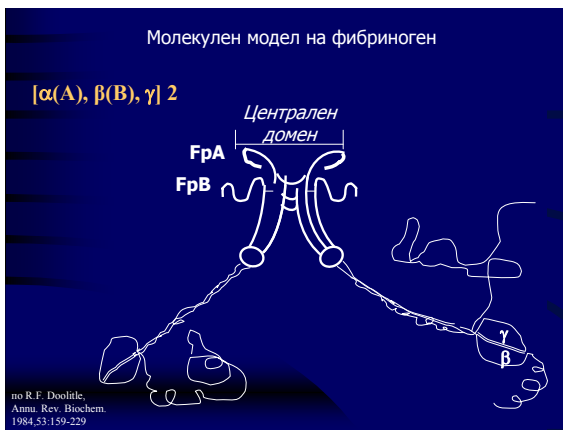
Последните експериментални проучвания на Varki, N.M. et al. 2002, Collen, A. et al. 2000, Mousa, S.A. 2002, Norrby, K. et al. 1996, Fernandez, P.M. et al. 2003 за ефективно лечение на карциноми коментират добавянето на антикоагуланти към класическата им терапия (337, 76, 230, 249, 111). Авторите предлагат използването на антикоагуланти за намаляване растежа на тумора, ангиогенезата и метастазите. Тези проучвания подкрепят идеята за комбинираното приложение на стандартни химиотерапевтици с антикоагуланти, което представлява идеална възможност за контрол растежа на тумора и максимално намаляване риска от сериозни тромботични усложнения.

17. ХАРАКТЕРИСТИКА НА Д-ДИМЕР КАТО ПРОГНОСТИЧЕН КРИТЕРИИ И ТУМОРЕН МАРКЕР

17.1. Биохимия на Д - димер

Д – димер е описан за първи път през 1970 г. Той е фибрин деградационен продукт (ФДП) и се получава от разграждането на неразтворимия фибрин, който произхожда от протеолитичното преобразуване на фибриногена.

Фибриногенът е плазмен гликопротеин с молекулна маса 340 kDa. Той представлява димер с 3 двойки полипептидни вериги [α (A), β (B), γ]₂, свързани с дисулфидни мостове (фиг. 2).



Фиг. 2. Молекулен модел на фибриноген по R. F. Doolittle, 1984.

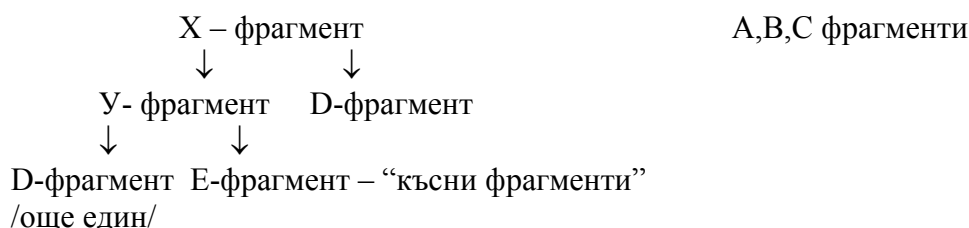
Фибриногенът съдържа 3% въглехидрати (4 олигозахарида на β - и γ -веригите), които имат значение за образуването на фибрин и обмяната на фибриногена. Той има и 3 места за свързване на Ca^{2+} йони (афинитет!). Биосинтезата му се извършва в черния дроб и се кодира от ген на хромозома 4. Времето му на полуживот е 3,5-4,5 дни. Фибриногенът има над 250 молекулни варианта като повечето от тях са без клинично значение /напр. заместването на една аминокиселина с друга в α -веригата води до нарушено отцепване на фибринопептид А от тромбина, промените във въглехидратния дял водят до нарушаване на функциите му/. Той участва и като адхезионна молекула в различни биологични реакции в човешкия организъм - кръвосъсирване, фагоцитоза (взаимодейства с тромбоцити, ендотелни клетки, макрофаги и фибробласти):

- при агрегацията на тромбоцитите се свързват първично с фибриноген
- в ендотелните клетки има рецептор за фибриноген, който го фиксира към съдовата стена
- фибриногенът участва в адхезията на бактерии и злокачествени туморни клетки върху повърхността на макрофагите
- стимулира секрецията на хемокини чрез свързването им със специфични рецептори

Фибриногенът има три области - две терминални области, съдържащи D-домейни и централна област, съдържаща E домейн (фиг. 1). Тромбинът разцепва фибриногена на фибринопептиди А и Б от E домейн региона и на разтворими фибринови мономери. Тези мономери формират нековалентни фибринови полимери. Фактор XIII а стабилизира фибриновия съсирек и го прави неразтворим, като създава ковалентни връзки между 2 γ - или 2 α -вериги. Веднага след това се включва плазминът, който е основен ензим на фибринолитичната система. Той разгражда неразтворимия фибрин чрез разцепване на алфа, бета и гама веригите и води до освобождаването на разнообразие от

фибриндеградационни продукти (ФДП) с голям обхват от молекулни тегла. ФДП при разграждане на фибриногена под действието на плазмина са следните:

- от фибриногена първоначално се образуват - X фрагмент и А, В, С фрагменти
- в следствие от X фрагмент се образуват Y и D фрагменти
- накрая от Y фрагмент се образуват още един D фрагмент и E фрагмент (късни фрагменти)



Д - димер е краен продукт от разграждането на неразтворимия фибрин. Неговото разграждане от плазмина е по-сложно. Получените в този случай ФДП са разградени, но остават частично свързани чрез напречни ковалентни връзки.

- D и E фрагменти
- димери между два D - фрагмента, наречени Д - димери (DD)
- комплексът Д – димер / E - фрагмент (DD/E)

Това са димери между два Д – фрагмента, образуващи се в хода на фибринолизата.

Той има приблизително молекулно тегло 180 kDa и плазмен полуживот около 8 часа.

Клирънсът му се извършва главно чрез бъбреците и ретикуло-ендотелната система.

Описаният биохимичен процес обяснява присъствието на Д - димер в кръвта и образуването и разграждането на тромбите в нея. Физиологично около 2-3% от плазмения фибриноген се превръща в разклонен фибрин и малки количества от Д - димер обикновено се откриват в плазмата на здрави пациенти.

17.2. Клинично значение на Д - димер

Д - димер първоначално е описан през 1970 г., а намира приложение в диагностиката през 1990 г. Прокоагулантните и антикоагулантни фактори на съсирването при здрави пациенти са в строг баланс. Всяка промяна в него би могъл да постави пациента в риск за тромбоза или кървене. Скорошно проучване установи, че прокоагулантните и антикоагулантните фактори са групирани заедно в коагулационна система (336). Редица изследователи считат, че откриването на вродени високи нива на определени фактори на кръвосъсирването трябва да се свързва с повишен риск от ВТЕ. От друга страна извън

гените, контролиращи факторите на кръвосъсирването има и регулаторни гени, които влияят върху нивата на протеини, засягащи коагулационната система. Някои автори теоретизират, че на определени нива тези регулаторни протеини предизвикват групиране на прокоагулантните и антикоагулантните фактори в групи (кльстери). Витамин К зависимите фактори, фактор XI и фактор XII са намерени заедно в една група (кльстер). Фактор V и фактор VIII са намерени в група заедно с фибриноген и D-димер, а фактор XIII остава независим. Антикоагулантните фактори протеин C, протеин S и антитромбин се намират заедно в една и съща група. (336).

Плазмената концентрация на Д - димер се увеличава драстично, когато коагулацията и фибринолизата се активират ин виво. Изследването на Д - димер е един от най-ранните тестове за доказване на фибринообразуване в организма. Причина за това могат да бъдат различни клинични състояния като нараняване на ендотелните клетки, злокачествени тумори, бременност, хирургия, сепсис, остър респираторен дистрес синдром (ARDS).

Повишението му се използва широко за ранна диагностика и контрол на лечението при дисеминирана интравазална коагулопатия (ДИК синдром). Той е по-чувствителен критерий в сравнение с рутинните показатели като активираното парциално тромбoplastиново време (APTT) и протромбиновото време (PT).

Д - димер е рисков показател за тромбоза - венозна тромбоемболия (ВТЕ), белодробния тромбоемболизъм (БТЕ), диабет и атеросклероза, отхвърляне на бъбречен трансплантат и тяхната диагностика. Изследването на Д - димер като диагностичен показател има висока чувствителност, но ниска специфичност. Неговото откриване в тестваните биологични материали не може да отговори на въпроса защо той е повишен.

В амбулаторни условия отрицателните стойности на Д - димер, придружени от нисък клиничен рейтинг на вероятностите (с помощта на инструмент като Wells критерии) показват, че общия клиничен риск на пациента с ВТЕ е изключително нисък. (174).

17.3. Бъдещи тенденции

Редица изследователи проучват клиничното значение на Д - димер при други болестни състояния и процеси. Днес използването на Д - димер като предиктор на тежестта на коагулопатията, възпалителната реакция и смъртността при критично болни пациенти е все по-разпространено. Висока средна изходна стойност на Д - димер се установява при пациенти с предсърдно мъждене, страдащи от сърдечно-съдови инциденти, инфаркт на миокарда, периферна оклузия, инсулт и др. (206). Нивото на Д - димер спада при лечение с антикоагуланти. Това дава възможност за прогнозиране на преживяемостта при пациенти с хронично предсърдно мъждене. Проучванията показват, че ниските нива на

Д - димер и прилагане на антикоагулантна терапия водят до нейното увеличаване. В този смисъл изследването на Д - димер може да предскаже преживяемостта в рамките на 2 години (206).

Проучвания са документирали ролята на Д - димер в откриването на остра аортна дисекция по време на кардиопулмонален байпас (305, 101, 66).

Установена е корелация между стойностите на Д - димер и тежестта на придобитата пневмония (т.е възпаление и хемостаза). При всеки четвърти пациент, повишението на С-реактивния протеин има корелация с повишението на Д - димер (т.е. възпаление и тромбоза). Високите стойности на двата показателя говорят за лоша прогноза на заболяването. Това съотношение предполага, че когато възпалението прогресира, вероятността от тромбоемболизъм се повишава.

17.4. Д - димер и карцином на простатата

В проспективно проучване е извършено изследване на плазмените нива на Д - димер, АТ III, плазминоген, фибриноген. Те са оценени при пациенти преди извършване на биопсия на простатата. Според морфологичните резултати от биопсията пациентите са разделени в две групи: такива с карцином и контролна група. Нивата на четирите коагулационни фактори са сравнени при групата с карцином и здравите пациенти. Освен това се търси зависимост между нивата на четирите коагулационни фактори и стадия на туморния процес при пациентите с карцином. В резултат е установено, че пациентите с простатен карцином имат значително по-ниски нива на активност на АТ III и по-високи плазмени нива на Д - димер отколкото тези в контролната група.

Според нас са необходими допълнителни изследвания за изясняване на основния механизъм и клиничните изяви на този феномен сред пациенти с клинично локализиран карцином на простатата.

Тази провокативна хипотезата за изучаване ролята на хиперкоагулацията и злокачествените заболявания е обещаваща и дава възможност за откриване на нови лекарства за лечение на рака. Редица автори препоръчват нови терапевтични подходи за регулиране на образуването на тромбин при злокачествените заболявания, което може да постигне две основни цели:

- предотвратяване на тромбозата
- предотвратяване растежа на тумора и развитие на метастази

17.5. Д - димер в реанимацията

Днес редица автори проучват дали Д - димер може да се използва като прогностичен критерий за смъртност в спешно или интензивно отделение. (351).

Триадата на Вирхов включва:

- увреждане на съдовата стена
- забавяне на кръвния ток
- повишена съсирваемост

Приема се, че при пациенти със сепсис, остър респираторен дистрес синдром или мултиорганна недостатъчност и наличие на триадата на Вирхов може да се получат съдови микротромби (306). В тези случаи смъртността е пряко свързана с броя и тежестта на засегнатите органи. Авторите се опитват да направят положителна корелация между нивата на Д - димер и критичното състояние на пациентите (306). Според нас нивото на Д - димер може да прогнозира обема на органната недостатъчност (306). Ето защо се счита, че резултатите от изследването на Д - димер може да се използват за прогнозиране тежестта на клиничното състояние на критично болния пациент.

17.6. Рак и тромбоза, тромбоза и рак

Тази провокативна хипотезата за изучаване ролята на хиперкоагулацията и злокачествените заболявания е обещаваща. Тя дава възможност за откриване на нови медикаменти за лечение на тези заболявания. Редица автори препоръчват нови подходи и препарати за регулиране образуването на тромбин в тези случаи, с което може да се постигне както предотвратяване на тромбозата така и подтискане прогресирането на тумора и неговите метастази.

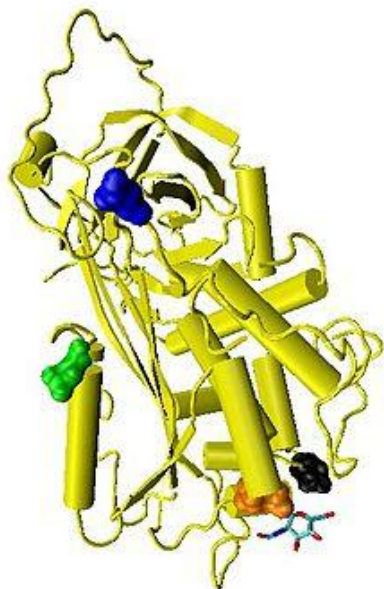
17.7. Лечение на БТЕ

Тук се включва намаляване съсирваемостта на кръвта, опасността от рецидиви и тромболиза (351). За лечение на тежък сепсис се прилага рекомбинантен човешки активиран протеин С, което води до понижаване нивото на Д - димер и повишаване на преживяемостта (351).

С това се полагат основите за бъдещи проучвания относно нивото на Д - димер като критерий за прогноза на състоянието и подобряване на грижите и лечението при пациенти в критично състояние.

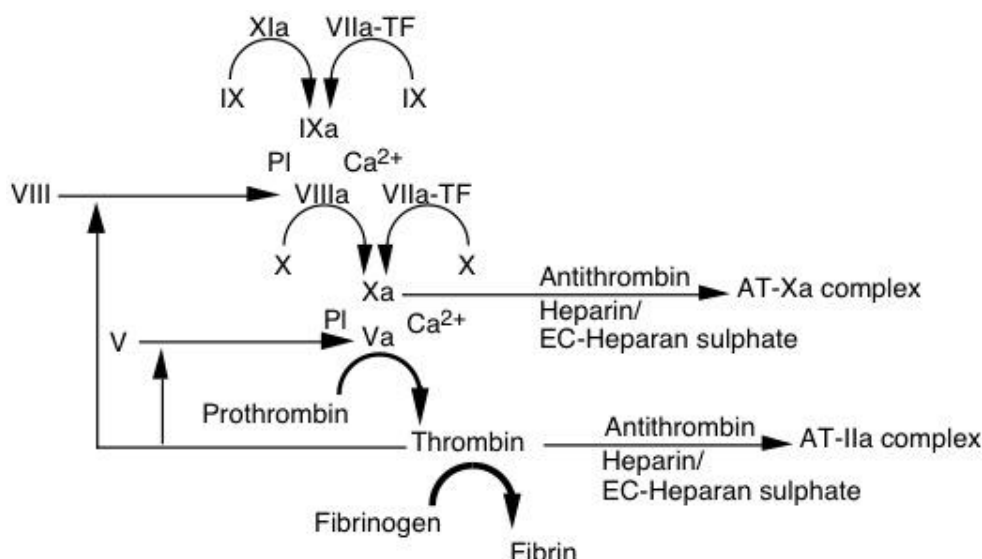
18. БИОХИМИЯ (ФИЗИОЛОГИЯ) НА АНТИТРОМБИН III

Под названието Антитромбин се разбира АТ III формата. Антитромбин III (III) се отнася до вещество в плазмата, което инактивира тромбина. Наименованията – антитромбин I до антитромбин IV произхождат от изследвания, проведени през 1950 от Seegers, W.H. et al. 1954 (301).



Фиг. 3. Белтъчна молекула на АТ III по Seegers, W.H. 1950 г.

Антитромбинът (АТ) е малка белтъчна молекула (фиг. 3). Тя инактивира ензимите от системата на коагулация. АТ е serpin (серин протеазен инхибитор) и е подобен по структура на повечето други плазмени протеазни инхибитори като алфа 1 анти-химотрипсин, алфа 2-антиплазмин и хепарин кофактор II. Антитромбин III (АТ) е естествен антикоагулант, който играе основна роля в хемостазата. Генът, кодиращ АТ III е локализиран в хромозома 1q23-q25. АТ III се синтезира в черния дроб. Той циркулира в плазмата като едноверижен алфа 2 гликопротеин с 432 аминокиселини и съдържа три дисулфидни моста с общо четири възможни места на гликолизирание. Молекулната му маса е около 65 kDa и има период на полуразпад в кръвната плазма около 3 дни (75, 78). АТ III е най-важният инхибитор на активираните фактори в коагулационната система на плазмата. Той инхибира факторите IXa XIa, XIIa, плазмина, като основната му физиологична роля е инактивирането на тромбина (фактор IIa) и в по-малка степен – фактор Xa. При физиологични условия действието на антитромбина е бавно – т.н. прогресиращо инхибиране (фиг. 4).



Фиг. 4. Антитромбин III – основен инхибитор в хемостазата по Chang, W. S. 1996 г.

Присъствието на хепарин в плазмата или подобни на хепарин молекули улесняват и ускоряват с около 2000 пъти свързването на антитромбина със сериновите протеази (67).

При свързване с лизиновия остатък на АТ на специфичното място, хепаринът предизвиква конформационни промени в молекулата му, предоставяйки аргининовите остатъци за бързо взаимодействие със серинови групи. Новата конформация на АТ има по-висок афинитет към тромбина и другите субстрати. По този начин хепаринът реагира веднага с тромбин и други протеази, инхибирайки активността им. Този ефект на хепарина е основата за клиничното му приложение като антикоагулант. След като АТ осъществи функцията си, ковалентно свързания комплекс губи афинитет към хепарина и той се отделя от него. Хепаринът е в състояние да катализира следваща реакция за неутрализиране на тромбин.

Конкретно в механизма за неутрализиране на тромбин хепаринът се свързва едновременно с АТ и с тромбин. Това улеснява свързването на инхибитора с прицелния ензим. За осъществяване на тази функция е необходим хепарин със сравнително дълги вериги.

При физиологични условия продуцираните от тъканите на кръвоносните съдове мукополизахариди с хепариноподобна активност катализират активността на АТ.

Ефектът на нискомолекулните хепарини е главно срещу фактор Xa, а високомолекулните са с предимно антитромбинов ефект.

За инхибиране на фактор Xa са необходими само конформационни промени в молекулата на АТ като хепаринът не се свързва с фактор Xa. Поради това инхибирането на фактор Xa може да бъде ускорено както от хепарин с къси вериги (нискомолекулен, фракциониран

хепарин), така и от дълговерижни полимери на хепарина (нефракциониран хепарин). Поради това лабораторния контрол на лечението с нефракциониран хепарин се извършва с теста АРТТ (изследва се активността на факторите XII, XI, IX, VIII, X, V, тромбин, фибриноген). От друга страна лечението с фракциониран хепарин може да се контролира чрез изследване активността на фактор Ха. Фракционираният хепарин, приложен терапевтично, не влияе на тромбина и не променя стойностите на АРТТ.

Комплексите АТ/серинова протеаза се отстраняват от циркулацията чрез фагоцитоза. В организма хепаринът съществува в тъканните безофили и като хепаран и като хепаран сулфат на повърхността на съдовите ендотелни клетки.

АТ контролира активирането на вътрешния път на коагулационната каскада.

19. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА Д-ДИМЕР И АНТИТРОМБИН III

19.1. Методи за изследване на Д - димер

Методите за изследване на Д-димер намират диагностично приложение през 1990 г. През 1978 г. Коорман, J. et al. представят един от първите лабораторни тестове за изследване Д - димер (173). Понастоящем се предлагат повече от 30 различни диагностични кита за този показател. Те използват широк спектър от техники, при които основният принцип за определяне на Д - димер до голяма степен остава един и същ - определяне на уникален нео-епитоп в Д - димера чрез специфични антисеруми.

19.1.1. Предлагани Д - димер тестове

- Техника - микроплака ELISA

Китове - Asserachrom DDI (Stago), Enzygnost (Dade-Behring)

Чувствителност - висока

Специфичност - ниска

Приложение - **златен стандарт** - анализът не се използва, поради троемкост

- Техника - ELISA и флуоресценция (ELFA)

Китове - Vidas DD (bioMerieux), Stratus D-dimer (Dade Behring)

Чувствителност - висока

Специфичност - ниска

Приложение - с подобна чувствителност на микроплака ELISA - класически, подходящ за използване в рутинната практика

- Техника - ELISA и хемилуминесценция

Китове - Pathfast (Mitsubishi), Immulite (Siemens)

Чувствителност - висока

Специфичност - ниска

Приложение - с подобна чувствителност на микроплака ELISA - класически, подходящ за използване в рутинната практика

- Техника - имунофилтрация и тип „сандвич” (POC техника)

Китове - Nycocard (Nycomed), D-dimer (Roche)

Чувствителност - висока

Специфичност - висока

Приложение - с по-ниска чувствителност от класическата микроплака ELISA - подходящ за използване в спешната диагностика

- Техника - полуколичествена латекс аглутинация

Китове - Dimertest латекс (IL), Fibrinosticon (bioMerieux), D-dimer тест (Diagnostica Stago - Roche)

Чувствителност - междинна

Специфичност - междинна

Приложение - бърз, полуколичествен, неподходящ за мониториране на лечение

- Техника - второ поколение латекс аглутинация (имуно-турбидиметричен)

Китове - TinaQuant (Roche), **Liatest (Stago)**, MDA D-dimer (bioMerieux)

Чувствителност - висока

Специфичност - междинна

Приложение – с подобна чувствителност на микроплака ELISA - класически, сравнително бърз тест

Методът микроплака ELISA е класически златен стандарт за определяне на Д-димер. Той е труден за изпълнение и отнема продължително време. Ето защо има ограничено приложение при необходимост от бърза диагностика, особено в амбулаторни и спешни условия. Редица усъвършенствани методи заменят метода микроплака ELISA. Те използват различни крайни техники за отчитане - флуоресценция, хемилуминесценция. Това позволява да се автоматизира анализа и да се намали времето за извършването му с приблизително 30 мин.

Количествените тестове, използващи латекс аглутинация с фотометрично или турбидиметрично отчитане осигуряват пълно автоматизиране и бързо получаване на резултати за Д-димер. Те могат да се извършват заедно с рутинната програма на

съответния коагулометър или на биохимични анализатори, елиминирайки нуждата от специална апаратура.

Методът за определяне на Д-димер в настоящата дисертация е второ поколение на латекс аглутинация (имуно-турбидиметричен) Liatest (Stago)

19.1.2. Стандартизиране на тестове на Д - димер

Отчитането на D-димер се извършва по калибрационна крива, построена с калибратор на фирмата производителка (343). Резултатите от анализа се отчитат като Д - димер концентрация, когато калибраторът е фрагмент Д - димер, пречистен от фибрин. Резултатите от анализа се отчитат като фибриноген еквивалентни единици (FEUs - $2FEU = 1$ Д - димер концентрация), когато използваме калибратор (пречистен фибриноген за образуване на съсирек-фибрин) с последваща деградацията от плазмин. Една единица на FEU е приблизително два пъти масата на един дял на Д - димер. Ето защо умножението на концентрацията на Д - димер по две конвертира масата до приблизителната концентрация в FEU.

Всеки тест има свой собствен калибратор, поради което стойността на Д - димер може да варира значително в зависимост от това кой тест е бил използван и как е калибриран. До момента няма референтен метод, първичен стандарт или универсален калибратор за анализа на Д - димер. Липсата на такава стандартизация е показана през 2007 г. в проучване, проведено от Колежа на американските патолози. То обхваща 196 лаборатории, които използват 12 различни методи за определяне на Д - димер. Голямата част от тестовете имат добър вариационен коефициент (CV) под 10 %.

19.2. Методи за изследване на Антитромбин III

Методите за изследване на антитромбин III са функционални (качествени) и имунологични (количествени) анализи (70, 255, 269, 319).

19.2.1. Функционалните методи за изследване на АТ се основават на принципа на инхибиране на Па или Ха факторите в присъствието на хепарин. Анти-FХа или анти-FIIа ефекта на АТ може да бъде измерен чрез съсирващи или хромогенни методи. Обикновено се използва хромогенния метод.

- **Хромогенните методи** са три варианта и се основават на инхибиране на говежди FIIа, човешки FХа и човешки FIIа. Принципът на действие и при трите варианта е сходен. Плазмата се инкубира с излишък от съответния субстрат в присъствието на хепарин. Хепаринът се свързва с АТ и предизвиква конформационна промяна в структурата му, което значително увеличава инхибиторната му активност. След това се прибавя остатъчна протеаза, което води до разцепване и промяна на цвета на хромогенния субстрат.

Абсорбцията се измерва при 405 nm и е обратно пропорционална на концентрационната активност на антитромбина в плазмената проба (табл. 1).

Субстрат	Принципи на метода
Човешки FIIa	<p>Плазмата се разрежда с физиологичен разтвор. В присъствието на хепарин се инкубира в продължение на 90 сек. с излишък от човешки FIIa, при което се образува комплекс АТ – тромбин - хепарин.</p> <p>Излишъкът от човешки FIIa катализира освобождаването на p-nitroaniline (PNA) от хромогенния субстрат. Абсорбцията се измерва при 405 nm и е обратно пропорционална на концентрационната активност на АТ в пробата.</p>
Говежди FIIa	<p>Плазмата се разрежда с физиологичен разтвор. След това се инкубира в продължение на 30 сек. в буфер, съдържащ говежди FIIa в излишък и хепарин сулфат. Остатъчната говежда FIIa активност се измерва с помощта на чувствителен FIIa хромогенен субстрат. Интензивността на оцветяването се измерва на 405nm и е обратно пропорционална на концентрационната активност на АТ.</p>
Говежди FXa	<p>Плазмата се разрежда с физиологичен разтвор. След това се инкубира в продължение на 90 сек. в присъствие на излишък от говежди FXa и наличие на хепарин. Остатъчният FXa се измерва чрез степента на хидролиза на хромогенния субстрат S-2765. Освободеният се PNA се измерва при 405 nm и е обратно пропорционен на нивото на АТ активността в пробата.</p>

Табл. 1. Хромогенни методи за определяне на антитромбин III в три варианта (Moorey, L. 1993).

19.2.2. Имунологични методи (табл. 2).

Метод	Принципи
ELISA анализи	АТ като антиген (Ag) обикновено се измерва с помощта на сандвич ензимно-свързан анализ (ELISA). Микротитърните плаки се покриват с поликлонални анти-АТ серуми. Разрежданията на плазмата от пациентите, контролните плазми и стандарта се добавят към плаката и се инкубират при стайна температура. След цикъла на промиване на плаката те се маркират с анти-АТ хрян пероксидаза конюгирано антитяло. Добавя се субстрат и абсорбцията на всяка ямка се измерва при 490 нм. Стандартната крива може да бъде построена от референтна плазма и по нея се отчитат АТ активностите на изследваните проби.

Табл. 2. Имунологични методи

19.2.3. Интерпретация на възможностите на методите

Тези видове методи имат различни възможности за откриване на отделните варианти на анти тромбин. Анализът с говежди FIIa е най-чувствителен (229). Той има кратко време на инкубация и открива всички анти тромбинови варианти, включително хепарин свързващите варианти. По тези свои качества той се различава от човешкия и говежди FIIa, FXa, които не могат да открият значителен брой клинично значими варианти. Разликата в чувствителността на трите метода може да се дължи на основният молекулен дефект, наличието на различните серин протеазни инхибитори или промените във времето за инкубация.

Референтният диапазон на анти тромбин при възрастни е 80 – 120 %.

При пациенти с нисък АТ е важно да се установи дали това се дължи на тип I или тип II мутация и дали мутацията засяга мястото на свързване с хепарина. Това обикновено се постига чрез секвениране на анти тромбин гена (186, 187).

20. ОБОБЩЕНИЕ

Този обзор обобщава сегашното разбиране за ролята на хемостазата в ангиогенезата и тясната връзка между нея, коагулацията и прогресирането на туморния процес. Той прави преглед на ключовите хемостазни фактори като TF, тромбин и фибрин, които индуцират ангиогенезата чрез зависими и независими от кръвосъсирването механизми.

Проспективни проучвания оценяват ползата от серийните измервания на маркери на хемостазата като прогностични тестове за канцерогенеза и рискови за поява на венозен тромбоемблизъм при тумори. Като предиктори на ВТЕ са Д - димер, АТ III, ТАТ,

II – селектин и др.

Проучването на един или повече от тези хемостазни показатели може да допринесе за откриване на нови подходи за контролиране на карцинома, повишаване преживяемостта на пациентите и тяхното качество на живот.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се проучи предоперативното и прогностично значение на хемостазните показатели при локализиран карцином на простатата за тежестта на заболяването. Да се разработи алгоритъм за оценка на следоперативния риск за развитие на венозен тромбемболизъм.

ЗАДАЧИ

За постигане на поставената цел беше необходимо да се изпълнят следните задачи:

1. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичния амидолитичен метод за определяне на АТШ.
2. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичния имунотурбидиметричен метод за определяне на Д-димер.
3. Да се извърши сравнително проучване на плазмените нива на хемостазните показатели при пациенти с локализиран карцином на простатата преди и след радикална простатектомия и контролна група пациенти с ДПХ.
4. Да се проучи корелационната зависимост между стадия на диференциацията на карцинома и хемостазните показатели.
5. Да определим най-добрите предиктори и техните стойности за настъпване на тромботични усложнения и дефиниране профила на рисковите пациенти.
6. Да установим най-вероятния следоперативен период, в който биха настъпили тромботични усложнения при пациенти, дефинирани като високо, средно и ниско рискови.
7. Да съпоставим стойностите на ПСА и хемостазните показатели и установим доколко съществува положителна корелация между тях.
8. Да проучим възможностите на Д-Димер, АТ Ш и фибриноген, техните прагове на чувствителност и специфичност, достоверност и надеждност пред- и следоперативно при карцином на простатата с оглед тежестта на заболяването и риска от усложнения.
9. Да създадем и предложим алгоритъм от различни хемостазни показатели за оптимално поведение и прогнозиране с висока степен на достоверност на усложненията след проведеното оперативно лечение на простатния карцином.

IV. МАТЕРИАЛ И МЕТОД

1. Собствен клиничен материал

Нашето проспективно проучване обхваща 246 пациенти с карцином на простатата, оперирани в Клиниката по урология и изследвани в Катедрата по клинична лаборатория и клинична имунология на Медицински университет, София – УМБАЛ „Александровска” за периода от 2008 – 2013 година. Те бяха на възраст от 51 до 79 години (средно 65 години). Те бяха показани за радикална простатовезикулектомия, която беше извършена чрез отворен достъп.

2. Включващи критерии и протокол

При пациентите бяха изследвани рутинните хемостазни показатели (ПТ, АПТТ, фибриноген) и Д-Димер, АТ III, предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30-ти ден след операцията с автоматичен коагуломер STA Compact (20).

Чрез морфологично изследване на отстранената простатата се определиха стадия и степента на диференциация на карцинома. Обема на оперативната интервенция зависеше от наличието на метастази в регионалните лимфни възли. Ние отчитаме и продължителността на оперативната интервенция в минути.

За същият период от време ние проследихме като контролна група 80 пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия (ДПХ) на възраст между 52 и 76 години. Те бяха показани за отворено оперативно лечение (трансвезикална простатектомия). При всички тях бяха изследвани предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30 следоперативен ден същите рутинни хемостазни показатели (ПТ, АПТТ, фибриноген) и Д-димер, АТ III. При тези пациенти беше изключен предоперативно простатен карцином чрез изследване на ПСА и ректално туширане. Като критерии беше прието ПСА $\leq 3,0$ ng/ml и негативно ректално туширане (ДРТ) или ПСА $> 3,0$ ng/ml и съмнително за карцином ректално туширане. При втората група пациенти задължително се извършваше пункционна биопсия под трансректален ултразвуков контрол.

Предоперативно при всички пациенти беше изследван ПСА, регистрирана възрастта и определени обема на простатната жлеза и степента на затлъстяване (BMI).

Пациентите бяха проследявани до 30 дни след извършването на операцията за настъпване на тромботични усложнения. За профилактика на възможна венозната тромбоза или емболия те получаваха нискомолекулярен хепарин (Zibor 2500 IU/ден) за 5 седмици съгласно протокола на Клиниката по урология, УМБАЛ „Александровска”, София. При

всички пациенти се прилагаха ластични бинтове на долните крайници (еластокомпресия) по време на операцията и през първите следоперативни дни. Пациентите се раздвижваха активно на 2-3-ти следоперативен ден (табл. 3).

Диагноза	Брой	Изследвани показатели	Изследване
Карцином на простатата	246	ПВ, аПТТ, фибриноген Д-димер, АТ III, ПСА, индекс на телесна маса	Предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30-ти ден след операцията Предоперативно
ДПХ	80	ПВ, аПТТ, фибриноген, Д-димер, АТ III, ПСА, индекс на телесна маса	Предоперативно и на 1-ви, 3-ти, 5-ти и 30-ти ден след операцията Предоперативно

Табл. 3. Изследвани пациенти 2008 – 2013 г.

При пациентите с клинични данни за дълбока венозна тромбоза (ДВТ) или БТЕ диагнозата се потвърждаваше и чрез компютърна аксиална томография (КАТ) на белия дроб и ултразвуково изследване на долните крайници.

2.1. Изисквания към пробата за изследване

Като биологичен материал се използва венозно взета кръв чрез хемостазен вакутейнер.

2.1.1. Начин на вземане

- минимално травмиране на вената, за да се избегне замърсяване на пробата с тъканна течност. Първият вакутейнер след венепункцията не трябва да се използва за коагулационни тестове.

- недопускане на венозна стаза, тъй като тя води до активиране на кръвосъсирването (за предпочитане е венепункцията да се направи без турникет). Използване на широки игли, за да не се разрушават тромбоцити и еритроцити.

- спазване на точно съотношение кръв / антикоагулант 9:1. Като антикоагулант се използва 3,8% тринатриев цитрат с 5,5 молекули кристализационна вода с крайна концентрация 105 mmol/l или 3,2% тринатриев цитрат с крайна концентрация 109 mmol/l (240, 241).

- след вземане на необходимото количество кръв тя внимателно се разклаща с цел размесване на кръвта с антикоагуланта

2.1.2. Транспорт и съхранение

- донасянето на цитратната кръв в лабораторията трябва да стане незабавно, най-късно до 1 час след вземането ѝ, за да се центрофугира и отдели плазмата. Идеалния срок за извършване на анализа е до 2 часа след центрофугирането и отделянето на плазмата.

- използва се бедна на тромбоцити плазма, която се получава при центрофугиране на кръвта при 3000 – 3500 U/min /2000 x g/ в продължение на 10 -15 мин.

- условията (-20°C или -70°C°) при необходимост от по-дълготрайно съхранение на плазмата до извършване на анализа се уточняват със специалист от клиничната лаборатория

3. Д - Димер – метод на изследване

Принцип на метода

STA -Liatest анализ на Д-димер е нов количествен и автоматизиран имуноанализ, използващ имунотурбидиметрична технология - отчита се промяната в абсорбцията, измерена на 540 Nm и автоматично се записва за 140 сек. (253). Този тест за изследване на Д-димер може да подпомогне диагнозата на дълбоката венозна тромбоза и белодробната емболия (25, 177, 275). В САЩ този метод се препоръчван като умерено технологична комплексна категория от CLIA 1988 – CDC аналитичен код 1320 и CDC система тестови кодове 04767, 04768 и 04876.

STA – Compact е коагулометър с имунологичен канал за отчитане на Д-димер.

Описанието на аналитичния ход на пробата в съкратен вид е следното :

1. Поставяме вакутейнерите в работните гнезда с бар код.
2. Реактивите и контролните материали са заредени в съответното отделение за реактиви.
3. Избираме от дисплея на компютъра пробата за Д-димер и стартираме програмата.

Необходимото количество за един анализ е 50 микролитра плазма.

Реактиви

- 1-ви реактив – (Реакционен буфер – TRIS с приблизително рН 7,5, 6x5 мл.) Reaction buffer – TRIS buffer, approx. рН 7,5, 6x5 ml
- 2-ри реактив – (кравешка албумин стебилизирана суспензия от латексови частици, обвити с Д-димер специфични миши моноклонални антитела 6x6 мл.) Bovin albumin-stabilized suspension of latex particles coated with D-dimer-specific monoclonal mouse antibodies, 6x6 ml

Начин на приготвяне на реактивите

Реактивите са готови за употреба.

Съхранение и стабилност

Неразтворените реактиви са годни до посочения на опаковката срок на годност при температура 2-8° С. След разтварянето годността на реактивите е 5 дни престой в оригиналните шишета при 2-8° С.

Калибрация

Калибрационната крива се изготвя автоматично с познати концентрации като се използва СТА Уникалибратор с лот № 109363. Той съдържа лиофилизирана човешка нормална плазма, представляваща пул от цитратна плазма от здрави донори. Една опаковка калибратор съдържа 6 шишенца. Те се разтварят с по 1 мл. дестилирана вода и след престой от 30 мин. на стайна температура може да се пристъпи към работа. Разтвореният калибратор е стабилен 4 часа при 15-20° С или 24 часа при замразяване. Неразтворените калибратори се съхраняват при 2-8° С и са годни до посочената на опаковката дата.

Внимание – съществува възможност от инфекциозен риск !!!

Този продукт съдържа човешки материал, който е тестван и показва негативни резултати за HTLV-III/HIV антитела и за хепатит В. Въпреки това се препоръчват безопасни процедури за минимален риск от пренасяне на инфекциозни болести.

Контролни плазми

Използват се контролни плазми в нормална и патологична област – STA LIATEST Control N + Control P с лот № 110269. Опаковката съдържа 12x1мл. шишенца нормална контролна плазма и 12x1мл. шишенца патологична контролна плазма. Те представляват лиофилизирана човешка плазма, разтваряща се с 1 мл. дестилирана вода. След внимателно размесване и престой на стайна температура от 30 минути могат да се използват за работа. Неразтворените плазми са годни до посочения на опаковката срок, а разтворени са стабилни 4 часа при 15-25° С или 24 часа при замразяване. Контролните плазми също крият възможност за възникване на инфекциозен риск.

Ежедневно се използват контролни плазми в двете нива.

Резултати

Областта на измерване (линейността) при Д-димер е от 0,22 – 4,0 mikrog/ml.

При приложено разреждане на плазмата е от 0,22 – 20,0 mikrog/ml.

Интерференции (73)

- липемия
- хемолизирани проби не бива да се тестват
- няма интерференция, ако интерфериращите вещества са в определени количества – нефракциониран хепарин до 2,0 IU/ml, ниско молекулярен хепарин до 2 анти-Ха IU/ml, хемоглобин до 2 g/l, конюгиран билирубин до 290mg/l, неконюгиран билирубин до 200mg/l

Референтни граници

Нормалните стойности на Д-димер при възрастни обикновено са под 0,50 µg/ml FEU (121). Те се повишават по време на бременността (117) и с напредване на възрастта (121, 195).

4. АТШ – метод на изследване

Количествената оценка на активността на АТ Ш в плазмата се извършва чрез хромогенен субстратен метод (151). В САЩ този метод се препоръчван като високо технологична комплексна категория от CLIA 1988 – CDC аналитичен код 0456 и CDC система тестови кодове 4677 и 4875.

Принцип на метода

Това е хромогенен метод, базиран на автоматично измерване в двустъпален тест –

АТ Ш + Хепарин → АТ Ш Хепарин

АТ Ш Хепарин + Тромбин → АТ Ш Хепарин Тромбин + остатъчен тромбин

MeOC-Gly-Pro-Arg-pNa + НОН + остатъчен тромбин → MeOC-Gly-Pro-Arg-pNa-OH + p-Nitroanilin

1. Инкубиране на плазмата с тромбин реагента в присъствие на хепарин за 60 сек.
2. Определяне на остатъчната активност на тромбина при взаимодействието му с хромогенен субстрат на 405 nm, която е обратно пропорционална на активността на АТ Ш в пробата на пациента.

СТА – Compact е коагулометър с електромеханично отчитане, хромогенен и имунологичен канал.

Описанието на аналитичния ход на пробата в съкратен вид е следното :

1. Поставяме вакутейнерите в работните гнезда с бар код.
2. Реактивите и контролните материали са заредени в съответното отделение за реактиви.
3. Избираме от дисплея на компютъра пробата АТ III и стартираме програмата.

Реактиви

1. Лиофилизиран тромбин с произход от крава над 10⁶kat/mL, 4 x 6 mL
 - 1а. Трис буфер – 50 mmol/L, хепарин – 2 U/mL, реагентът е готов за употреба - 4 x 6 mL.
2. Лиофилизиран хромогенен субстрат :
Ethyl-malonyl-S-Pro-Arg-pNA. AcOH(CBS 61.50), приблизително 1.4 μmol/mL,
4 x 6 mL

Начин на приготвяне на реактивите

Едно шише лиофилизиран тромбин се разтваря с едно шише буфер. Размесват се внимателно. Така приготвения реактив се оставя на стайна температура – 18 - 25°C за 60 мин., след което отново се размесва преди употреба.

Съхранение и стабилност

Неразтворените реактиви са годни до посочения на опаковката срок при температура 2-8° С. След разтварянето им годността на реактивите е 7 дни в оригиналните шишета при 15-20° С.

Калибрация

Калибрационната крива се изготвя автоматично с познати концентрации -115%, 77%, 38%, 10%. Използва STA Уникалибратор с лот № 109363, съдържащ лиофилизирана човешка нормална плазма. Тя представлява пул от цитратна плазма от здрави донори. Една опаковка калибратор съдържа 6 шишенца, разтварящи се с по 1 мл. дестилирана вода. След престой от 30 мин. на стайна температура може да се пристъпи към работа. Разтвореният калибратор е стабилен 4 часа при 15-20° С или 24 часа при замразяване. Неразтворените калибратори се съхраняват при 2-8° С и са годни до посочената на опаковката дата.

Внимание – съществува възможност от инфекциозен риск !!!

Този продукт съдържа човешки материал, който е тестван и показва негативни резултати за HTLV-III/HIV антитела и за хепатит В. Въпреки това се препоръчват безопасни процедури за минимален риск от пренасяне на инфекциозни болести.

Контролни плазми

Използват се контролни плазми в нормална и патологична област – STA SYSTEM Control N с каталожен № 111101, STA SYSTEM Control P с каталожен № 111101.

Опаковката съдържа 12x1мл. шишенца нормална контролна плазма и 12x1мл. шишенца патологична контролна плазма (лиофилизирана човешка плазма). Те се разтварят с 1 мл. дестилирана вода и след внимателно размесване и престой на стайна температура от 30 мин. могат да се използват за работа. Неразтворени те са годни до посочения на опаковката срок, а разтворени са стабилни 4 часа при 15-25° С или 24 часа при замразяване. Контролните плазми също крият възможност за възникване на инфекциозен риск.

Ежедневно се използват контролните плазми в двете нива.

Резултати

Областта на измерване при АТ III е от 0% - 140%.

Линейността на измерване е до 140% , а долната граница на откриваемост е (the low detection limit is) 9%.

Интерференции

- при лечение с тромбинови инхибитори (хирудин, аргатробан и др.) нивото на АТIII може да се повиши с около 10%μ

- няма интерференция при определени количества на интерфериращите вещества: хепарин до 1,0 IU/ml, хемоглобин до 7 g/l, билирубин до 200 mg/l, триглицериди до 7,6 g/l.

Референтните граници на АТ III при възрастни хора обикновено са 80-120 % (295).

Нивото на АТ III при жени в менопауза е по-ниско отколкото при мъже (105).

Намаляването на неговото ниво се установява и по време на бременността (77).

Нивото на АТ III при мъже намалява с напредване на възрастта (105).

При деца нивото на АТ III е нормално по-ниско до 6-ия месец, след което достига нивото при възрастни (320).

5. Фибриноген – метод на изследване

Принцип на метода

Хронометричен метод по Клаус – измерва се времето за образуване на съсирек в разрежена плазма след прибавяне на тромбинов реактив с определена концентрация.

STA – Compact е коагулометър с електромеханично отчитане

Описанието на аналитичния ход на пробата в съкратен вид е следното :

1. Поставяме вакутейнерите в работните гнезда с бар код.
2. Реактивите и контролните материали са заредени в съответното отделение за реактиви.
3. Избираме от дисплея на компютъра пробата за Фибриноген и стартираме програмата

Реактиви

- STA Фибриноген 12 x 5 мл.

Начин на приготвяне на реактивите

Едно шише лиофилизиран тромбин се разтваря с 5 мл. дестилирана вода.. Размесва се внимателно. Така приготвения реагент се оставя на стайна температура – 20 - 25 градуса С за 30 минути, след което отново се размесва преди употреба.

Съхранение и стабилност

Неразтворените реактиви са годни до посочения на опаковката срок на годност при температура 2-8 градуса С. След разтварянето годността на реактивите е 5 дни престой в оригиналните шишета при 2-8 градуса С.

Калибрация

Автоматично се изготвя калибрационна крива с познати концентрации - 100%,50%,33%,25% като се използва STA Unicalibrator с каталожен номер 11776584 140, съдържащ лиофилизирана човешка нормална плазма, представляваща пул от цитратна плазма от здрави донори. Една опаковка калибратор съдържа 6 шишенца, разтварящи се с по 1 мл. дестилирана вода и след престой от 30 минути на стайна температура може да се пристъпи към работа. Разтвореният калибратор е стабилен 4 часа при 15-20 градуса С или 24 часа при замразяване. Неразтворените калибратори се съхраняват при 2-8 градуса С и са годни до посочената на опаковката дата.

Внимание – съществува възможност от инфекциозен риск !!!

Този продукт съдържа човешки материал, който е тестван и показва негативни резултати за HTLV-III/HIV антитела и за хепатит В. Въпреки това се препоръчват безопасни процедури за минимален риск от пренасяне на инфекциозни болести.

Контролни плазми

Използват се контролни плазми в нормална и патологична област – STA PreciClot Plus I с каталожен номер 11776886 140, STA PreciClot Plus II с каталожен номер 11776894 140, STA PreciClot Plus III с каталожен номер 11776908 140. Опаковките съдържат 24x1мл с лиофилизирана човешка плазма, разтваряща се с 1 мл. дестилирана вода и след внимателно размесване и престой на стайна температура от 30 минути могат да се използват за работа. Неразтворени са годни до посочения на опаковката срок, а разтворени са стабилни 4 часа при 15-25 градуса С или 24 часа при замразяване. Контролните плазми също крият възможност за възникване на инфекциозен риск.

Ежедневно се използват контролните плазми в трите нива.

Резултати

Областта на измерване /линейността/ при фибриногена е от 1,5 – 9,0 g/l.

Измерваща област на разредените проби – 0,6 – 12,0 g/l.

Интерференции

- хемолизирани проби не бива да се тестват
- няма интерференция, ако интерфериращите вещества са в определени количества : хепарин до 1.0 IU/ml, хемоглобин до 100 mg/dl

Референтни граници

2.0 – 4.0 g/l

Останалите рутинни хемостазни показатели за РТ и аРТТ са изследвани, но не са обработени статистически и не са предмет на проучване в настоящия дисертационен труд.

6. Верифициране на основните аналитични характеристики на използваните методи за количествено определяне на Д- димер и АТ III

Съгласно препоръките на CLSI (Института на клинични и лабораторни стандарти на САЩ) аналитичните характеристики на всички методи, преди клиничното им приложение, следва да бъдат експериментално потвърдени чрез изследване и предоставяне на обективни доказателства. Тези изисквания са посочени в два документа – EP 05-A2 и EP15 A2. CLSI EP 15 A2 (2005) е програма, предназначена за верифициране на методи, при които се използва аналитична платформа и реактиви на производителя. Според документа минималните изисквания за верификация включват експериментално потвърждаване на следните ключови аналитични характеристики: аналитичен обхват (линейност) вкл. процедура с автоматично разреждане, възпроизводимост, достоверност и референтни интервали.

6.1. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичен имунотурбидиметричен метод за определяне на Д - димер

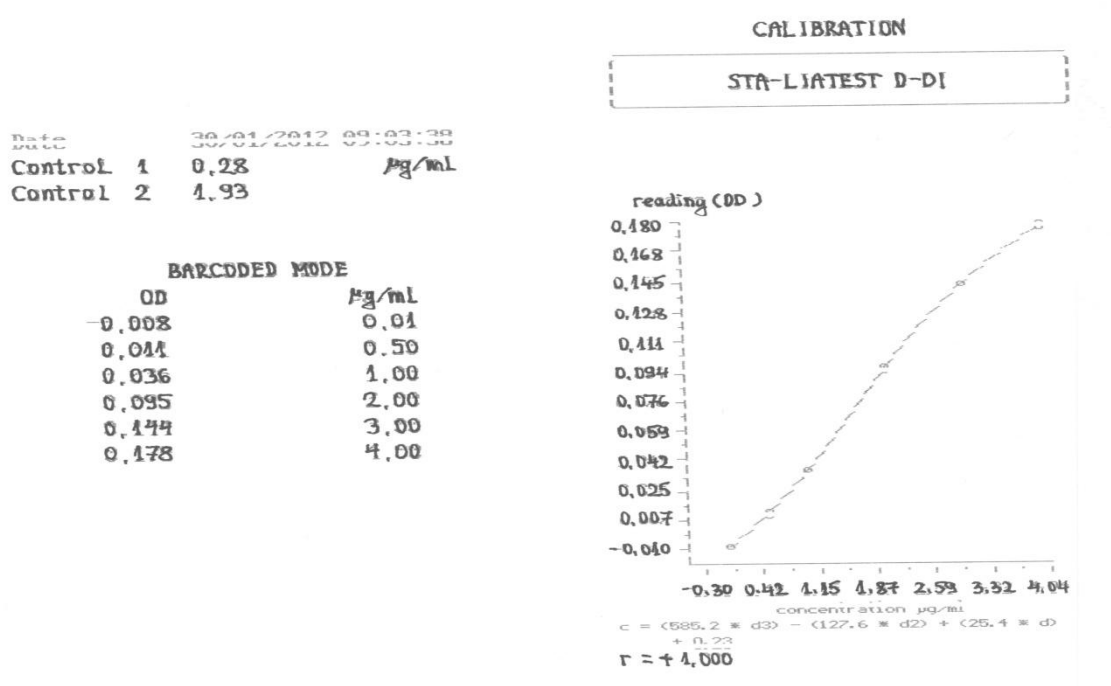
6.1.1. Аналитична измервана област (линеен обхват)

Преди да се започне процедурата по верификация е необходимо да се извърши верификация на калибрацията на аналитичната система. За целта използвахме STA Unicalibrator (лот №110665) - стабилизирана, лиофилизирана цитратна човешка плазма, прицелната стойност на която е определена чрез използване на вторичен стандарт, проследим до международен стандарт от по-висок метрологичен клас – Internation

standard N 02/150;2003. Следва да отбележим, че до момента няма създаден референтен метод, първичен стандарт или универсален калибратор за анализа на Д - димер. Калибрационните стойности са лот-специфични и са включени в бар-кода на калибратора. Получават се автоматично чрез разреждане с дестилирана вода на основния калибратор. Калибрационната графика се построява автоматично и се визуализира графично.

При смяна на лот № на реактивите, калибрационната крива се верифицира отново със STA Unicalibrator .

Потвърди се обявения от производителя линеен обхват – 0.27 до 4,00 µg/ml, изразен във фибриноген-еквивалентни единици (FEU) (фиг. 5)



Фиг. 5. Калибрационна графика от определяне на Д - димер с автоматичен турбидиметричен метод на коагулометър STA Compact

Клинично-измерваната област (чрез процедура с разреждане на плазмата с буфер Owren Koller при високи стойности) е до 20,0 µg/ml, изразен във фибриноген-аквивалентни единици (FEU).

6.1.2. Невъзпроизводимост на резултатите

За оценка на невъзпроизводимостта бяха използвани лиофилизирани контролни плазми от човешки произход в две концентрационни нива: STA Liatest Control N + P (лот № 110269).

6.1.2.1. Повторяемост на резултатите (невъзпроизводимост в серия) Повторяемостта беше определена в две концентрационни нива (n=10). Резултатите представяме на табл. 4.

D- Dimer µg/ml FEU	Liatest Control N	Liatest Control P
\bar{x}	0.28	2.38
SD	0.018	0.065
CV	6.4	2.7
CV на производителя	6.3	2.3

Табл. 4. Повторяемост (repeatability) на резултатите от определяне на Д - димер с автоматичен имунотурбидиметричен метод

6.1.2.2. Невъзпроизводимост във време (n=20)

Невъзпроизводимостта във време на резултатите беше оценена с помощта на посочените контролни плазми в две концентрационни нива. Резултатите представяме на табл. 5.

D - Dimer µg/ml FEU	Liatest Control N	Liatest Control P
\bar{x}	0,305	2,45
SD	0,0226	0,099
CV%	7.41	4.04
CV на производителя	7.3	3.9

Табл. 5. Невъзпроизводимост на резултатите от определяне на Д-димер с автоматичен имунотурбидиметричен метод

Получените от нас стойности на случайната вариация потвърждават посочените от производителя и за двете концентрационни нива.

6.1.3. Недостоверност

За оценка на недостоверността се прилагат следните подходи:

- корелационен и регресионен анализ на пациентски проби с референтен метод и с лабораторния метод

- прицелна стойност на референтен материал

За целта ние използвахме контролни плазми с прицелни стойности и допустими интервали, като определихме отклонението на средната аритметична стойност, получена в лабораторията, от обявената стойност на производителя като мярка за недостоверността. За целта бяха изследвани петкратно две контролни плазми.

STA Liatest Control N (лот № 110269) с доверителен интервал 0.10-0.50 µg/ml и STA Liatest Control P (лот № 110269) с доверителен интервал: 1.75 – 2.65 µg/ml. Резултатите представяме на табл. 6.

Контролен материал	Доверител интервал	\bar{x}	Bias %
LiatestControl I µg/ml FEU	0,30 0.10 – 0.50	0.31	3.3
LiatestControl II µg/ml FEU	2.30 1.75- 2.65	2.40	4.3

Табл. 6. Недостоверност на резултатите от определяне на Д-димер с автоматичен имунотурбидиметричен метод

Получените от нас средни аритметични стойности попадат в доверителните интервали на производителя и се отклоняват в допустими граници.

6.1.4. Референтни интервали

Съгласно препоръките на CLSI референтните интервали на производителите също подлежат на верификация. За целта се извършва следното проучване:

Подбират се 20 лица с верифицирано състояние на здраве от изследвания контингент на лабораторията, на които се изследва D dimer . Ако <2 резултата са извън референтните интервали на производителя, се приема, че те са верифицирани и могат да се прилагат от лабораторията за клинични цели. Ако > 3 резултата са извън референтните интервали, се препоръчва лабораторията да изработи собствени референтни интервали.

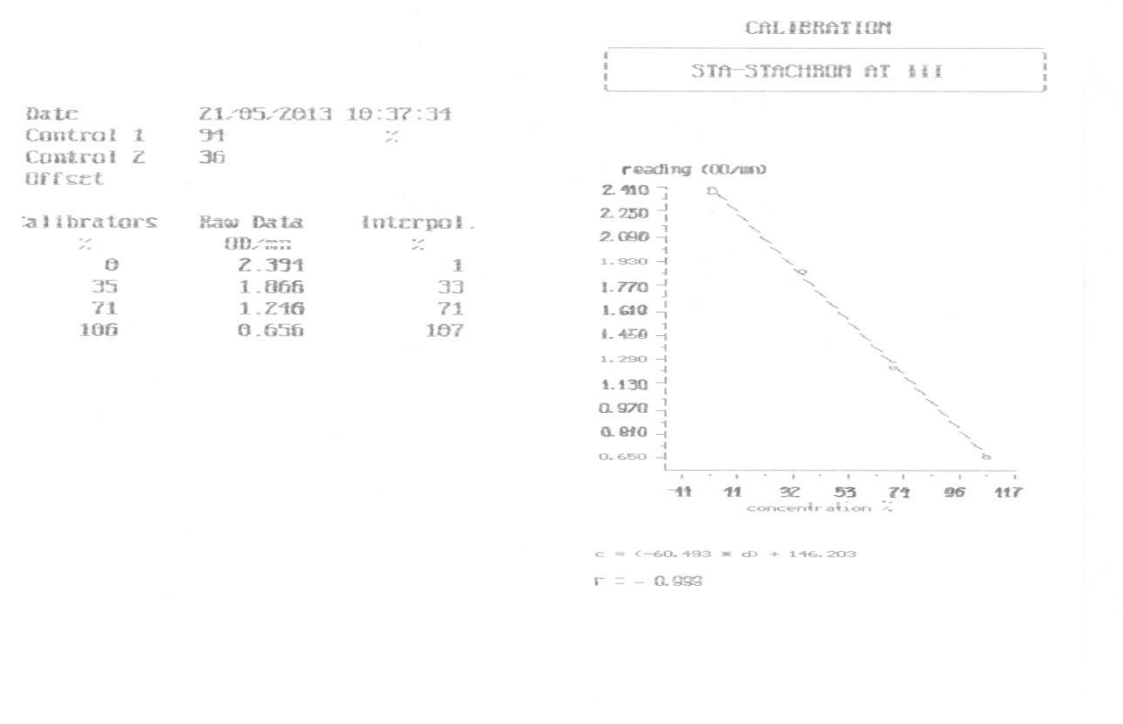
6.2. Верифициране на основните аналитични характеристики на автоматичен амидолитичен метод STA[®] –Stachrom[®] АТШ

Верификацията на калибрацията е извършена със STA Unicalibrator –(лот №110665) - стабилизирани, лиофилизирани на базата на нормална цитратна човешка плазма. Прицелната стойност за АТ Ш е определена чрез използване на вторичен стандарт, който е проследим до международен стандарт от по-висок метрологичен клас –IN 93/768;1994

Калибрационните стойности са лот-специфични и са включени в бар-кода на калибратора. Получават се автоматично чрез четирикратно разреждане с дестилирана вода на основния калибратор – 10%, 38%, 77%, 115%. Калибрационната графика се построява автоматично и се визуализира графично.

При смяна на лот № на реактивите, калибрационната крива се верифицира отново със STA Unicalibrator .

Обявеният от производителя линеен обхват на метода е от 9 до 140 %, което се потвърди и при нашия експеримент (фиг. 6)



Фиг. 6. Калибрационна графика от определяне на АТШ с диагностичен тест STA[®] – Stachrom[®] АТШ.

6.2.1. Невъзпроизводимост на резултатите

За оценка на невъзпроизводимостта бяха използвани лиофилизирани контролни плазми от човешки произход в две концентрационни нива:

STA SYSTEM CONTROL N с прицелна стойност 107%, допустим интервал: (91% - 123%) и STA SYSTEM CONTROL P с прицелна стойност 39%, допустим интервал: (31% - 47%).

6.2.1.1. Повторяемост на резултатите (невъзпроизводимост в серия) Повторяемостта беше определена в две концентрационни нива при (n=10). Резултатите представяме на табл. 7.

АТШ %	STA SYSTEM CONTROL N	STA SYSTEM CONTROL P
\bar{x}	103	43.5
SD	2.95	1.98
CV	2.86	4.55
CV на производителя	2.6	5.0

Табл. 7. Повторяемост (repeatability) на резултатите от определяне на АТШ STA[®] – Stachrom[®] АТШ

6.2.1.2. Невъзпроизводимост във време (n=20)

Невъзпроизводимостта във време на резултатите беше оценена с помощта на посочените контролни плазми в две концентрационни нива. Резултатите представяме на табл. 8.

АТШ %	STA SYSTEM CONTROL N	STA SYSTEM CONTROL P
\bar{x}	94,4	43.3
SD	4,5	2.49
CV%	4,8	5.8
CV на производителя	4.8	6.7

Табл. 8. Невъзпроизводимост на резултатите от определяне на АТШ STA[®] – Stachrom[®] АТШ във време

Получените от нас стойности на случайната вариация потвърждават посочените от производителя и за двете концентрационни нива.

6.2.2. Недостоверност

За оценка на недостоверността се прилагат следните подходи:

- корелационен и регресионен анализ на пациентски проби с референтен метод и с лабораторния метод
- прицелна стойност на референтен материал

За целта ние използвахме контролни плазми с прицелни стойности и допустими интервали, като определихме отклонението на средната аритметична стойност, получена в лабораторията, от обявената стойност на производителя като мярка за недостоверността. За целта бяха изследвани петкратно две контролни плазми STA SYSTEM CONTROL N с прицелна стойност 107%, допустим интервал: (91% - 123%). STA SYSTEM CONTROL P с прицелна стойност 39%, допустим интервал: (31% - 47%).

Резултатите представяме на табл. 9.

Контролен материал	Доверител интервал	\bar{x}	Bias %
STA PreciClot Plus I	107 (91 – 123)	103	- 3.7
STA PreciClot Plus II	39 (31 – 37)	43.5	11.5

Табл. 9. Недостоверност на резултатите от определяне на АТШ с автоматичен амидолитичен метод STA[®] –Stachrom[®] АТШ

Получените от нас средни аритметични стойности попадат в доверителните интервали на производителя и се отклоняват в допустими граници.

6.2.3. Референтни интервали

Съгласно препоръките на CLSI референтните интервали на производителите също подлежат на верификация. За целта се извършва следното проучване:

Подбират се 20 лица с верифицирано състояние на здраве от изследвания контингент на лабораторията, на които се изследва АТШ. Ако <2 резултата са извън референтните интервали на производителя, се приема, че те са верифицирани и могат да се прилагат от

лабораторията за клинични цели. Ако > 3 резултата са извън референтните интервали, се препоръчва лабораторията да изработи собствени референтни интервали.

7. Статистически методи и анализи

За статистическия анализ пациентите се разделят на субгрупи според:

1. Стадия на тумора - pT2, pT3.
2. Диференцираността на тумора.
3. Извършването или не на тазова лимфаденектомия.
4. Продължителност на операцията < 180 min и ≥ 180 min.
5. Body mass index < 25 и ≥ 25 .
6. Възраст ≤ 65 и > 65 години.

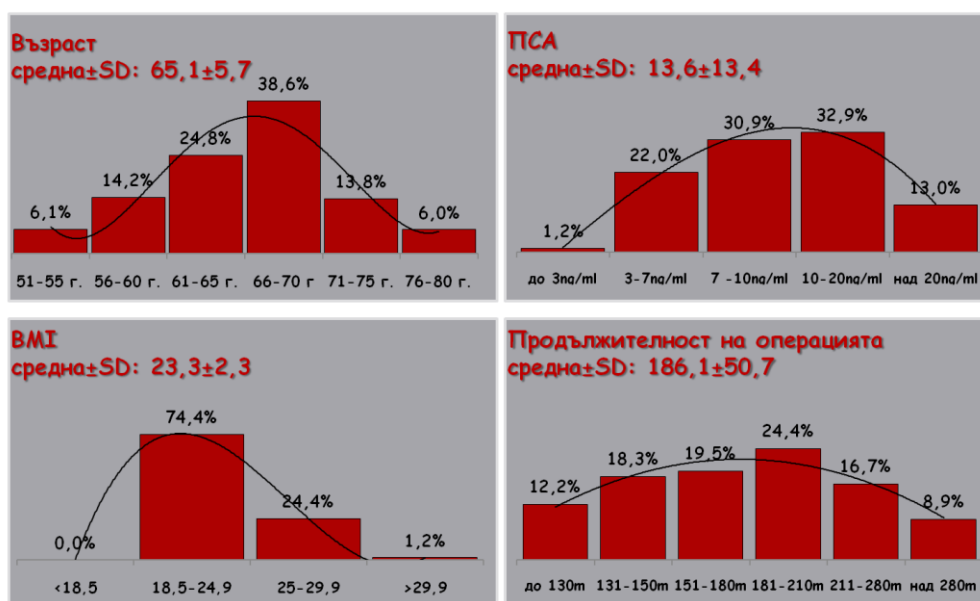
Данните са анализирани чрез статистическия пакет SPSS 19.0. Използвани са:

- За установяване наличието на статистически значими разлики t-test на Студент-Фишер и Пиърсън Chi-Квадрат тест при прието ниво на значимост от 95%;
- За измерване на зависимости между коагулационния профил и T-стадия и Gleason Score на карцинома: коефициент за корелация на Пиърсън;
- За анализиране на чувствителността и специфичността и оценка на различните прагове на лабораторните тестове: Receiver-Operating Characteristic (ROC) графики;
- За определяне на предикативната стойност на различни лабораторни тестове и други клинични параметри: създаден е множествен регресионен модел;
- За установяване на следоперативния период с най-висок риск за настъпване на тромботични усложнения: криви на Kaplan-Meier.

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Радикална простатектомия – стадий, диференциация, обем и продължителност на операцията, кръвозагуба

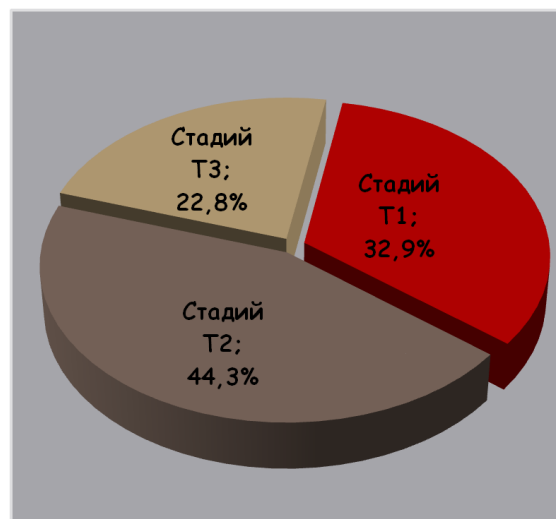
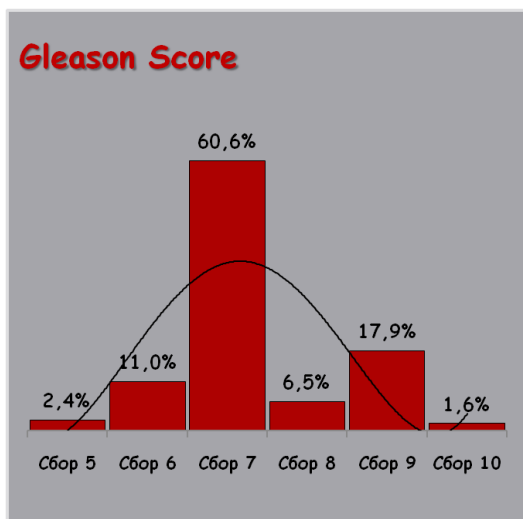
Разпределението на пациентите по възраст е много близко при тези с карцином и ДПХ. Преобладаващият брой пациенти с карцином на простатата са на възраст между 61-70 г. и с ПСА 7-20 ng/ml. Над 25% от пациентите са с наднормено тегло. Средното оперативно време беше 186 min (144 – 255 min). Това е показано на фиг. 7.



Фиг. 7. Разпределение на пациентите с карцином на простатата по възраст, ПСА, ВМІ и продължителност на операцията.

Тазова лимфна дисекция при радикалната простатектомия е извършена при 62 пациенти в зависимост от предоперативната стойност на ПСА и хистологичния резултат от биопсията. При 5 пациенти бяха установени метастази в тазовите лимфни възли.

При всички пациенти хистологичното изследване установява карцином в стадий между pT1 и pT3b. Стадирането на процеса показва Gleason Score между 5 и 10. Около 60,6% от пациентите са с Gleason Score 7, като 67% от пациентите са с Gleason Score 7 и 8, а 17,9% от тях са с Gleason Score 9. В стадий T1 са 32,9%, в стадий T2 са 44,3% и в стадий T3 са 22,8% от пациентите с карцином на простатата. Това е показано на фиг. 8.



Фиг. 8. Разпределение на пациентите с карцином по стадий и Gleason score.

Предоперативните стойности на ПСА са между 1,99 - 69,03 ng/ml, средно 13,6±13,4. Стойността на ПСА един месец след операцията намалява и спада до степен на лабораторна детекция. Последваща лъчетерапия и / или хормонална терапия е проведена при 11 пациенти, поради наличие на биохимичен рецидив. През първите 12 месеца след операцията не беше установен рецидив на карцинома на простатата. До шест месеца след операцията 86% от пациентите не се оплакват от незадържане на урината и са континентни. За същия срок от време при 43% от пациентите с интактен съдовонервен сноп едностранно или двустранно еректилната способност е запазена с или без използването на медикаменти.

2. Промени в лабораторните показатели

Предоперативните стойности на Д - димер, АТ III и фибриноген са статистически значимо различни при групата пациенти с простатен карцином спрямо тези с ДПХ. Това е показано на табл. 10.

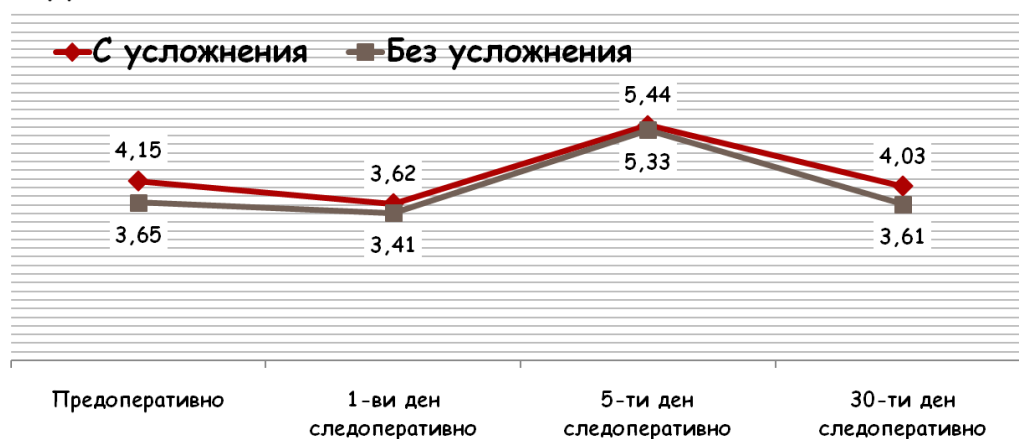
	СаР	ДПХ
Брой пациенти	246	80
Средни стойности		
Д-Димер	0,80 ↑	0,28 p=0,000
АТ III	71,22 ↓	101,09 p=0,000
Фибриноген	3,71 ↑	2,80 p=0,000

Табл. 10. Предоперативни нива на Д-Димер, АТ III, фибриноген при пациенти с карцином на простатата и ДПХ

Нивата на фибриногена първоначално намаляват, след което почти се удвояват и отново намаляват до предоперативните си стойности до 1-ия месец след операцията.

Фибриногенът не показва ясно отличима закономерност по отношение на завишения риск от тромботични усложнения. При пациентите в двете подгрупи с и без тромботични усложнения има значима разлика в предоперативните нива, както и в нивата след 30-ия следоперативен ден. Такава разлика не съществува в нивата на междинните контроли. Това е показано на фиг. 9.

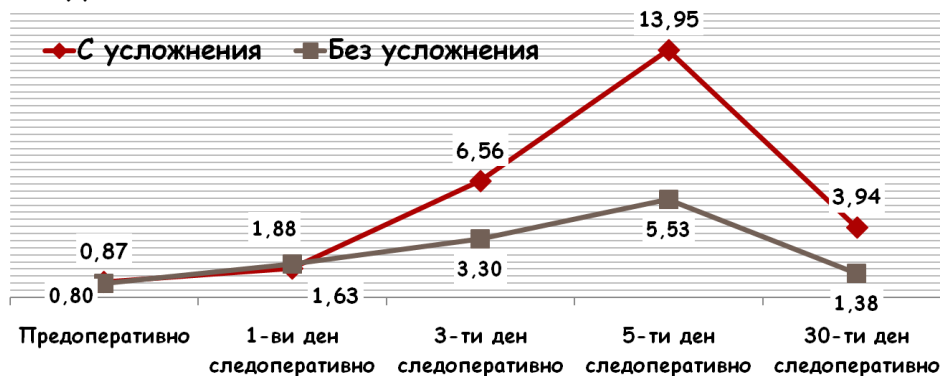
СРЕДНИ СТОЙНОСТИ



Фиг. 9. Нива на фибриноген при пациентите с карцином – със и без тромботични усложнения.

Д - димер е повишен на 1-ия час след операцията. Стойността му продължава да се увеличава с пик на 5-ия следоперативен ден, след което се връща до стойностите си преди операцията. При пациенти с тромботични усложнения Д - димера се повишава в много по-голяма степен, въпреки, че предоперативно няма значима разлика между двете подгрупи. Това е показано на фиг. 10

СРЕДНИ СТОЙНОСТИ



Фиг. 10. Нива на Д-димер при пациентите с карцином на простатата – със и без тромботични усложнения.

Стойностите на Д - димер преди и след операцията се различават значително при двете групи пациенти. Това е най – изразено на 5-ия и 30-ия ден.

3. Тромботични усложнения

Дълбока венозна тромбоза и/или белодробна тромбемболия се установи при 30 пациенти (12,2%) от всички 246 пациенти. При 8 (3,3%) от пациентите с усложнения се установи едновременно ДВТ или белодробен тромбемболизъм, а при 22 (8,9%) – само ДВТ. Това е показано на фиг. 11.



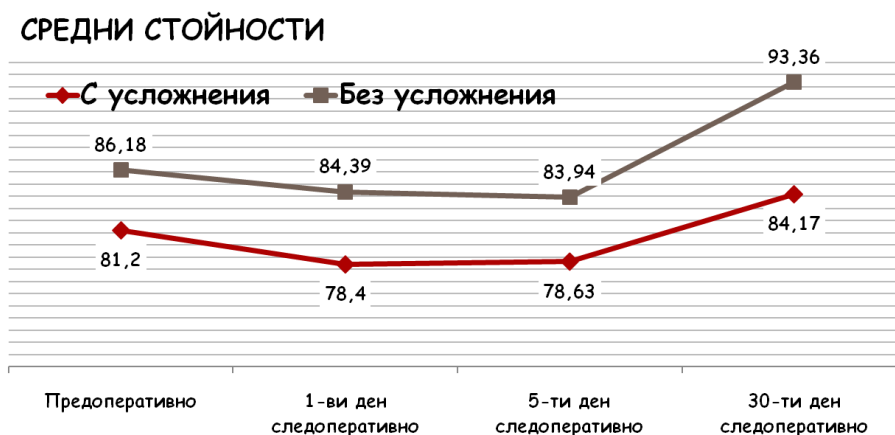
Фиг. 11. Дял на тромботичните усложнения при пациентите с карцином на простатата.

Процентът на тромботичните усложнения е по-висок при пациенти на възраст над 65 г, при недиференциран карцином и напреднал стадий, както и при пациенти с наднормено тегло. Процентът на пациентите с тромботични усложнения също е значимо по-висок след продължителна оперативна интервенция. Това е показано на табл. 11.

Стадий	% Тромб. усл.	Gleason score	% Тромб. усл.
T1-2 (N=190)	2,1%	≤ 7 (N=182)	6%
T3 (N=56)	46,4% p=0,000	> 7 (N=64)	29,7% p=0,000
ВМІ	% Тромб. усл.	Продължителност на операцията	% Тромб. усл.
25 (N=183)	8,2%	< 180 m (N=201)	4,5%
≥ 25 (N=63)	23,8% p=0,001	≥ m (N=45)	46,7% p=0,000
Възраст	% Тромб. усл.		
≤ 65 (N=111)	5,4%		
> 65 (N=135)	17,8% p=0,003		

Табл. 11. Дял на тромботичните усложнения при пациентите с карцином в основни под-групи.

В нашето проучване нивото на АТ III е статистически значимо по-ниско при пациентите, които са получили тромботични усложнения в сравнение с тези, които не са. Стойностите му започват да се покачват и при двете подгрупи на 5-ия ден след операцията. Темпото на повишаване е много по-бавно при пациентите, получили тромботични усложнения. Това е показано на фиг. 12.



Фиг. 12. Нива на АТ III при пациентите с карцином – със и без тромботични усложнения.

В сравнение с нивата на АТ III преди операцията те намаляват на 1-ия час следоперативно в сравнение с контролната група пациенти с ДПХ. Това намаление обаче не е сигнификантно.

4. Анализ на пациентите по групи

Ние извършихме ретроспективен анализ на данните и корелацията в промените на Д-димер, фибриноген, АТ III, възрастта и ВМІ. Резултатите показват, че няма значителна разлика между контролната група и пациентите с карцином по отношение на възрастта, ВМІ и обема на простатата, измерен чрез трансректално ултразвуково изследване (ТРУС). Средните стойности на серумния ПСА в контролната група и пациентите с карцином е съответно $5,8 \pm 2,6$ и $13,6 \pm 13,4$ ng/ml. Нашите резултати показват, че предоперативните плазмени нива на Д-димер са значително по-високи, активността на АТ III е значително по-ниска и фибриногена е значително по-висок при пациентите с карцином на простатата в сравнение с тези с ДПХ.

Пациентите с карцином на простатата и Gleason Score над 7 показват по-ниска предоперативна активност на АТ III в сравнение с останалите пациенти. От друга страна тази разлика само достига до статистическата значимост. По отношение на останалите коагулационни параметри между пациентите с карцином на простатата и Gleason Score

под 6 и тези с GleasonScore над ≥ 7 не се установява статистическа значимост в предоперативните нива на фибриноген и Д-димер. При използване на същия анализ и праг на Gleason Score от 8 се установява значима разлика с по-високи нива на Д-димер и достига статистическа значимост при фибриноген. Същата е зависимостта и при пациентите със следоперативно установена екстракапсулна инвазия на тумора ($\geq T3$) или с близки и далечни метастази. Стадирането по GleasonScore и T-стадий на простатния карцином корелират в голяма степен с нивото на Д-димера, измерено на 3-ия и 5-ия следоперативен ден. Установява се също умерена корелация между GleasonScore и нивото на Д-димера на 1-ия и 30-ия следоперативен ден. Това е показано на табл. 12.

		ДД предоперативно	ДД 1ви ден	ДД 3ти ден	ДД 5ти ден	ДД 30ти ден
T-стадий	Pearson Correlation	,083	,039	,462**	,518**	,397**
	Sig. (2-tailed)	,196	,542	,000	,000	,000
	N	246	246	246	246	246
Gleason Score	Pearson Correlation	,058	,245**	,405**	,414**	,301**
	Sig. (2-tailed)	,366	,000	,000	,000	,000
	N	246	246	246	246	246

Табл. 12. Корелация между Gleason Score, T-стадий и Д-димер при пациентите с карцином на простатата.

От друга страна резултатите показват, че Gleason Score не корелира с предоперативните стойности на Д-димер. Установява се обаче, че нивата на Д-димер са по-високи при пациентите с ПСА над 10 ng/ml. Това е показано на табл. 13.

		Д-Димер предоперативно
PSA	Pearson Correlation	,026
	Sig. (2-tailed)	,687
	N	246

	Брой пациенти	PSA		Д-Димер предоперативно	
		Средна	SD	Средна	SD
PSA до 10ng/ml	133	6,83	1,56	0,74	0,51
PSA \geq 10ng/ml	113	21,57	16,40	0,86	0,63

Табл. 13. Корелация между ПСА и Д-Димер при пациентите с карцином.

Ние установихме ниска степен на зависимост между Gleason Score и нивото на фибриноген. Налице е обаче умерена корелация между Т-стадия на простатния карцином и предоперативния фибриноген, както и тези измерени на 5-ия и 30-ия следоперативен ден. Това е показано на табл. 14.

		Фибр. Предопер.	Фибр. 1ви ден	Фибр. 5ти ден	Фибр. 30ти ден
Т- стадий	Pearson Correlation	,207**	,180**	,210**	,200**
	Sig. (2-tailed)	,001	,005	,001	,002
	N	246	246	246	246
Сбор по Gleason	Pearson Correlation	,185**	,133*	,102	,177**
	Sig. (2-tailed)	,004	,037	,109	,005
	N	246	246	246	246

Табл. 14. Корелация между Gleason Score, Т-стадий и фибриноген при пациентите с карцином.

Т-стадия на простатния карцином корелира значително както с предоперативните, така и със следоперативните нива на АТ III, измерени на 1-ия и 5-ия ден. От друга страна Gleason Score корелира умерено с АТ III, измерен на 1-ия следоперативен ден. Това е показано на табл. 15.

		АТ III предопер.	АТ III 1ви ден	АТ III 3ти ден	АТ III 30ти ден
Т- стадий	Pearson Correlation	-,564**	-,591**	-,492**	-,279**
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000
	N	246	246	246	246
Сбор по Gleason	Pearson Correlation	-,164*	-,275**	-,188**	-,084
	Sig. (2-tailed)	,010	,000	,003	,190
	N	246	246	246	246

Табл. 15. Корелация между Gleason Score, Т-стадий и АТ III при пациентите с карцином.

Извършването на тазовата лимфна дисекция при пациентите с простатен карцином не корелира със стойностите на Д-димера за разлика от продължителността на самата операция. Стойността на Д-димер корелира с ВМІ над 25.

Концентрацията на фибриноген преди операцията при пациентите с карцином на простатата са със статистически значими разлики в сравнение с тези при ДПХ. Тя обаче не показва статистически значима разлика при сравняване на пациентите с карцином и развили венозна тромбоза с тези без венозна тромбоза. Не се установява статистически значима разлика в нивото на фибриноген и между пациенти с венозна тромбоза и такива с белодробен тромбоемболизъм. Ето защо можем да кажем, че фибриногеновата концентрация не се свързва с повишен риск от развитие на венозна тромбоза (165).

5. Мултивариационен регресионен модел на предикторите на тромботични усложнения при карцином на простатата

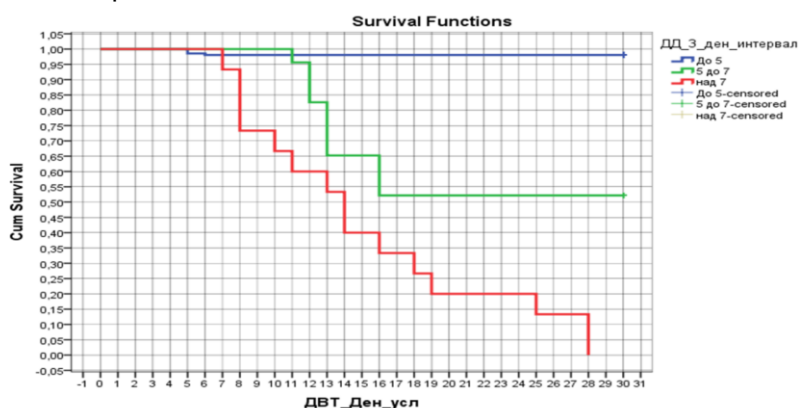
Мултивариационният регресионен модел на предикторите на тромботични усложнения при пациентите след радикална простатектомия по повод на карцином на простатата обяснява 76,3% от вариацията. Невключените променливи не допринасят значимо поради ниската си предикативна стойност и моделът ги „изхвърля“. С най-голяма предикативна сила са ниво на Д-димер на 5-ия ден, както и АТ III на 1-ия ден след операцията. Това е показано на табл. 16.

Независими променливи в модела: - Възраст - ВМІ - Продължителност на операцията - Gleason Score - Т-Стадий - ДД 3ти ден - ДД 5ти ден - АТ III 1ви ден - Фибриноген 1ви ден	Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
	(Constant)	,401	,426		,941	,348
	ДД 5ти ден	,026	,008	,325	3,264	,001
	АТIII 1ви ден	-,018	,004	-,210	-4,419	,000
	ВМІ	,026	,006	,181	4,138	,000
Зависима променлива: Наличие на тромботични усложнения през периода на проследяване	Продължит. опер.	,001	,000	,191	3,817	,000
	ДД 3ти ден	,037	,018	,195	2,047	,042

Табл. 16. Мултивариационен регресионен модел на предикторите на тромботични усложнения при карцином.

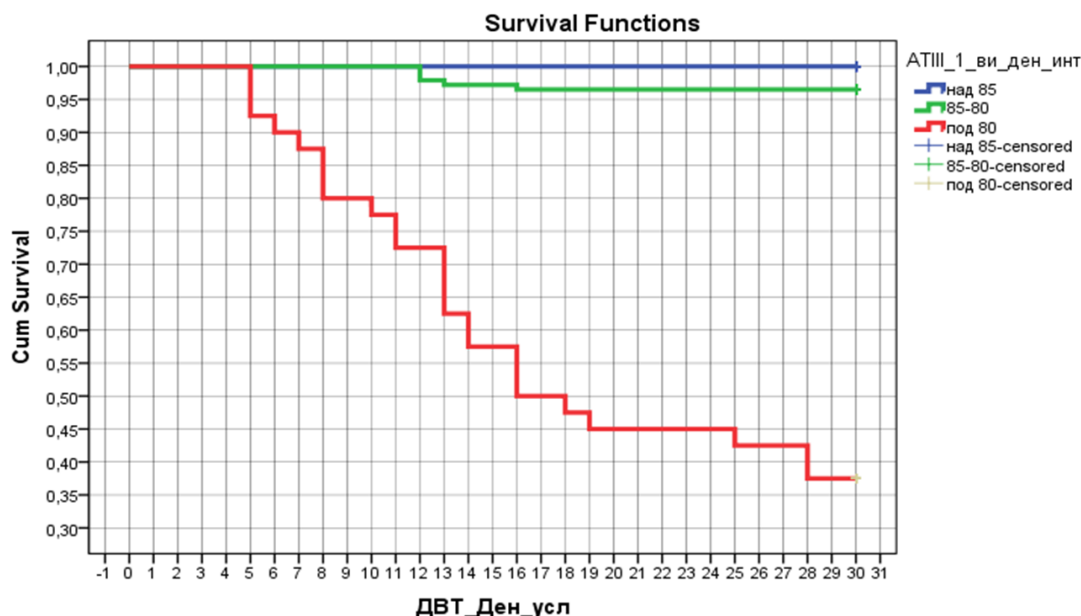
При пациентите с Д-димер до 5 µg/ml на 3-ия ден операцията е налице минимален риск да се развият усложнения в 30 дневен период (до 3%). При другите пациенти с нива на Д-

димер от 5 $\mu\text{g/ml}$ до 7 $\mu\text{g/ml}$ рискът значително се увеличава. Тази тенденция с времето продължава като между 11-ия и 16-ия ден той нараства прогресивно от 5% до 50%. При нива над 7 $\mu\text{g/ml}$ периодът от 8-ия до 19-ия ден е най-рисков и нараства от 25% до 80%. Това е представено на фиг. 13.



Фиг. 13. Криви на Каплан-Майер: Д - димер на 3-ти следоперативен ден: оценка на риска.

При пациентите с АТ III над 80 на 1-ия ден след операцията е налице 5% риск да се развият усложнения в 30 дневен период. От друга страна резултатите показват, че практически след 15-ия ден той не нараства. При пациенти с нива на АТ III под 80 периодът между 6-ия и 19-ия ден е най-рисков. В този интервал от време той варира от 10% до 55%. Това е показано на фиг. 14.



Фиг. 14. Криви на Каплан-Майер: АТ III на 1-ви следоперативен ден: оценка на риска.

Първичното следоперативно скриниране за ранна диагностика на венозна тромбоза или белодробен тромбоемболизъм се извършва чрез внимателно проследяване на клиничните данни и плазмените нива на Д-димер и АТ III (30, 39, 242).

VI. ОБСЪЖДАНЕ

1. Интерпретация на стойностите на Д-димер, АТ III и фибриноген преди и след радикална простатектомия.

Д-димер

Повишението на Д-димер е индикатор за образуване и натрупване на фибрин, което го прави рисков показател за тромбоза (тромбофлебити, белодробна тромбоемболия). При злокачествени тумори туморната тъкан е покрита с фибринова мрежа, която е източник на ФДП, в частност на Д-димер.

Увеличението на първоначални нива на Д-димер съвпада с публикуваните резултати в други проучвания (39, 136, 190).

Плазменото ниво на Д-димер са значително по-високи при пациенти с карцином на простатата в сравнение с контролната група. Това може да се свърже с повишената коагулационна активност при карцинома, особено когато той е в по-напреднал стадий и / или по-недиференциран вариант. Ние предполагахме обаче, че Д-димер не е достатъчно специфичен, за да установи разлики в нивото на хиперкоагулация при пациентите с Gleason Score под 6 и над 7. От друга страна Д-димер показва по-високи нива при по-висок праг на недиференцираност на тумора (Gleason Score над 8). Такава взаимовръзка установихме и при пациентите с екстракапсулна инвазия (стадий на тумора над Т3) и близки и далечни метастази. Тези резултати предполагат възможност за прецизиране поведението на клинициста по отношение дозировката на хепариновата профилактика и следоперативното проследяване на възможното развитие на венозна тромбоза. Факторите, повлияващи тромботичния риск все още не са точно определени.

Д-димер се повишава на 1-ия час след операцията, след това стойността му продължава да се увеличава и достига своя пик на 5-6-ти следоперативен ден. Накрая се връща до предоперативните си стойности.

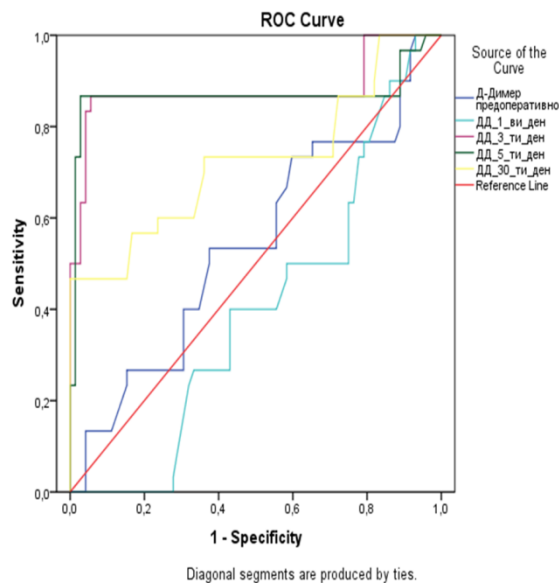
Стойностите на Д-димер се различават значително между развитите венозна тромбоза и останалите пациенти преди и след операцията. Тези разлики остават постоянни в първите 30 дни след операцията. Това показва, че най-висок риск от венозна тромбоза се наблюдава между 6-ия и 20-ия следоперативен ден.

Ние считаме, че проследяването на Д-димер на 3-ия и 5-ия ден след операцията трябва да са основни отправни точки при определяне на риска от тромботични усложнения при тези пациенти. Това е показано на фиг. 15.

Площ под ROC
кривата:

ДД предопер.	54,1%
ДД 1ви ден	39,9%
ДД 3ти ден	88,1%
ДД 5ти ден	86,9%
ДД 30ти ден	72,4%

Проследяване на ДД на 3ти и 5ти ден следва да са основни отправни точки при определяне на пациента като рисков за тромботични усложнения



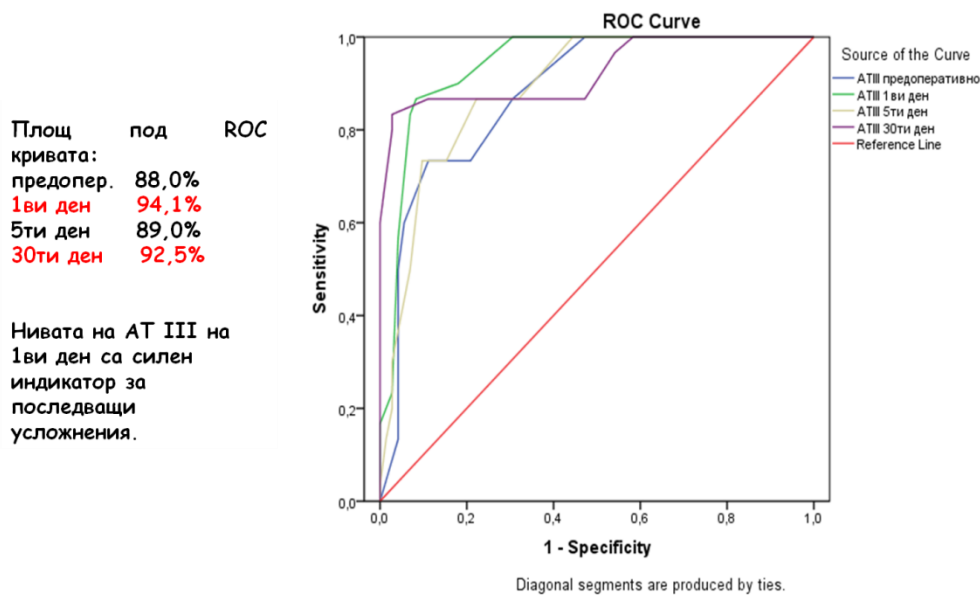
Фиг. 15. Чувствителност и специфичност на Д-димер при пациентите с карцином.

Предоперативните стойности на Д-димер, увеличението му на 3-ия следоперативен ден, продължителността на операцията, разширената тазова лимфна дисекция, възрастта са важни прогностични рискови фактори за венозна тромбоза и белодробен тромбоемболизъм (119, 274). Логистичният регресионен мултивариационен анализ установява, че стойността на Д-димер на 3-ия следоперативен ден и напредналата възраст са независими рискови фактори за предсказване развитието на следоперативна венозна тромбоза.

АТ III

При злокачествени заболявания може да се намали продукцията на инхибитори на коагулацията и да се ускори тяхната прокоагулационна активност. АТ III регулира повишената прокоагулационна активност и е важен естествен тромбинов инхибитор. Той дезактивира тромбина чрез необратима реакция, което води до образуването на тромбин-антитромбинови комплекси. Нашите проучвания показват, че нивата на АТ III са ниски при пациенти със злокачествени заболявания.

ROC кривата показва чувствителността и специфичността на АТ III при пациенти с карцином на простатата. Спорде нас нивата му на 1-ия следоперативен ден са силен индикатор за последващи тромботични усложнения. Това е показано на фиг. 16.



Фиг. 16. Чувствителност и специфичност на АТ III при пациентите с карцином.

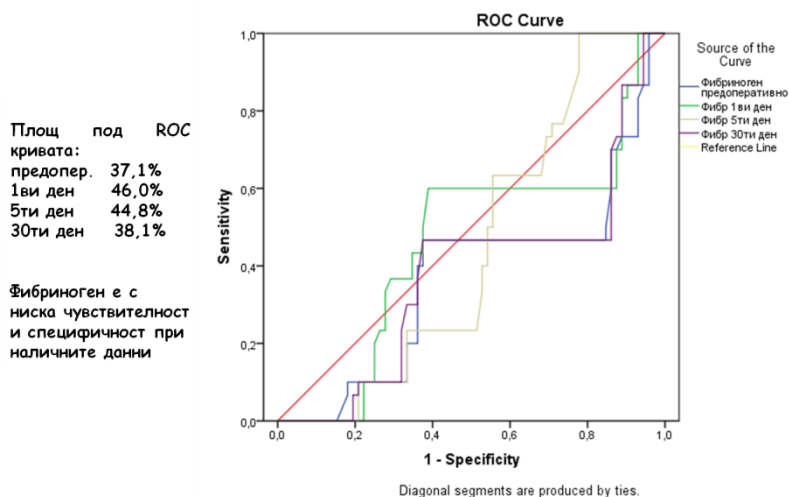
Регресионният мултивариационен анализ установява, че ниските стойности на АТ III на 1-ия следоперативен ден са независим фактор и с най-голяма предиктивна сила за следоперативни тромботични усложнения при карцином на простатата.

Фибриноген

Нивата на фибриногена първоначално намаляват, след това почти се удвояват и накрая намаляват до предоперативните си стойности на 1-ия месец след операцията. Фибриногеновите нива показват по-слаб отговор на тъканната травма, отколкото Д-димер. Серумните нива на фибриногена се различават слабо както преди, така и след операцията и между проучваните групи пациенти. Ние не установихме връзка между тях и риск от венозна тромбоза.

Стойностите на фибриногена показват слаба статистическа значимост при сравняване на пациентите с карцином и тези от контролната група. Ние не установихме статистически значима разлика при сравняване на пациенти с карцином на простатата и развили венозна тромбоза и без венозна тромбоза. Такава не беше установена и между пациентите с венозна тромбоза и белодробен тромбемболизъм (196). Според нас нивата на фибриноген не могат да се свързват с повишен риск от развитие на венозна тромбоза.

Ние установихме, че фибриногенът е с ниска чувствителност и специфичност при наличните данни. Това е показано на фиг. 17.



Фиг. 17. Чувствителност и специфичност на фибриноген при пациентите с карцином.

Ние установихме липса на разлика между контролната група пациенти и тези с карцином на простатата по отношение на възрастта, BMI и обема на жлезата, измерен чрез трансректално ултразвуково изследване. Нашите данни съвпадат с тези на други автори (138). Това се дължи на факта, че пациентите с диагностициран и лекуван карцином на простатата и тези от контролната група са най-често на възраст между 60 и 70 години (30, 194).

Средните стойности на серумния ПСА при пациентите с карцином на простатата е разбираемо по-висок. Те обаче силно се припокриват при пациентите с ДПХ в диапазона между 4-10 ng/ml.

Продължителността на операцията, интраоперативната кръвозатуба и следоперативните усложнения са подобни на описаните от други автори. Окончателно определеният патологичен стадий на заболяването е предимно T1 – T2. Стадий T3 е изключение предвид подборът на пациентите с показания за радикално оперативно лечение (91). При пациенти с доказана екстракапсулна инвазия и / или установени близки и далечни метастази е извършена лъчетерапия или пълна андрогенна блокада (медикаментозна и естетична пулпектомия). Те бяха изключени от по-нататъшно проследяване.

Продължителността на операцията и агресивната тазова лимфна дисекция при тазови тумори е добре известен рисков фактор за развитие на дълбока венозна тромбоза. В нашето проучване продължителността на операцията и обема на лимфната дисекция не повлияха коагулационните фактори в следоперативния период. Те обаче остават рисков фактор за развитие на тромботични усложнения в първите 4 седмици след операцията. От друга страна повишеният риск от развитие на тромбоза може да се свърже с

интраоперативната травма и застоя в дълбоката венозна система по време на оперативната интервенция.

Нашите резултати предполагат, че продължителната анестезия и високия ВМІ може да допринасят за коагуационната активност в следоперативния период.

Преценката на индивидуалния тромботичен риск преди извършването на радикална простатектомия по повод на простатен карцином е важна съставна част от диагностично-лечебния процес на пациентите (165). Понякога тя играе решаваща роля особено при установяване на високо рискови пациенти и необходимост от модифициране на антикоагулационната терапия. За съжаление конвенционалните хемостазни изследвания нямат необходимата специфичност и чувствителност за определянето на тази група пациенти. Ето защо ние препоръчваме изследването на специализирани хемостазни показатели като Д-димер и АТ III, за да се определи риска от следоперативни тромботични усложнения и индивидуализира антикоагулантната терапия.

Основните препоръки за антитромботична профилактика при високо рисковите пациенти включват приложението на нискомолекулярен хепарин - еднократно дневно, а при силно кървене - следоперативна еластокомпресия на долните крайници. При пациенти с изключително висок риск се препоръчва комбинация от еднократно дневно прилагане на нискомолекулярен хепарин и еластокомпресия на долните крайници. Той е неинвазивен и евтин метод за профилактика (71). В случаите на повишен риск от кървене механичната профилактика трябва да се предпочита пред фармакологичната.

Според редица проучвания рискът от следоперативни тромботични усложнения продължава да е значим в рамките на 1-ия месец след оперативната интервенция. По клинични данни той обаче е значим до 6-та седмица след операцията, а нисък риск съществува до 12-та седмица след операцията.

Различните форми на антикоагулантна профилактика и терапия на тромботичните усложнения преди операцията трябва да се заменят с нискомолекулярен хепарин (349). Ацетилсалициловата киселина трябва да се спре 8 – 10 дни предоперативно.

Нашето проучване доказва необходимостта от индивидуален подход и определяне на риска от тромботични усложнения в следоперативния период при пациентите след радикална простатектомия. От своя страна това изисква и индивидуален план за антикоагулантна терапия с оглед профилактика и намаляване честотата на тромбозата и лечение на свързания с нея белодробен тромбемболизъм (51). Изследването на хемостазните показатели на пациентите в следоперативния период след радикална простатектомия може да промени международния консенсус за продължителността и дозировката на антикоагулантната профилактика (242).

2. Ограничения на нашето проучване

1. Това са предварителни резултати. Няма категорично заключение за статистическа значимост по отношение стойностите на фибриногена, тазовата лимфна дисекция и възрастта.
2. Относително малък брой пациенти и като следствие на това вероятността да се установят случаи на венозни тромбоемболични усложнения е ограничена.
3. Не са включени пациенти с извършена лъче- и хормонална терапия 6 седмици следоперативно и затова те отпадат от проследяването.
4. Налице са и други лабораторни тестове, чрез които се определя коагулационната активност. Те не са изследвани в нашето проучване и не е търсена специфичната им свързаност с карцинома на простатата след радикална простатектомия.

VII. ИЗВОДИ

1. Преди операцията пациентите с карцином на простатата имат статистически значимо по-високи плазмени нива на Д-димер и фибриноген спрямо контролната група от пациенти с ДПХ, а нивата на АТ III са значимо по-ниски.
2. Д-димер и АТIII са с най-висока самостоятелна диагностична стойност от трите проследени хемостазни показатели при прогнозирането на тромботични усложнения при пациентите с карцином на простатата.
3. При пациентите с усложнения Д-димер нараства ускорено между 3-ти и 5-ти следоперативен ден. През този период той корелира значително с туморния стадий и Gleason Score. Между 3-ти и 5-ти следоперативен ден Д-димер достига висока чувствителност и специфичност (88 % и 87 % съответно), като оптималните диагностични прагове са между 3 - 5 $\mu\text{g/ml}$.
4. АТIII е със статистически значимо по-ниски нива при пациентите с настъпили тромботични усложнения, както предоперативно, така и на 1-ви, 5-ти и 30-ти следоперативен ден. Предоперативната и следоперативна корелация на 1-ви и 5-ти ден между АТ III и туморния стадий е висока. На 1-ия следоперативен ден АТ III демонстрира много висока чувствителност и специфичност като оптималните прагове са 84 % до 82 %.
5. Плазмените нива на фибриноген не са достатъчно добър самостоятелен предиктор за прогнозиране на тромботични усложнения при пациенти с простатен карцином. Той не корелира със стадия и диференциацията на карцинома на простатата.
6. Направеният съвкупен регресионен мултивариационен модел отличи 4 **САМОСТОЯТЕЛНИ** предиктора с ключово значение и най-висока прогностична стойност, чиято неблагоприятна комбинация профилира пациентите като високо рискови:
 - пациенти с повишен индекс на телесна маса (BMI)
 - пациенти с удължено времетраене на оперативната интервенция
 - АТ III със занижени нива под 85 % на 1-ия следоперативен ден
 - Д - димер със завишени нива на 3-ти следоперативен ден над 5 $\mu\text{g/ml}$. и на 5-ти следоперативен ден над 7 $\mu\text{g/ml}$.
7. Анализите чрез кривите на преживяемост на Каплан-Майер установиха:
 - при пациенти с АТIII под 80 % на 1-ия следоперативен ден най-рисков е периодът между 6-ти и 19-ти следоперативен ден и нараства от 10% до 55%

- при пациенти с Д - димер над 7 $\mu\text{g/ml}$. на 3-ти следоперативен ден най-рисков е периодът между 8-ми и 19-ти следоперативен ден и нараства от 25% до 80%

8. Делът на пациентите с тромботични усложнения нараства значимо в специфични подгрупи, които трябва да бъдат профилактирани с повишено внимание:

- при оперативни интервенции с продължителност над 240 минути – с 46,7 %

- при туморен стадий Т3-4 - 46,4 %

- при Gleason Score над 7 - 29,7 %

- при индекс на телесна маса (ВМІ) над 25 % - 23,8 %

- при възраст на пациента над 65 години - 17,8 %

9. При пациентите след радикална простатектомия са необходими индивидуален подход и индивидуално определяне на риска от венозни тромбоемболични усложнения в следоперативния период в зависимост от изследваните хемостазни маркери.

VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Изследват се стойностите на Д - димер, АТ III и фибриноген пред- и следоперативно с оглед определяне на специфично свързаната с карцинома на простатата хиперкоагулация и риска от развитието на следоперативен венозен тромбемболизъм (ВТЕ).
2. Потърсена е възможността за корелация между Д - димер, АТ III и фибриноген със стадия и агресивността на простатния карцином.
3. Установено е, че стойността на Д - димер над 5 $\mu\text{g/ml}$ на 3-ия следоперативен ден и напредналата възраст са независими рискови фактори за предсказване развитието на следоперативна венозна тромбоза.
4. Установено е, че праг на Д - димер над 7 $\mu\text{g/ml}$ на 5-ия следоперативен ден е съмнителен за венозна тромбоза и налага допълнителни диагностични изследвания.
5. Препоръчва се използването на Д - димер за дългосрочно проследяване на високорисковите пациенти с оглед развитие на ВТЕ.
6. За първи път в България се изследват хемостазни показатели като прогностични и рискови маркери при пациенти с карцином на простатата.

IX. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Дамянов, Хр., Табаков, В., Цингилев, В. - Простатният карцином в България, реалност и проблеми. Урология, 1997, 3(3):110-111.
2. Дильман, В.М. – Ендокринологическа онкология – М. Медицина, 1974.
3. Злобин, А. П., Черкасский, Л. А. – О генезе некоторых предраковых изменений в предстательной железе – Урол. и Нефрол., 1974, 4, 53-54.
4. Кобелев, А. А. – Хронический гранулематозный простатит и рас предстательной железы – Урол и Нефрол., 1974, 4, 54-55.
5. Кърджиев, Б., Горанов, Ив. – Съвременното състояние на проблема за етиологията и патогенезата на рака на простатата – Свр. Мед., 1959, 2, 3-15.
6. Маринбах, Е.Б. – Злокачественные опухоли предстательной железы – М. 1967.
7. Митров, Г. – Постижения и проблеми на българската онкология – Онкология, 1979, 4, 153-160.
8. Младенов, Д., Цветков, М., Куманов, Хр. - Плътност на простатния специфичен антиген (ППСА) при заболявания на простатната жлеза - Урология, 1997, 3, 4, 118-123.
9. Национален онкологичен център: Фактическа и стандартизирана заболяемост на най-честите злокачествени новообразования по пол за 1981-94г., Онкология, 1996, V, 33:13-55.
10. Овнатаян, К.Т. – Гипертрофия предстательной железы как предрак – Сб. научн. раб. по онколог. и гранич. Област, Баку, 1939, 59-75.
11. Пелова-Мъжлекова, Н. – Морфологични и отчасти хистохимични проучвания на хиперплазията на простатната жлеза. Значение на някои структурни промени за възникването на рака – Канд. Дис., С., 1967.
12. Пытель, А.Я. – Руководство по клинической урологии – М. 1970, 282-315.
13. Савинов, В.А., Петрова, И. В., Родюкова, Е. Н. – Профилактика, диагностика и лечение ауиммунных заболеваний и внутривичных иммунодефицитов – Новосибирск, 1985, 36-38.
14. Савинов, В.А., Табукин, И. С. – Фактори клеточного и туморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях – Челябинск, 1986, 144-145.
15. Синицин, Ф.И., 1884 г. (цитат по Н. Атанасов) - Аденом на простатната жлеза - Урология, София, Медицина и физкултура, 1979, 385-401.
16. Скобля, Е.С. – Ранная диагностика рака – Минск, 1975.
17. Цветков, М. – Карцином на простатната жлеза: проучвания на неговото развитие, диагностика, лечение и прогноза на авансиралите – София, Докт. Дисертация, 1998
18. Цветков, М., Младенов, Д. – Туморни маркери в урологията – Съвременна медицина, 1996, 67, 1, 20-23.
19. Цветков, М., Младенов, Д., Георгиев, М. – Ролята на простатния специфичен антиген (ПСА) като туморен маркер при карцинома на простатата – Андрология, 1995, 3, 34-38.
20. Цветкова, Т. – Клинично-лабораторни резултати – част 2, 401-461.
21. Червенаков, А., Викторов, Ив., Атанасов, Н., Карапандов, М., Патрашков, Т. – Ракът на простатната жлеза и неговото лечение – Конгрес на уролозите, Шчечин, Полша, Сборник резюмета, 1966, 103.

22. Шабад, Л.М. – Некоторые новые данные о патологической анатомии и генезе новообразовании предстательной железы – Труды 2-ри Всесоюз. Конф. Урол., 1954.
23. Abe, K, Shoji, M, Chen, J, et al Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96,8663-8668.
24. Aboulker, P. - Traitment du Cancer de la prostate. Faisonsle point immex. 1971, 1449 - 1452.
25. Aguilar, C.A., Martinez, A., Martinez, A., Del Rio, C., Vasquez, M., Rodriguez, F.J. – Diagnostic value of D-dimer in patients with moderate pretestprobability of deep venou thrombosis – Br. J. Haematol., 118, 275-277, 2002.
26. Ahluvalia, B., Jackson, M., Jones, G., Williams, A., Rao, M., Rajguru, S. - Blood hormone profiles in prostate cancer patients in high risk and low risk population. Cancer (Phila), 1981, 48, 2267 - 2273.
27. Akdas, A., Cevik, I., Tarcan, T. - The role of free prostate-specific antigen in the diagnosis of prostate cancer. – Br.J.Urol., 1997, 79, 6, 920-923.
28. Albaran, I., Halle, N. - Ann.mal orig.gin., 1900, 18.
29. Alving, B., Abeloff, M., Bell, W. - Spontaneous remission of recurring disseminated intravascular coagulation associated with prostatic carcinoma. Cancer, 1976, 37, 928 - 930.
30. Andriole, G.L., Smith, D.S., Rao, G., et al.: Early complications of contemporary anatomical radical retropubic prostatectomy. J Urol 1994; **152**: 1858-60.
31. Appel IM, Hop WC, van Kessel-Bakvis C, Stigter R, Pieters R. L-Asparaginase and the effect of age on coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Haemost.* 2008;100:330–337.
32. AUA Policy Statement:Early detection of prostate cancer and use of transrectal ultrasound American Urological Association 1992 Policy Statement Book. Baltimore, American Urological Association, 1992, p.420.
33. Aubert , J., Dore, B., Irani, J., Bon, D. - Cancer prostatiques et acetate de cyproterone. J. d'Urol., 1990, 96, 8, 431 - 435.
34. Baker EA, Leaper DJ, Hayter JP, Dickenson AJ. Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45:623–627.
35. Balogh, F., Szendroi, Z. - Cacer of the Prostatae. Budapest, 1968.
36. Bardos, H, Molnar, P, Csecsei, G, et al Fibrin deposition in primary and metastatic human brain tumours. Blood Coagul Fibrinolysis 1996;7,536-548.
37. Bazinet, M., Meshref, A.W., Trudel, C., Aronson, S., Peloquin, F., Nachabe, M., Begin, L.R., Elhilali, M.M. – Prospective evaluation of prostate specific antigen density and systematic biopsies for early detection of prostate cancer – Urology, 1994, 43, 44-51.
38. Becker, N. et al. – Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland – 2 Aufl. Heidelberg, Springer Verlag, 1984, 145-146.
39. Bell CR, Murdock PJ, Pasi KJ, Morgan RJ (1999) Thrombotic risk factors associated with transurethral prostatectomy. BJU Int 83: 984–989.
40. Benson, M.C., Whang, I.S., Pantuck, A., Ring, K., Kaplan, S.A., Olsson, C.A., Conner, W.H. – Prostate specific antigen density: a mean of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer – J. Urol., 1992, 147, 815-817.

41. Berutti, A., Bouvier, B. - Cancer de la prostate. *Encycl. Med. Chir.*, Paris, Rien, 1980, 18560 a 10, 2.
42. Bilhartz, D.L., Tindall, D.J., Oesterling, J.E. – Prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase: Biomolecular and physiologic characteristics – *Urology*, 1991, 38, 95-102.
43. Blacklock, N. J., Bouskill, K. - The zonal anatomy of the prostate in Man and in the Rhesus Monkey (*Mecaca Mulatta*)- *Urological Research*, 1977, 5,163.
44. Blackwell, K, Haroon, Z, Broadwater, G, et al Plasma D-dimer levels in operable breast cancer patients correlate with clinical stage and axillary lymph node status. *J Clin Oncol* 2000;18,600-608.
45. Blandy, J., Lytton, B. – What is the prostate and what is it for ? – In *The Prostate* (Blandy, J., Lytton, B., eds.) Butterworths, London, 1966, 1-11.
46. Blum, S, Issbrucker, K, Willuweit, A, et al An inhibitory role of the phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway in vascular endothelial growth factor-induced tissue factor expression. *J Biol Chem* 2001;276,33428-33434 – 38.
47. Bogatcheva, NV, Garcia, JG, Verin, AD Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67,75-84.
48. Bootle-Wilbraham, CA, Tazzyman, S, Marshall, JM, et al Fibrinogen E-fragment inhibits the migration and tubule formation of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *Cancer Res* 2000;60,4719-4724.
49. Bostwick, D.M., Brawer, M.K. - Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and early invasion in prostatic cancer. *Cancer*, 1987, 59, 114.
50. Boyle P, Maisonneuve P, Napalkov P. Geographic and temporal patterns of incidence and mortality from prostate cancer. *Urology* 46:47-55, 1995.
51. Bradley CT, Brasel KJ, Miller JJ et al. Cost-effectiveness of prolonged thromboprophylaxis after cancer surgery. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 31–39.
52. Brawer, M.K., M.P.Chetner, M.Beatie, D.M. Buchner, R.L.Vessela, P.H.Lange - Screening for prostate carcinoma with prostate specific antigen - *J.Urol.*, 1992, 147, 841-845.
53. Brawer, M.K., R.B.Schifman, F.R.Ahmann, M.D. Ahmann, K.Mcoulis - The effect of digital rectal examination on serum levels of prostatic-specific antigen - *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1988, 112, 1110.
54. Broghamer, W.L., McConnell, K.P., Blotsky, A.J. - Relationship between serum selenium levels and patients with carcinoma. *Cancer*, 1976, 37, 1384 - 1388.
55. Bromberg, ME, Konigsberg, WH, Madison, JF, et al Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92,8205-8209.
56. Bromberg, ME, Sundaram, R, Homer, RJ, et al Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost* 1999;82,88-92.
57. Brooks, PC, Stromblad, S, Sanders, LC, et al Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha\beta 3$. *Cell* 1996;85, 683-693.
58. Bruskewitz, R., Girman, C.J., Fowler, J., Rigby, O.F., Sullivan, M., Bracken, R.B., Fusilier, H.A., Kozlowski, D., Kantor, S.D., Johnson, E.L., Wang, D.Z., Waldstreicher, J. - Effect of finasteride on bother and other health-related quality of life aspects associated with benign prostatic hyperplasia - *Urology*, 1999, 54, 670-678.

59. Bugge, TH, Xiao, Q, Kombrinck, KW, et al Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93,6258-6263.
60. Byar, D.P. - VACURG studies on prostatic cancer and its treatment. In *urological pathology: The Prostate*. Ed. Tannenbaum M. Lea & Febiger. New York, 1977, 241.
61. Carmeliet, P, Ferreira, V, Breier, G, et al Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380, 435-439.
62. Carmeliet, P, Mackman, N, Moons, L, et al Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383, 73-75.
63. Catalona, W.J., D.S.Smith, J.L.Ratliff, K.M. Dodds, D.E.Coplein, J.J.J.Yuan, J.A.Petros, G.L.Andriole - Measurement of prostate specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer - *N.Engl.J.Med.*, 1991, 324, 1156-1161.
64. Catalona, W.J., Smith, D.S., Ornstein, D.K. - Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements - *JAMA.*, 1997, 14, 277, 18, 1452-1455.
65. Cavo, M, Zamagni, E, Cellini, C, et al Deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving first-line thalidomide-dexamethasone therapy. *Blood* 2002; 100, 2272-2273.
66. Chandler WL, Velan T. Plasmin generation and D-dimer formation during cardiopulmonary bypass - *Blood Coagulation & Fibrinolysis* – 2004, 15(7):583-591.
67. Chang WS, Wardell MR. et al. - Probing serpin reactive-loop conformations by proteolytic cleavage" - *Biochem. J.* – 1996, 314 (2): 647–653.
68. Chiarugi V, Ruggiero M, Magnelli L. Molecular polarity in endothelial cells and tumor-induced angiogenesis. *Oncol Res.* 2000;12:1–4.
69. Chojnowski K, Wawrzyniak E, Trelinski J, Niewiarowska J, Cierniewski C. Assessment of coagulation disorders in patients with acute leukemia before and after cytostatic treatment. *Leuk Lymphoma.* 1999;36:77–84.
70. Chowdhury, V., Lane, D.A., Mille, B., Auberger, K., Gandenberger, B.S., Pabinger, I., Olds, R.J. & Thein, S.L. - Homozygous antithrombin deficiency: report of two new cases (99 Leu to Phe) associated with arterial and venous thrombosis. - [Review]. *Thrombosis & Haemostasis*-1994, 72, 198-202.
71. Cisek, L., and Walsh, P.: Thromboembolic complications following radical retropubic prostatectomy. Influence of external sequential compression devices. *Urol* 1993; **42**: 406-408.
72. Clark, RA, Tonnesen, MG, Gailit, J, et al Transient functional expression of $\alpha V\beta 3$ on vascular cells during wound repair. *Am J Pathol* 1996;148, 1407-1421.
73. CLSI Document EP7-A2: Interference testing in clinical chemistry; approved guideline – Second edition, 25, 27, 2005.
74. Coffey, D.S. – The biochemistry and physiology of the prostate and seminal vesicles – In *Campbell's Urology* (4th ed.)(Walsh P.C. et al., eds.), W.B. Sanders, Philadelphia, 1978, 161-201.
75. Collen DJ, Schetz F. et al. - Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man: Effects of venous thrombosis of heparin administration - *Eur. J. Clin. Invest* – 1977, 7 (1): 27–35.
76. Collen, A, Smorenburg, SM, Peters, E, et al Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res* 2000; 60, 6196-6200.

77. Conard, J. – Hemostase et grossesse in “Manual d’hémostase” J.Sampol, D. Arnoux, B. Bouchiere – Paris, Elsevier, 551-563, 1995.
78. Conrad J, Brosstad M. et al. - Molar antithrombin concentration in normal human plasma - Haemostasis – 1983, 13 (6): 363–368.
79. Contrino, J, Goralnick, S, Qi, J, et al Fibrin induction of tissue factor expression in human vascular endothelial cells. *Circulation* 1997; 96, 605-613.
80. Contrino, J, Hair, G, Kreutzer, DL, et al In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2, 209-215.
81. Cooner, W.H. – Definition of the ideal tumour marker. *The urologic clinics of North America – Prostatic Tumour Markers*, 1993, 20, 4, 575-579.
82. Cooner, W.H., Mosley, B.R., Rutherford, C.L. et al. - Clinical application of transrectal ultrasonography and prostate specific antigen in the search for prostate cancer. *J. Urol.*, 1988, 139, 758.
83. Cooner, W.H., Mosley, L.R., Rutherford, C.J., Beard, G.H., Pond, M.S., Terry, W.H., Igel., T.C., Kidd, D.D. – Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen – *J.Urol.*, 1990, 143, 1146.
84. Coughlin, SR Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407, 258-264.
85. D’Andrea, MR, Derian, CK, Santulli, RJ, et al Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol* 2001; 158, 2031-2041.
86. Dallabrida, SM, De Sousa, MA, Farrell, DH Expression of antisense to integrin subunit $\beta 3$ inhibits microvascular endothelial cell capillary tube formation in fibrin. *J Biol Chem* 2000; 275, 32281-32288.
87. Damin DC, Rosito MA, Gus P, Roisemberg I, Bandinelli E, Schwartzmann G. Von Willebrand factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2002; 17:42–45.
88. Daniel, TO, Gibbs, VC, Milfay, DF, et al Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1986; 261, 9579-9582.
89. Degen, JL, Drew, AF, Palumbo, JS, et al Genetic manipulation of fibrinogen and fibrinolysis in mice. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936, 276-290.
90. Dejter, S.W., Martin, J.S., McPherson, R.A., Lynch, J.H. – Daily variability in human serum prostate specific antigen and prostatic acid phosphatase: a comparative evaluation – *Urology*, 1988, 32, 288.
91. Dirix LY, Salgado R, Weytjens R, Colpaert C, Benoy I, Huget P, et al. Plasma fibrin D-dimer levels correlate with tumour volume, progression rate and survival in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2002; 86:389-95.
92. Dodds, R., Barber, J., Weigel, J., Berdin, J. - Clotting predisposition in carcinoma of the prostate. *J. Urol.*, 1980, 123, 706 - 709.
93. Dvorak HF. Rous-Whipple award lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol.* 2003; 162: 1747–1757.
94. Dvorak, HF Tumors: wounds that do not heal; similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315, 1650-1659.

95. Dvorak, HF, Harvey, VS, Estrella, P, et al Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57, 673-686.
96. Dvorak, HF, Senger, DR, Dvorak, AM Fibrin as a component of the tumor stroma: origins and biological significance. *Cancer Metastasis Rev* 1983; 2, 41-73.
97. Edwards, L. - History of nonsurgical treatment. In: Hinman, F., ed. *Benign prostatic hypertrophy*. New York, Springer, 1983, 30 - 34.
98. Edwards, RL, Klaus, M, Matthews, E, et al Heparin abolishes the chemotherapy-induced increase in plasma fibrinopeptide A levels. *Am J Med* 1990; 89, 25-28.
99. Edwards, RL, Rickles, FR, Cronlund, M Abnormalities of blood coagulation in patients with cancer: mononuclear cell tissue factor generation. *J Lab Clin Med* 1981; 98, 917-928.
100. Edwards, RL, Rickles, FR, Moritz, TE, et al Abnormalities of blood coagulation tests in patients with cancer. *Am J Clin Pathol* 1987; 88, 596-602.
101. Eggebrecht H, et al. Value of plasma fibrin D-dimers for detection of acute aortic dissection - *Journal of the American College of Cardiology* – 2004, 44(4):804-809.
102. Eppert K, Wunder JS, Aneliunas V, Kandel R, Andrulis IL. von Willebrand factor expression in osteosarcoma metastasis. *Mod Pathol*. 2005; 18: 388–397.
103. Escudier, B, Lassau, N, Leborgne, S, et al Thalidomide and venous thrombosis [letter]. *Ann Intern Med* 2002; 136, 711.
104. Even-Ram, S, Uziely, B, Cohen, P, et al Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med* 1998; 4, 909-914.
105. Fagerhol, M.K., Abilgaard, U. – Immunological studies on human antithrombin III influence of age, sex and use of oral contraceptives on serum concentration – *Scand. J. Haematol.*, 1970, 7, 10-17.
106. Fair, W., Aprikian, A., Sogani, P., Reuter, V., Whitmore, W.F. - The role of neoadjuvant hormonal manipulation in localized prostatic cancer - *Cancer*, 1993, 71(suppl), 1031-1038.
107. Feng, X, Clark, RA, Galanakis, D, et al Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of $\alpha v/\beta 3$ mRNA by fibrin1. *J Invest Dermatol* 1999; 113, 913-919.
108. Fergusson, J.D. - Prostatic cancer (Some aspects of diagnosis). XVI *Congres de la Societe International d'Urologie*, Amsterdam, 1973, 1 - 6 Juillet . *Rapports - Tome 1*, Paris.
109. Fergusson, J.D., Henry, W.F. - Pituitary irradiation in advanced, carcinoma of the prostate: analysis of 100 cases. *Brit. J. Uiol* , 1971, 43, 5, 514 - 519.
110. Fernandez P, Patierno SR, Rickles FR. Tumor angiogenesis and blood coagulation. In: Lugassy G, Falanga A, Kakkar AJ, et al, eds. *Thrombosis and cancer*. London, UK: Martin Dunitz, 2003 (in press).
111. Fernandez, PM, Chou, DS, Aquilina, JW, et al Unfractionated heparin (UFH) and a low molecular weight heparin (dalteparin) exhibit antiangiogenic effects using in vitro, ex vivo, and in vivo angiogenesis models [abstract]. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2003; 44, 698.
112. Fernandez, PM, Rickles, FR Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* 2002; 9, 401-406.
113. Ferrara, N, Carver-Moore, K, Chen, H, et al Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;3 80, 439-442.

114. Flamant, R., Doyon, F., Rezvani, A. - Atlas de la mortalité par cancer en France (1971 - 1978). Collection "Statistiques de sante" - Editions Inserm.
115. Ford, T.F., Butcher, D.N., Maters, J.R., Parkinson, M.C. - Immunocytochemical localization of prostate specific antigen: Specificity and application to clinical practice - *Br.J.Urol.*, 1985, 57, 50-57.
116. Fornara, P. - Tumour markers in patients with carcinoma of the prostate - Pernic, 7-th Bulgarian-Bavarian symposium in urology, Abstracts, 1989, 27-29.
117. Francalanci, I., Comeglio, P., Alessandrello Liotta, A., Cellai, A.P., Fedi, S., Parretti, E. Mello, G., Prisco, D., Abbate, R. - D-dimer concentrations during normal pregnancy, as measured by ELISA - *Thromb. Res.*, 1995, 78, 5, 399-405.
118. Franks, L.M. - Etiology, epidemiology and pathology of prostatic cancer. *Cancer*, 1973, 32, 1092 - 1095.
119. Franzeck, U.K., Schalch, I., Jäger, K.A., et al.: Prospective 12 year follow up study of clinical and hemodynamic sequelae of deep vein thrombosis in low risk patients. *Circulation* 1996; 93: 74-9.
120. Friedman, Gr.D., Hiatt, R.A., Quesenberry, C.P., Selby, I.V. - Case-control study of screening for prostatic cancer by digital rectal examinations. *Lancet*, 1991, 337 (8756), 1526 - 1529.
121. Giansante, C., Fiotti, N., Cattin, L., Da Coll, P.G. - Fibrinogen, D-dimer and thrombin-antithrombin complexes in a random population sample: relationships with other cardiovascular risk factors - *Thromb. Haemostasis*, 1994, 71, 5, 581-586.
122. Gold, P., Freedman, S.O. - Demonstration of tumor antigen specific in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, 1965, 121, 439 - 441.
123. Golimbu, M., Morales, P., Al-Askari, S., Brown, J. - Extended pelvic lymphadenectomy for prostatic cancer. *J. Urol.*, 1979, 121, 617 - 620.
124. Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. Tissue factor is the receptor for plasminogen type 1 on L-LN human prostate cancer cells. *Blood*. 2002; 99: 4562-4567.
125. Grayhack, I., Wendel, E., Oliver, L., Lee, Ch. - Analysis of specific proreins in prostatic fluid for detecting prostatic malignancy. *J. Urol.*, 1979, 121, 295 - 299.
126. Green, D, Hull, RD, Brant, R, et al Lower mortality in cancer patients treated with low-molecular-weight versus standard heparin [letter]. *Lancet* 1992; 339, 1476.
127. Guan, M, Jin, J, Su, B, et al Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem* 2002; 35, 321-325.
128. Guan, M, Su, B, Lu, Y Quantitative reverse transcription-PCR measurement of tissue factor mRNA in glioma. *Mol Biotechnol* 2002; 20, 123-129.
129. Haese, A., Dworschack, R.T., Partin, A.W. - Percent free prostate specific antigen in the total prostate specific antigen 2 to 4 ng./ml. range does not substantially increase the number of biopsies needed to detect clinically significant prostate cancer compared to the 4 to 10 ng./ml. Range - *J.Urol.*, 2002, 168, 2, 504-508.
130. Hair, GA, Padula, S, Zeff, R, et al Tissue factor expression in human leukemic cells. *Leuk Res* 1996; 20, 1-11.

131. Hara, M., Innore, T., Fufuyama, T. – Some physicochemical characteristics of gamma-seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma – *Jap.J.LegalMed.*, 1971, 25, 322.
132. Hara, M., Inoue, T., Koyanagi, Y., Goto, J., Yamazaki, H., Fukuyama, T. - Preparation and immunoelectrophoretic assessment of antisera to human seminal plasma. *Jpn. J. Legal Med.*, 1966, 20, 356 - 362.
133. Haralabopoulos, GC, Grant, DS, Kleinman, HK, et al Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol* 1997; 273, C239-C245.
134. Harvey SR, Hurd TC, Markus G, Martinick MI, Penetrante RM, Tan D, et al. Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4935–4943.
135. Hattori, R, Hamilton, KK, Fugate, RD, et al Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 1989; 264, 7768-7771.
136. Haubold K, Rink M, Spath B, Friedrich M, Chun FK, et al. (2009) Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with earlystage prostate cancer. *Thromb Haemost* 101: 1147–1155.
137. Heath EI, Burtness BA, Kleinberg L, Salem RR, Yang SC, Heitmiller RF, et al. Phase II, parallel-design study of preoperative combined modality therapy and the matrix metalloprotease (mmp) inhibitor prinomastat in patients with esophageal adenocarcinoma. *Invest New Drugs.* 2006; 24: 135–140.
138. Heinzer, H., Hammerer, P., Graefen, M. et al.: Thromboembolic complication rate after radical retropubic prostatectomy. Impact of routine ultrasonography for the detection of pelvic lymphocele and hematomas. *Eur Urol* 1998; 33: 86-90.
139. Henn, V, Slupsky, JR, Grafe, M, et al CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391, 591-594.
140. Herbert, J., Birkhoff, I., Feorino, P., Caldwell, G. - Herpes simplex virus type 2 and cancer of the prostate. *J.Urol.* , 1976, 116, 611 - 612.
141. Hermann, Eds.P., Sobin, L.H. - TNM classification of malignat tumours. UICC. Fourth fully revised edition. Berlin, Ney York, London, Paris, Tokyo, Springer Verlag, 1987, 198.
142. Hill, C. et al. – Evolution de la mortalite par cancer de 1950 a 1985 – France, Statistique de Sante (Monogr.), INSERM, 1989, 168-173.
143. Hill, P., Wynder, E., Gorbaczewski, L., Walker, A. - Effect of diet on plasma and urinary hormones in South african blac man with prostate cancer. *Cancer Res.* , 1982, 42, 3864 - 3869.
144. Hochberg, D.A., Armenkas, N.A., Fracchia, J.A. – Relationship of prostate-specific antigen and prostate volume in patients with biopsy proven benign prostatic hyperplasia – *Prostate*, 2000, 45, 4, 315-319.
145. Holman, C., James, J., Segal, M., Armstrong, B. - Recent trends in mortality from prostate cancer in male populations of Australia, England and Wales. *Br. J. Cancer*, 1981, 44, 340 - 348.
146. Homonnai, Z.T. – The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality – *Fertil. Steril.* 1979, 29, 539-542.
147. Hryntschak, T. - Die Hypertrophie und das carcinoma der prostata. Diagnostik und therapie fur die praxis. Wien, 1951.

148. Hu, Z, Garen, A Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98, 12180-12185.
149. Hu, Z, Sun, Y, Garen, A Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96, 8161-8166.
150. Huang SF, Kim SJ, Lee AT, Karashima T, Bucana C, Kedar D, et al. Inhibition of growth and metastasis of orthotopic human prostate cancer in athymic mice by combination therapy with pegylated interferon-alpha-2b and docetaxel. *Cancer Res.* 2002; 62: 5720–5726.
151. Huang, X, Molema, G, King, S, et al Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 1997; 275, 547-550.
152. Huang, YQ, Li, JJ, Hu, L, et al Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes. *Thromb Haemost* 2001; 86, 1094-1098.
153. Huang, YQ, Li, JJ, Hu, L, et al Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 2002; 99, 1646-1650.
154. Hughes, PE, Pfaff, M Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol* 1998; 8, 359-364.
155. Hull, RD, Raskob, GE, Pineo, GF, et al Subcutaneous low-molecular-weight heparin compared with continuous intravenous heparin in the treatment of proximal-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1992; 326, 975-982.
156. Hunter, J. - In *Observation on Certain Parts of the Animal Oeconomy* (1st ed.) - Biblioteche Osteriana, London, 1786, 38-39.
157. Igawa, Y., Andersson, K.E., Post, C., Uvelius, B., Mattiasson, A. – A rat model for investigation of spinal mechanisms in detrusor instability associated with infravesical outflow obstruction – *Urol. Res.*, 1993, 21, 239-244.
158. Ishizuka, O., Persson, K., Mattiasson, A., Naylor, A.M., Wyllie, M.G., Andersson, K.E. – Micturition in conscious rats with and without bladder outlet obstruction: role of spinal alpha-adrenoreceptors – *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 117, 962-966.
159. Iversen, P., Wolf, H. - Carcinoma of the prostate. Views and recommendations. *Scand. J. Urol. and Nephrol.*, 1991, 25, 139, 5 - 9.
160. Jobsis, A., De Vries, G., Anholt, R., Sanders, G. - Demonstration of the prostatic origin of metastases. *Cancer*, 1978, 41, 1788 - 1793.
161. Küss, R. - 130000 cancers de la prostate par an en France: un certain flottement therapeutique. Aux seminaires d'uronephrologie de la Pitie-Salpetriere. Paris, 1976, 26-28.
162. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, Lemoine NR, Low V, Patel HK, et al. Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol.* 2004; 22: 1944–1948.
163. Kakkar, AK, Chinswangwatanakul, V, Lemoine, NR, et al Role of tissue factor expression on tumour cell invasion and growth of experimental pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 1999; 86, 890-894.
164. Kakkar, AK, Lemoine, NR, Scully, MF, et al Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg* 1995; 82, 1101-1104.
165. Kakkar, V.: The diagnosis of deep vein thrombosis using the 125I fibrinogen test. *Arch Surg* 1972; 104: 152-9.

166. Kane, R.D., Paulson, D.F. - CEA as an adjunct to determination of clinical stage in prostate cancer. *Nate. Cancer Institution*, 1978, 49, 231 - 233.
167. Kataoka, H, Uchino, H, Asada, Y, et al Analysis of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor expression in human colorectal carcinoma cell lines and metastatic sublines to the liver. *Int J Cancer* 1997; 72, 878-884.
168. Kaushal, V, Kohli, M, Zangari, M, et al Endothelial dysfunction in antiangiogenesis-associated thrombosis [letter]. *J Clin Oncol* 2002; 20, 3042 –3043.
169. Kim HK, Song KS, Lee KR, Kang YH, Lee YJ, Lee ES. Comparison of plasma D-dimer and thrombus precursor protein in patients with operable breast cancer as a potential predictor of lymph node metastasis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15: 9–13.
170. Kim, I, Oh, JL, Ryu, YS, et al Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells. *FASEB J* 2002; 16, 126-128.
171. Klein, E.A., Gerlach, R.W. - Prostate examinations are over looked. *Cleve. Clin. J. Med.*, 1991, 58, 1, 51.
172. Koomagi, R, Volm, M Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer* 1998; 79, 19-22.
173. Koopman J, Haverkate F, Koppert P, Neuwennhuizen W, et al. - New enzyme immunoassay of fibrin-fibrinogen degradation products in plasma using a monoclonal antibody - *J Lab Clin Med* - 1978; 109: 75–84.
174. Kruip MJ, et al. Diagnostic strategies for excluding pulmonary embolism in clinical outcome studies: A systematic review - *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138 (12) 941-951.
175. Kuenen BC, Levi M, Meijers JC, Kakkar AK, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, et al. Analysis of coagulation cascade and endothelial cell activation during inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor pathway in cancer patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 1500–1505.
176. Kuenen, BC, Rosen, L, Smit, EF, et al Dose-finding and pharmacokinetic study of cisplatin, gemcitabine, and SU5416 in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* 2002; 20, 1657-1667.
177. Kulstad, E.B., Kulstad, C.E., Lovell, E.O. – A rapid quantitative turbidimetric D-dimer assay has high sensitivity for detection of pulmonary embolism in the ED – *Am. J. of emergency medicine*, 22, 2, 111-114, 2004.
178. Kuriyama, M., Wang M.C., Papsidero, L.D., Killian, C.S., Shimano, T., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M. – Quantitation of prostate specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay – *Cancer Res.*, 1980, 40, 4658.
179. Kvist, U. – Reversible inhibition of nuclear chromatin decondensation (NCD)ability of human spermatozoa induced by prostatic fluid – *Acta Physiol. Scand.*, 1980, 109, 73-78.
180. Kvolik S, Glavas-Obrovac L, Bares V, Karner I. Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. *Life Sci*. 2005; 77: 2369–2383.
181. Kvolik, S., Jukic, M., Matijevic, M., Marjanovic, K., Glavas-Obrovac, L. – An overview of coagulation disorders in cancer patients – *Surgical Oncology*, 2010, 19, 33-46.
182. Labat-Robert, J., Birembaut, P., Robert, L., Adnet, J. - Modification of fibronectin distribution pattern in solid human tumors. *Diagn. Histopathol.* , 1981, 4, 299 - 306.
183. Labrie, F., A.Dupont, R.Suburu, L.Cusan, M.Trmbley, J.Gomez, J.Edmond - Serum prostate specific antigen as a screening test for prostate cancer - *J.Urol.*, 1992, 147, 846-851.

184. Lalla, RV, Goralnick, SJ, Tanzer, ML, et al Fibrin induces IL-8 expression from human oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol* 2001; 37, 234-242.
185. Lamrez. R. – Clinical relevance of tumour markers – *Wien Klin. Wochenschr.*, 1989, 101, 464-472.
186. Lane, D.A., Olds, R.J., Boisclair, V., Chowdhury, V., Thein, S.L., Cooper, D.N., Blajchman, M., Perry, D.J., Emmerich, J. & Aiach, M. - Antithrombin III Mutation Database: First Update. - *Thrombosis And Haemostasis* – 1993, 70, 361-369.
187. Lane, D.A., Olds, R.J., Conard, J., Boisclair, M., Bock, S.C., Hultin, M., Abildgaard, A., Ireland, H., Thompson, E., Sas, G., Horellou, M.H., Tamponi, G. & Thein, S.-L - Pleiotropic Effects of Antithrombin Strand 1C Substitution Mutations - *Journal Of Clinical Investigation* – 1993, 90, 2422-2433.
188. Lange, P.H., C.J.Ercole, D.J.Lightner, E.E. Fraley, R.Vessella - The value of serum prostate specific antigen determination before and after radical prostatectomy - *J.Urol*, 1989, 141, 873-879.
189. Lange, P.H., Reddy, P. K. - Technical nuances and surgical results of radikal retropubic prostatectomy in 150 patients. *J.Urol.*, 1987, 138, 2, 347 - 352.
190. Langer F, Chun FK, Amirkhosravi A, Friedrich M, Leuenroth S, et al. (2007) Plasma tissue factor antigen in localized prostate cancer: distribution, clinical significance and correlation with haemostatic activation markers. *Thromb Haemost* 97: 464–470.
191. Laurell, C.B. - Antigen-Antibody crossed electrophoresis. *Analytical Biochemistry* – 1965, 10, 358-361.
192. Laurell, C.B. - Electroimmunoassay. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* – 1972, 125, 21-37.
193. Laurell, C.B. - Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analytical Biochemistry* – 1966, 15, 45-52.
194. Leandri, P., Rossignol, G., Gautier, J.R., et al.: Radical retropubic prostatectomy: morbidity and quality of life experience with 620 consecutive cases. *J Urol* 1992; 147: 883-7.
195. Lecourvoisier, C., Toulon, P. – Interet du dosage des D-dimeres dans le diagnostic d'exclusion de l'embolie pulmonaire – *Ann. Biol. Clin.*, 59, 6, 693-700, 2001.
196. Leibovitch, I., Foster, R.S., Wass, J.L., et al.: Color Doppler flow imaging for deep venous thrombosis screening in patients undergoing pelvic lymphadenectomy and radical retropubic prostatectomy for prostatic carcinoma. *J Urol* 1995; 153: 1866-9.
197. Lensing, AW, Prins, MH, Davidson, BL, et al Treatment of deep venous thrombosis with low-molecular-weight heparins: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 1995; 155, 601-607.
198. Levitan, N, Dowlati, A, Remick, SC, et al Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy: risk analysis using Medicare claims data. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78, 285-291.
199. Li, T.S., Beling, C.G. – Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma – *Fertil.Steril.*, 1973, 24, 134.
200. Lightman, A., Brandes, J.M., Binur, N. et al. - Use of serum copper/zinc ratio in the differential diagnosis of ovarian malignancy. *Clin. Chem.*, 1986, 32, 1, 101 - 104.
201. Lilja, H. – A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein – *J.Clin.Invest.*, 1985, 76, 1989.

202. Luboldt, H.J., Swoboda, A., Borgermann, C. - Clinical usefulness of free PSA in early detection of prostate cancer - *Onkologie*, 2001, 24, 1, 33-37.
203. Lundwall, A., Lilja, H. – Molecular cloning of human prostate specific antigen with cDNA – *FEBS Letters*, 1987, 214, 317.
204. Lwaleed, BA, Cooper, AJ Tissue factor expression and multidrug resistance in cancer: two aspects of a common cellular response to a hostile milieu. *Med Hypotheses* 2000; 55, 470-473.
205. Maatman, T.J. – The role of prostate specific antigen as a tumour marker in men with advanced adenocarcinoma of the prostate – *J.Urol.*, 1989, 141, 1378.
206. Mahe I, et al. D-dimer can predict survival in patients with chronic atrial fibrillation - *Blood Coagulation & Fibrinolysis* -2004, 15(5):413-417.
207. Maloney, JP, Silliman, CC, Ambruso, DR, et al In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998; 275, H1054-H1061.
208. Mannucci PM, Karimi M, Mosalaei A, Canciani MT, Peyvandi F. Patients with localized and disseminated tumors have reduced but measurable levels of ADAMTS-13 (von Willebrand factor cleaving protease). *Haematologica*. 2003; 88: 454–458.
209. Maragoudakis, ME, Kraniti, N, Giannopoulou, E, et al Modulation of angiogenesis and progelatinase a by thrombin receptor mimetics and antagonists. *Endothelium* 2001; 8, 195-205.
210. Maragoudakis, ME, Tsopanoglou, NE, Andriopoulou, P Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 2002; 30, 173-177.
211. Martinez, J, Ferber, A, Bach, TL, et al Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936, 386-405.
212. Martinez-Pineiro, L., Garcia Mediero, J.M., Gonzalez, Gancedo. P. - Probability of prostate cancer as a function of the percentage of free prostate-specific antigen in patients with a non-suspicious rectal examination and total prostate-specific antigen of 4-10 ng/ml. -*World J.Urol.*, 2004, 22, 2, 124-131.
213. Marx, GM, Steer, CB, Harper, P, et al Unexpected serious toxicity with chemotherapy and antiangiogenic combinations: time to take stock! *J Clin Oncol* 2002; 20, 1446-1448.
214. McNeal, J.E. – The zonal anatomy of the prostate – *Prostate*, 1981, 2, 35-49.
215. McNeal, J.E., Villers, A. A., Redwine, E.A., Freiha, F.S., Stamey, T.A., - Capsular penetration in prostate cancer. Significance for natural history and treatment *AM. J.Surg.*, 1990, 14, 240.
216. Medved, L, Tsurupa, G, Yakovlev, S Conformational changes upon conversion of fibrinogen into fibrin: the mechanisms of exposure of cryptic sites. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936, 185-204.
217. Meigs JB, Mohr B, Barry MJ, Collins MM, McKinlay JB. - Risk factors for clinical benign prostatic hyperplasia in a community-based population of healthy aging men - *J Clin Epidemiol* 2001; 54: 935-944.
218. Mettlin, C., G. Jones, H. Averette, S. B. Gusberg, G. P Murphy - Defining and updating the American Cancer Society guidelines for the cancer-related checkup: Prostate and endometrial cancers - *CA, Cancer J.Clin.*, 1993, 43, 42-46.
219. Miesbach W, Scharrer I, Asherson R. Thrombotic manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with malignancies. *Clin Rheumatol*. 2006; 25: 840–844.
220. Miles, B.J. - Screening for adenocarcinoma of the prostate. *Henry Ford Hosp. Med. J.*, 1989, 37, 1, 5 - 7.

221. Mochtar, C.A., Kiemeney, L.A.L.M., van Riemsdijk, M.M., Barnett, G.S., Laguna, M.P., Debruyne, F.M.J., de al Rosette, J.J.M.C.H. – Prostate specific antigen as an estimator of prostate volume in the management of patients with symptomatic benign prostatic hyperplasia – *Eur. Urol.*, 2003, 44, 695-700.
222. Mohle, R, Green, D, Moore, MA, et al Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94, 663-668.
223. Monreal M, Trujillo-Santos J. Screening for occult cancer in patients with acute venous thromboembolism. *Curr Opin Pulm Med.* 2007; 13: 368–371.
224. Morgagni, G.B. - The seats and causes of disease investigated by anatomy - Johnson and Payne, London, 1760, 3, 460.
225. Morganstern, S., Seery, W., Khashu, B., Cole, A. - Large prostatic hematoma associated with carcinoma of the prostate. *J. Urol.*, 1977, 117, 622 - 623.
226. Morote, J., Trilla, E., Esquena, S. - The percentage of free prostatic-specific antigen is also useful in men with normal digital rectal examination and serum prostatic-specific antigen between 10.1 and 20 ng/ml. – *Eur.Urol.*, 2002, 42, 4, 333-337.
227. Moskovitz, B.S., Nitecki, S., Levin, D.R. – Cancer of the prostate: is there a need for aggressive treatment – *Urol.Intern.*, 1987, 42, 1, 49-52.
228. Mostofi, F.K. - Pathologic anatomy of carcinoma of prostate. International Meeting on Hormonal Therapy of Prostatic Cancer. Rome (Italy), 1975.
229. Mourey, L., Samama, J.-P., Delarue, M., Petitou, M., Choay, J. & Moras, D. - Crystal Structure of Cleaved Bovine Antithrombin III at 3.2Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* – 1993, 232, 223-241.
230. Mousa, SA Anticoagulants in thrombosis and cancer: the missing link. *Semin Thromb Haemost* 2002; 28, 45-52.
231. Mueller, BM, Reisfeld, RA, Edgington, TS, et al Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89, 11832-11836.
232. Mueller, BM, Ruf, W Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998; 101, 1372-1378.
233. Murphy, G.P. – Markers of prostatic carcinoma – *Arch.Surg.*, 1991, 124, 1404.
234. Myers, TJ, Rickles, FR, Barb, C, et al Fibrinopeptide A in acute leukemia: relationship of activation of blood coagulation to disease activity. *Blood* 1981; 57, 518-525.
235. Nadji, M., Tabei, S.Z., Castro, A., Chu, T.M., Murphy, G.P., Wang, M.C., Morales, A.R. – Prostate specific antigen: An immunohistologic marker for prostatic neoplasms – *Cancer*, 1981, 1229-1232.
236. Nagy, JA, Brown, LF, Senger, DR, et al Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* 1989; 948, 305-326.
237. Nakasaki, T, Wada, H, Shigemori, C, et al Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; 69, 247-254.
238. Nakashima J, Tachibana M, Ueno M, Baba S, Tazaki H. Tumor necrosis factor and coagulopathy in patients with prostate cancer. *Cancer Res.* 1995; 55: 4881–4885.

239. Narayana, A.S., Paul, D.B., Loening, S.A. - Pelvic lymphadenectomy for carcinoma of prostate. *Urology*, 1985, 26, 2, 109 - 111.
240. NCCLS Document H21-A5, vol.28 No.5. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays, approved guideline-5th edition, 2008.
241. NCCLS Document H3-A5, vol 23, No.32. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture, approved standard, 5th ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.
242. Nicolaides, A.N., Breddin, H.K., Fareed, J., et al.: Prevention of venous thromboembolism. International consensus statement. *J Vasc Biol* 2002; 1: 133-70.
243. Nierodzik, ML, Chen, K, Takeshita, K, et al Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood* 1998; 92, 3694-3700.
244. Nierodzik, ML, Kajumo, F, Karpatkin, S Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res* 1992; 52, 3267-3272.
245. Nierodzik, ML, Plotkin, A, Kajumo, F, et al Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *J Clin Invest* 1991; 87, 229-236.
246. Nijziel MR, van Oerle R, Christella M, Thomassen LG, van Pampus EC, Hamulyak K, et al. Acquired resistance to activated protein C in breast cancer patients. *Br J Haematol.* 2003; 120: 117–122.
247. Nijziel MR, van Oerle R, van Pampus EC, de Vet HC, Hillen HF, Hamulyak K. Increased D-dimer levels correlate with binding of activated protein C, but not tissue factor expression, on peripheral blood monocytes in cancer patients. *Am J Hematol.* 2000; 64: 282–286.
248. Nilsson, F, Kosmehl, H, Zardi, L, et al Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res* 2001; 61, 711-716.
249. Norrby, K, Ostergaard, P Basic-fibroblast-growth-factor-mediated de novo angiogenesis is more effectively suppressed by low-molecular-weight than by high-molecular-weight heparin. *Int J Microcirc Clin Exp* 1996; 16, 8-15.
250. Ochiai, A., Fritsche, H.A., Babaian, R.J. – Influence of anthropometric measurements, age and prostate volume on prostate-specific antigen levels in men with a low risk of prostate cancer – *Urology*, 2005, 66, 4, 819-823.
251. Odegard, O.R., Lie, M., Abildgaard, U. – Heparin cofactor activity measured with an amidolytic method – *Thromb. Res.*, 6, 287-294, 1975.
252. Oesterling, J.E., S.J.Jacobsen, C.E.Chute, H.A.Guess, G.J.Girman, L.A.Panser, M.M.Lieber - Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: Establishment of age-specific reference ranges - *JAMA*, 1993, 270, 860-864.
253. Oger, E., Leroyer, C., Bressollette, L., Monent, M., Le Moigne, E., Bizais, Y., Amiral, J., Grimaux, M., Clavier, J., Ill, P., Abgrall, J.F., Mottier, D. – Evaluation of a new, rapid and quantitative D-dimer test in patients with suspected pulmonary embolism – *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 158, 1-6, 1998.
254. Ohtsuki, I., Seman, G., Marujama, K., Bowen, J., Johnson, D., Duchowsky, L. - Ultrastructural studies of human prostatic neoplasia. *Cancer*, 1976, 37, 2295 - 2305.

255. Olds, R.J., Lane, D.A. & Thein, S.L. - The Molecular Genetics of Antithrombin Deficiency. *Br J Haem* – 1994, 87, 221-226.
256. Ollivier, V, Bentolila, S, Chabbat, J, et al Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 1998; 91, 2698-2703.
257. Ollivier, V, Chabbat, J, Herbert, JM, et al Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20, 1374-1381.
258. Osman, K, Comenzo, R, Rajkumar, SV Deep venous thrombosis and thalidomide therapy for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2001; 344, 1951-1952.
259. Ott, I, Fischer, EG, Miyagi, Y, et al - A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. - *J Cell Biol* - 1998;140,1241-1253.
260. Oya M, Akiyama Y, Yanagida T, Akao S, Ishikawa H. Plasma D-dimer level in patients with colorectal cancer: its role as a tumor marker. *Surg Today*. 1998; 28: 373–378.
261. Ozturk M, Sengul N, Dagli M, Kosar A, Bavbek N. Global fibrinolytic capacity in colorectal cancer: a new clue to occult fibrinolysis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2003; 9: 151–154.
262. Palumbo, JS, Degen, JL Fibrinogen and tumor cell metastasis. *Haemostasis* 2001; 31(suppl 1), 11-15.
263. Palumbo, JS, Kombrinck, KW, Drew, AF, et al Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000; 96, 3302-3309.
264. Papadimitriou, E, Manolopoulos, VG, Hayman, GT, et al Thrombin modulates vectorial secretion of extracellular matrix proteins in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 272, C1112-C1122.
265. Papsidero, L.D., Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M. – A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients – *Cancer Res.*, 1980, 40, 2428.
266. Partin, A.W., Carter, A.B., Chan, W.A., Epstein, J.I., Oesterling, J.E., Rock, R.C., Weber, J.P., Walsh, P.C. – PSA in the staging of localized prostate cancer. – *J.Urol.*, 1990, 143, 747.
267. Pedersen, K.W., Carlsson, P., Varenhorst, E., Lofman, O., Bergland, K. - Screening for carcinoma of the prostate by digital rectal examination in a randomly selected population. *Br. Med. J.* , 1990, 300, 1041 - 1044.
268. Peppelenbosch, MP, Versteeg, HH Cell biology of tissue factor, an unusual member of the cytokine receptor family. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11, 335-339.
269. Perry, D.J. - Antithrombin and its Inherited Deficiencies. *Blood Reviews* – 1994, 8, 37-55.
270. Piccioli A, Lensing AW, Prins MH, Falanga A, Scannapieco GL, Ieran M, et al. SOMIT investigators group. Extensive screening for occult malignant disease in idiopathic venous thromboembolism: a prospective randomized clinical trial. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 884–889.
271. Prandoni, P, Lensing, AW, Buller, HR, et al Comparison of subcutaneous low-molecular-weight heparin with intravenous standard heparin in proximal deep-vein thrombosis. *Lancet* 1992; 339, 441-445.
272. Prandoni, P, Lensing, AW, Buller, HR, et al Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med* 1992; 327, 1128-1133.

273. Prandoni, P, Lensing, AW, Piccioli, A, et al Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 2002; 100, 3484-3488.
274. Prandoni, P., Lensing, A.W., Cogo, A., et al.: The long term clinical course of acute deep vein thrombosis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 1-7.
275. Rathbun, S.W., Whitsett, T.L., Raskob, G.E. – Negative D-dimer result to exclude recurrent deep venous thrombosis: a management trial – *Ann. Intern. Med.*, 141, 11, 839-846, 2004.
276. Recker, F., Kwiatkowski, M.K., Piironen, T. - Free-to-total prostate-specific antigen (PSA) ratio improves the specificity for detecting prostate cancer in patients with prostatism and intermediate PSA levels – *Br.J.Urol.*, 1998, 81, 4, 532-538.
277. Reissigl, A., Klocker, H., Pointner, J. - Usefulness of the ratio free/total prostate-specific antigen in addition to total PSA levels in prostate cancer screening - *Urology.*, 1996, 48, 6A Suppl, 62-66.
278. Richard, DE, Vouret-Craviari, V, Pouyssegur, J Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. *Oncogene* 2001; 20, 1556-1562.
279. Rickles, F.R., Patierno, S., Fernandez, P. - Tissue Factor, Thrombin, and Cancer* .
280. Rickles, FR, Falanga, A Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res* 2001; 102, V215-V224.
281. Rickles, FR, Levine, M, Dvorak, HB Abnormalities of hemostasis in malignancy. Colman, RW Hirsh, J Marder, VJet al eds. *Hemostasis and thrombosis.* 2000,1132-1152 Lippincott, Williams & Wilkins. Philadelphia.
282. Rickles, FR, Levine, M, Edwards, RL Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11, 237-248.
283. Rickles, FR, Levine, MN Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol* 2001; 106, 6-12.
284. Rickles, FR, Shoji, M, Abe, K The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol* 2001; 73, 145-150.
285. Riegman, P.H.J., Klaasen, P., van der Koper, J.A.J.M., Romijn, J.C., Trapman, J. – Molecular cloning and characterization of novel prostate specific antigen with cDNA's – *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1988, 155, 181.
286. Robel, P. – La creation de l'Association pour la recherche sur les tumeurs de la prostate – *Prostate Tumeurs (Paris)*, 1988, 1, 1.
287. Roehrborn, C.G., Boyle, P., Gould, A.L., Waldstreicher, J. – Serum prostate-specific antigen as a predictor of prostate volume in men with benign prostatic hyperplasia – *Urology*, 1999, 53, 581-589.
288. Roehrborn, C.G., McConnell, J.D., Bonilla, J., Rosenblatt, S., Hudson, P.B., Malek, G.H. et al. – Serum prostate-specific antigen is a strong predictor of future prostate growth in men with benign prostatic hyperplasia - *J. Urol.*, 2000, 163, 13-20.
289. Rubin., Ph. - Cancer of the Urogenital Tract: Prostate Cancer. *JAMA*, 1969, 210, 2, 322 - 323.
290. Sahni, A, Baker, CA, Sporn, LA, et al Fibrinogen and fibrin protect fibroblast growth factor-2 from proteolytic degradation. *Thromb Haemost* 2000; 83, 736-741.

291. Sahni, A, Francis, CW Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 2000; 96, 3772-3778.
292. Sahni, A, Sporn, LA, Francis, CW Potentiation of endothelial cell proliferation by fibrin(ogen)-bound fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 1999; 274, 14936-14941.
293. Sallah S, Wan JY. Inhibitors against factor VIII in patients with cancer. Analysis of 41 patients. *Cancer*. 2001; 91, 1067–1074.
294. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008; 26, 2013–2019.
295. Samama, M., Conard, J., Horellou, , M.H. – Physiologie et exploration de l'hémostase – Paris, 165-168, 1990.
296. Sanford, E., Bowditch, R.R., Rohner, T.J., Bardin, C.W. - Treatment of advanced prostatic cancer with flutamide. *Pa Med.*, 1979, 82, 29 - 31.
297. Sawada, M, Miyake, S, Ohdama, S, et al Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *Br J Cancer* 1999; 79, 472-477.
298. Schedlich, L.J., Bennetts, B.H., Morris, B.J. – Primary structure of a human glandular kalikrein gene – DNA, 1987, 6, 429.
299. Schröder FH, Boyle P. Screening for prostate cancer--necessity or nonsense? *Eur J Cancer* 1993, 29A: 656-661.
300. Schulman S, Lindmarker P. Incidence of cancer after prophylaxis with warfarin against recurrent venous thromboembolism. Duration of anticoagulation trial. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1953–1958.
301. Seegers WH, Johnson JF, Fell C. - An antithrombin reaction to prothrombin activation - *Am. J. Physiol.* – 1954, 176 (1): 97–103.
302. Sensbaugh, G.F. – Isolation and characterization of a semen specific protein of human seminal plasma – *J.Forensic.Sci.*, 1978, 23, 106.
303. Seto, S, Onodera, H, Kaido, T, et al Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 2000 ;88, 295-301.
304. Shigemori, C, Wada, H, Matsumoto, K, et al Tissue factor expression and metastatic potential of colorectal cancer. *Thromb Haemost* 1998; 80, 894-898.
305. Shilon Y, et al. A rapid quantitative D-dimer assay at admission correlates with the severity of community acquired pneumonia - *Blood Coagulation & Fibrinolysis* – 2003, 14 (8): 745-748.
306. Shitrit D, et al. Prognostic value of a new quantitative D-dimer test in critically ill patients 24 and 48 h following admission to the intensive care unit - *Blood Coagulation & Fibrinolysis* – 2004, 15(1): 15-19.
307. Shoji, M, Abe, K, Nawroth, PP, et al Molecular mechanisms linking thrombosis and angiogenesis in cancer. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7, 52-59.
308. Shoji, M, Hancock, WW, Abe, K, et al Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol* 1998; 152, 399-411.
309. Siddall, J.K., Cooper, E.H., Newling, D.W.W., Robinson, M.R.G., Whelan, P. - An evaluation of the immunochemical measurement of prostatic acid phosphatase and prostatic specific antigen in carcinoma of the prostate. *Eur. Urol.*, 1986, 12, 123 - 130.

310. Smorenburg, SM, Hettiarachchi, RJ, Vink, R, et al The effects of unfractionated heparin on survival in patients with malignancy: a systematic review. *Thromb Haemost* 1999; 82, 1600-1604.
311. Stamey, T.A. - Prostate-specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate - *Monogr.Urol.*, 1989, 10, 49-64.
312. Stamey, T.A., N.Wang, A.R.Hay, J.E.McNeal, F.S.Freiha, E.Redwine - Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate - *N.Engl.J.Med.*, 1987, 317, 909-916.
313. Starling, J., Sieg, S., Beckertt, M., Schellhaunner, P., Ladaga, L., Wright, G. - Monoclonal antibodies to human prostate and bladder tumor associated antigens. *Cancer Res.*, 1982, 42, 3084 - 3089.
314. Stein, B.S., S.Vangore, R.O.Peterson, A.L. Kendall - Immunoperoxidase localization of prostate specific antigen - *Am.J.Surg.Pathol.*, 1982, 6, 553-557.
315. Steinberg, G.D., Carter, B.S., Beaty, T.H., Barton, Ch., Walsh, P.C. - Family history and the risk of prostatic cancer. *The Prostate*, 1990, 17, 337 - 347.
316. Stenberg, PE, McEver, RP, Shuman, MA, et al A platelet α -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; 101, 880-886.
317. Struve, I. – Tumour disease – a clinical guide – *Clin.Guide tumour marker*, 1993, 11-14.
318. Taguchi, O, Gabazza, EC, Yasui, H, et al Prognostic significance of plasma D-dimer levels in patients with lung cancer. *Thorax* 1997; 52, 563-565.
319. Tait, R.C., Walker, I.D., Perry, D.J., Islam, S.I.A.M., Daly, M.E., McCall, F., Conkie, J.A. & Carrell, R.W. - Prevalence of antithrombin III deficiency in the healthy population. *British Journal Of Haematology* – 1994, 87, 106-112.
320. Tegger-Nilsson, A.C. – Antithrombin in infancy and childhood – *Acta Pediatr. Scand.*, 64, 624-628, 1975.
321. Thompson I.M., Ernst J.J., Gangai M.P.and Spense C.R. - Adenocarcinoma of the prostate: Results of routine urological screening. *J. Urol.*, 1984, 132, 690-692.
322. Thompson, WD, Smith, EB, Stirck, CM, et al Angiogenic activity of fibrin degradation products is located in fibrin fragment E. *J Pathol* 1992; 168, 47-53.
323. Toomey, JR, Kratzer, KE, Lasky, NM, et al Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996; 88, 1583-1587.
324. Trousseau, A (1865) *Phlegmasia alba dolens: Clinique medicale de l'Hotel-Dieu de Paris*. 2nd ed., 654-712 J. B. Balliere et Fils. Paris, France.
325. Tsopanoglou, NE, Maragoudakis, ME On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis: potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem* 1999; 274, 23969-23976.
326. Tsopanoglou, NE, Pipili-Synetos, E, Maragoudakis, ME Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol* 1993; 264, C1302-C1307.
327. Ueda, C, Hirohata, Y, Kihara, Y, et al Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol* 2001; 36, 848-850.
328. Ueno, T, Toi, M, Koike, M, et al Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000; 83, 164-170.

329. UICC (Union Internationale Contre le Cancer). TNM classification of malignant tumours. 4ed., Springer Verlag, Berlin, 1987.
330. UICC (Union Internationale Contre le Cancer). TNM classification of malignant tumours. 2ed., Geneve, 1974, 84 – 87.
331. UICC (Union Internationale Centre le Cancer) – INM classification of malignant tumors. 3ed. Springer Verlag, Berlin, 1987.
332. Upadhyaya, M., Hibbard, B.M., Walker, S.M. – Antisperm antibodies and maleinfertility – Br. J. Urol., 1984, 56, 531-536.
333. Urbauer, E, Kaufmann, H, Nosslinger, T, et al Thromboembolic events during treatment with thalidomide. Blood 2002; 99, 4247-4248.
334. Uzzo, R.G., Pinover, W.H., Horwitz, E.M. - Free prostate-specific antigen improves prostate cancer detection in a high-risk population of men with a normal total PSA and digitalrectal examination - Urology., 2003, 61, 4,754-759.
335. van Hinsbergh, VW, Collen, A, Koolwijk, P Role of fibrin matrix in angiogenesis. Ann N Y Acad Sci 2001; 936, 426-437.
336. van Hylekama VA, et al. Inter-relation of coagulation factors and d-dimer levels in healthy individuals - Journal of Thrombosis and Haemostasis -2003, 1 (3): 516-522.
337. Varki, NM, Varki, A Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans. Semin Thromb Haemost 2002; 28, 53-66.
338. Veenema, R., Gursel, E., Romas, N., Wechsler, M., Lattimer, J. - Bone marrow acid phosphatase: progmostic value in patients undergoing radical prostatectomy. J. Urol., 1977, 117, 81 - 82.
339. Verheul HM, Hoekman K, Lupu F, Broxterman HJ, van der Valk P, Kakkar AK, et al. Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. Clin Cancer Res. 2000; 6: 166–171.
340. Vernet, S.G. - Pathologia urogenital., Madrid, Paz Montalvo, 1953.
341. Vihko, P., Lukkarinen, O., Konturri, M., Vihko, R. – Effectiveness of radioimmunoassay of human prostate specific acid phosphatase in the diagnosis and follow up of therapy on prostatic cancer – Cancer, Res., 1981, 41, 1180.
342. Voisin, E., Piaton, E., Duco, F. - Diagnostic precoce du cancer de la prostate. Presse. Med. , 1991, 20, 18 - 870.
343. Walker JB, Nesheim ME. The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin. J Biol Chem – 1999, 274: 5201–5212.
344. Wang, M. et al. – Purification of a human prostate specific antigen – Invest. Urol., 1979, 17, 159-163.
345. Wang, M.C., Kuriyama, M., Papsidero, L.D., Loor, R.M., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T.M. – Prostate antigen of human cancer patients. In: Methods in Cancer Research XIX. Edited by H.Bush and L.C. Yeoman - New York Academic Press, 1982, 179-197.
346. Wang, M.C., Papsidero, L.D., Kuriyama, M., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., Chu, T. – Prostate antigen: A new potential marker for prostatic cancer – Prostate, 1981, 2, 89.

347. Watt, K.W.K., Lee, P.J., M'Timkulu, T., Chan, W.P., Loor, R. – Human prostate specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases – Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1986, 83, 3166.
348. Wejsman, Z., Chu, T., Bross, D., Saroff, J., Murphy, G., Johnson, D., Scott, W., Gibbons, R., Prout, G., Schmidt, J. - Clinical significance of serum alkaline phosphatase isoenzyme levels in advanced prostatic carcinoma. *J. Urol.*, 1978, 119, 244 - 246.
349. White, R.H., Zhou, H., and Romano, P.S.: Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. *Thromb Haemost* 2003; **90**: 446-55.
350. Whitmore, W.J. - Hormone therapy in prostatic cancer. *Am.J. Med.*, 1956, 21, 697 - 713.
351. Williams MT, et al. Venous thromboembolism in the intensive care unit - *Critical Care Clinics* – 2003, 19 (2): 185-207.
352. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Zacharski LR, Zimnoch L, Kudryk B, Kisiel W. Tissue factor-dependent coagulation activation and impaired fibrinolysis in situ in gastric cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2003; 29: 291–300.
353. Wojtukiewicz, M, Sierko, E, Klement, P., Rak, J. The hemostatic System and Angiogenesis in Malignancy – The Hemostatic System and Angiogenesis in Malignancy - *Neoplasia.* 2001, 3 (5), 371–384.
354. Wojtukiewicz, MZ, Tang, DG, Ciarelli, JJ, et al Thrombin increases the metastatic potential of tumor cells. *Int J Cancer* 1993; 54,793-806.
355. Wojtukiewicz, MZ, Tang, DG, Nelson, KK, et al Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased α IIb β 3 expression on the cell surface. *Thromb Res* 1992; 68, 233-245
356. Wojtukiewicz, MZ, Zacharski, LR, Memoli, VA, et al Fibrin formation on vessel walls in hyperplastic and malignant prostate tissue. *Cancer* 1991; 67, 1377-1383.
357. Yamahata, H, Takeshima, H, Kuratsu, J, et al The role of thrombin in the neo-vascularization of malignant gliomas: an intrinsic modulator for the up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Int J Oncol* 2002; 20, 921-928.
358. Ynan, J.J., D.E. Coplen, J.A. Petros, W. Catalona - Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate - specific antigen I levels - *J.Urol.*,1992, 147, 810-814.
359. Yoda, Y, Abe, T Fibrinopeptide A (FPA) level and fibrinogen kinetics in patients with malignant disease. *Thromb Haemost* 1981; 46, 706-709.
360. Young, H.H. - The early diagnosis and radical cure of carcinoma of the prostate. *John Hopkins Hosp. Bull.*, 1903, 16, 315 - 318.
361. Zacharski, LR, Ornstein, DL Heparin and cancer. *Thromb Haemost* 1998; 80, 10-23.
362. Zacharski, LR, Ornstein, DL, Mamourian, AC Low-molecular-weight heparin and cancer. *Semin Thromb Haemost* 2000; 26(suppl 1), 69-77.
363. Zacharski, LR, Rickles, FR Warfarin in the treatment of cancer. Poller, L Hirsh, J eds. *Oral anticoagulants.* 1996, 229-238 Oxford University Press. New York, NY:
364. Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, et al. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2000; 85: 281–288.

365. Zangari M, Saghafifar F, Anaissie E, Badros A, Desikan R, Fassas A, et al. Activated protein C resistance in the absence of factor V Leiden mutation is a common finding in multiple myeloma and is associated with an increased risk of thrombotic complications. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002; 13: 187–192.
366. Zangari, M, Anaissie, E, Barlogie, B, et al Increased risk of deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving thalidomide and chemotherapy. *Blood* 2001; 98, 1614-1615.
367. Zangari, M, Siegel, E, Barlogie, B, et al Thrombogenic activity of doxorubicin in myeloma patients receiving thalidomide: implications for therapy. *Blood* 2002; 100, 1168-1171.
368. Zhang, Y, Deng, Y, Luther, T, et al Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994; 94, 1320-1327.
369. Zhang, Y, Deng, Y, Wendt, T, et al Intravenous somatic gene transfer with antisense tissue factor restores blood flow by reducing tumor necrosis factor-induced tissue factor expression and fibrin deposition in mouse meth-A sarcoma. *J Clin Invest* 1996; 97, 2213-2224.