

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова праця

На правах рукопису

ПІДДУБНИЙ АРТЕМ МИХАЙЛОВИЧ

УДК 616.65-006-033.2-091(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЇ
ПРИ РАКУ ПЕРЕДМІХУРОВОЇ ЗАЛОЗИ**

14.03.02 – «патологічна анатомія»

22 «охорона здоров'я»

222 «медицина»

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ А. М. Піддубний

Науковий керівник – **Москаленко Роман Андрійович**, доктор медичних наук, доцент.

Суми – 2019

АНОТАЦІЯ

Піддубний А. М. Патоморфологічна характеристика біомінералізації при раку передміхурової залози. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.02 – патологічна анатомія (22 – Охорона здоров'я). – Сумський державний університет, МОН України, Суми, 2019. – Запорізький державний медичний університет, МОЗ України, Запоріжжя, 2019.

Питання росту показників захворюваності на онкологічну патологію є актуальною проблемою сьогодення. Одним з найбільш поширених захворювань серед чоловічого населення в усьому світі є рак передміхурової залози. Значна поширеність та висока частота розвитку ускладнень даної пухлини, а також висока вірогідність виникнення пухлинних метастазів до кісток обумовлює важливе соціально-економічне значення цієї неоплазії. Варіабельність клінічних проявів, а також відсутність визначених факторів ризику щодо розвитку ускладнень створюють умови, за яких неможливо спрогнозувати перебіг хвороби, а також ймовірність розвитку ускладнень. Впровадження додаткових діагностичних критеріїв дасть змогу оцінити як клініко-морфологічний статус захворювання, так і спрогнозувати подальший його перебіг.

Дисертаційна робота присвячена актуальній проблемі – оптимізації діагностики та оцінки перебігу раку передміхурової залози на тлі процесів біомінералізації. Для вирішення даної проблеми, аналізу та обґрунтування отриманих результатів були використані наступні методи дослідження: гістологічні, гістохімічні, гістоморфометричні, імуногістохімічні та фізико-хімічні методи (сканувальна та просвічувальна електронні мікроскопії, енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія, інфрачервона спектроскопія), статистична обробка даних з використанням параметричних та непараметричних критеріїв.

Дослідження було проведене на 60 зразках тканини раку передміхурової залози. Дизайном було передбачено вивчення 30 зразків неопластичної тканини, у якій було встановлено присутність простатолітів та 30 зразків пухлинної тканини раку передміхурової залози без ознак формування інтралюмінальних включень.

За результатами наукового дослідження встановлено клініко-епідеміологічні особливості раку передміхурової залози в Сумській області. Продемонстрована тенденція до росту показників захворюваності серед населення Сумського регіону впродовж періоду спостереження (2010–2017 роки). Проведений порівняльний аналіз даних показників із загальнонаціональними, встановлені закономірності географічного зонування у поширенні раку передміхурової залози.

У дослідженні вказано на те, що присутність простатичних конкрементів у неопластичній тканині супроводжується її ремоделюванням, що проявляється кістозною трансформацією залоз, розвитком склерозу та перигландулярного запалення, порушенням відтоку секрету та його застоєм. Тривала персистенція простатолітів супроводжується хронічним травмуванням епітелію, порушенням секреторного циклу залоз. Таким чином, хронічне запалення призводить до формування конкрементів, які у свою чергу підтримують процеси запалення.

Для оцінки впливу біомінеральних інтралюмінальних включень на імуногістохімічні особливості неопластичних клітин раку передміхурової залози була використана панель маркерів на визначення чутливості до стероїдних гормонів, інвазивного потенціалу, рівнів апоптозу та ангиогенезу, особливостей клітинного складу запальних інфільтратів, експресії остеобластичних маркерів та білків теплового шоку.

За результатами проведеного дослідження продемонстрований вплив біомінералізованих інтралюмінальних включень на підвищення експресії Вах ($p < 0,001$) та Casp3 ($p < 0,001$), що вказує на ріст апоптотичного потенціалу неопластичних клітин. Також було встановлено їхній вплив на зміни у

кількісному складі запального пухлинного мікрооточення, що проявлялося ростом присутності CD68-позитивних ($p < 0,001$) та MPO-позитивних клітин ($p < 0,001$). Одночасно з цим у неопластичній тканині знижується інтенсивність процесів ангиогенезу та експресії «стресових» маркерів, що проявлялося зниженням кількості VEGF-позитивних ($p < 0,05$) та Hsp90-позитивних ($p < 0,001$) пухлинних клітин.

Комплексне гістохімічне дослідження зразків (фарбування алізариновим червоним та за методом фон Косса) дозволило визначити фосфат кальцію як мінеральну основу всіх досліджених простатолітів.

За допомогою методів фізико-хімічного дослідження встановлено, що фосфат кальцію у структурі простатолітів представлений у формі гідроксиапатиту із карбонатними заміщеннями, що має риси подібності з структурою гідроксиапатиту незміненої кісткової тканини. Присутність залишків оксиду цинку та заліза у їхньому складі опосередковано підтверджує роль процесів дезорганізації сполучнотканинного матриксу та хронічної травматизації пухлинної тканини у їхньому формуванні.

Вперше було детально вивчено особливості експресії остеобластичних маркерів у тканині раку передміхурової залози та їхній зв'язок з присутністю гідроксиапатитних структур у просвіті неопластичних залоз. Встановлено, що за наявності простатолітів у пухлинній тканині достовірно підвищується рівень експресії остеоонектину ($p < 0,001$) та колагену I типу ($p < 0,001$). Сукупність вказаних факторів чинить модулюючий ефект на пухлинні клітини та зумовлює розвиток специфічного остеобластичного профілю. Даний феномен може сприяти розпізнаванню кісткової тканини циркулюючими раковими клітинами як оптимального мікрооточення для розвитку кісткових метастазів, тобто розвивається явище остеотропізму пухлинних клітин.

Результати роботи можуть бути використані як теоретичне підґрунтя для підвищення ефективності діагностики та оцінки ризику розвитку ускладнень раку передміхурової залози за допомогою малоінвазивних діагностичних методів. Отримані результати можуть мати високу соціально-економічну

значущість через покращення показників виживаності та підвищення якості життя хворих на рак передміхурової залози.

Отримані в ході дослідження результати, висновки та практичні рекомендації доповнюють та поглиблюють теоретичні уявлення щодо процесів пухлинної прогресії раку передміхурової залози та розвитку метастазів до кісток. Наведені у дисертаційному дослідженні дані можуть бути використані у навчально процесі при підготовці фахівців у галузі медицини на базі теоретичних і клінічних кафедр патологічної анатомії, патологічної фізіології, урології та онкології.

Виявлення біомінералізованих інтралюмінальних включень у тканині раку передміхурової залози слід розглядати як прогностично-негативний фактор та як критерій відбору пацієнтів до групи ризику щодо розвитку метастатичного поширення пухлини до кісток. Навіть за відсутності кальцифікатів у біопсійному матеріалі визначення експресії остеонектину може використовуватися як прогностичний критерій. Це дасть змогу створити індивідуалізований підхід до кожного пацієнта, оптимізувати діагностичну та лікувальну тактики.

Під час виконання дисертаційної роботи було запатентовано «Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати з парафінових гістологічних блоків» (патент України на корисну модель № u201702817). Цей метод може бути використаний у лікувально-діагностичній та науковій діяльності та безпосереднього фізико-хімічного та молекулярно-біологічного вивчення інтралюмінальних включень.

Ключові слова: рак передміхурової залози, імуногістохімічне дослідження, простатоліти, остеобластичний імунофенотип, гідроксиапатит, остеонектин, запалення.

ANNOTATION

Piddubnyi A.M. Pathomorphological characterization of biomineralization in prostate cancer. – Qualification scientific work as the manuscript.

Thesis for a Candidate of Medical degree by specialty 14.03.02 “Pathological anatomy” (22 – health care). – Sumy State University of Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2019. – Zaporizhia State Medical University of Ministry of Health Care of Ukraine, Zaporizhia, 2019.

The growth of cancer-related morbidity is an actual problem of modern medicine. The prostate cancer is one of the most common pathologies among the male population worldwide. This neoplasm has a high social and economical significance because of high incidence rate and high level of cancer-related complications such as bone metastases. The variability of clinical manifestations, as well as the absence of identified risk factors for the development of complications create a conditions when it is impossible to predict the course of the disease. The introduction of additional diagnostic criteria will make it possible to assess the clinical and morphological status of the disease and predict its progression.

That is why the topic of thesis is devoted to the actual problem – optimization of diagnostics and evaluation of the course of prostate cancer with biomineralization. The following methods were used for this research and analysis of the data: histology, histochemistry, histomorphometry, immunohistochemistry, physical and chemical methods (scanning and transmission electron microscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy, infrared spectroscopy), statistical analysis of data with parametric and nonparametric tests. 60 samples of prostate cancer tissue were used for the research: 30 samples of neoplastic tissue with prostatic calculi and 30 prostate cancer samples without intraluminal inclusions.

During the research the clinical and epidemiological features of prostate cancer in the Sumy region were established. The growth tendency of the prostate cancer incidence rate in Sumy region has been demonstrated (during the

observation period from 2010 to 2017). A comparative analysis of these values with the national ones was done, the patterns of geographic distribution of prostate cancer were established.

The research pointed out that the presence of intraluminal inclusions in the neoplastic tissue is accompanied by its remodeling. It is manifested by cystic transformation of the glands, the development of sclerosis and periglundular inflammation, violation of the secretion outflow and its stagnation. Prolonged persistence of the prostatic calculi is accompanied by chronic epithelium injury, a violation of the secretory cycle of the glands. Thus, chronic inflammation leads to the formation of concretions, which supports the inflammation.

A wide panel of markers for sensitivity to steroid hormones, invasive potential, apoptosis and angiogenesis, inflammatory infiltrates detection, expression of osteoblastic markers and heat shock proteins was used to evaluate the effect of biomineral intraluminal inclusions on the immunophenotype of prostate cancer cells.

The results of the study showed the higher expression of Bax ($p < 0.001$) and Casp3 ($p < 0.001$) in the prostate cancer with prostatic calculi. It indicates the higher apoptotic potential of neoplastic cells. We also detected the increased number of CD68-positive ($p < 0.001$) and MPO-positive cells ($p < 0.001$) in the inflammatory tumor microenvironment. At the same time the intensity of the angiogenesis and the expression of "stress" markers was lower, which was manifested by the reduction of the number of VEGF-positive ($p < 0.05$) and Hsp90-positive ($p < 0.001$) tumor cells in the prostate cancer with prostatic calculi.

Histochemical examination of samples (Alizarin red and von Kossa staining) determined the calcium phosphate as the mineral compound of prostatic calculi.

It was established that calcium phosphate in the prostatic calculi was in the form of its hydroxyapatite with carbonate substitutions. It also had similarities with the structure of hydroxyapatite of bone tissue. The presence of zinc oxide and iron in their structure indirectly confirms the role of connective tissue destruction and chronic traumatism of tumor tissue in their formation.

For the first time, the features of the osteoblastic markers expression in the prostate cancer tissue were studied in detail. It has been established that the levels of osteonectin ($p < 0.001$) and type I collagen ($p < 0.001$) are significantly higher in the prostate cancer with biomineralized intraluminal inclusions. The combination of these factors has a modifying effect on tumor cells and predetermine the development of their specific osteoblastic phenotype. This phenomenon can contribute to the recognition of bone tissue by circulating cancer cells as an optimal microenvironment for the development of bone metastases, that is, the phenomenon of osteotropism of tumor cells develops.

The findings, conclusions and practical recommendations gained during the study complement and deepen the theoretical understanding of the tumor progression of prostate cancer and promotion of the bones metastases development. The data can be used for the education at the theoretical and clinical departments of pathology, pathophysiology, urology and oncology and as a part of training programmes.

Detection of biomineralized intraluminal inclusions in the prostate cancer tissue should be considered as a prognostic-adverse factor. These patients should be selected to the risk group for the bone metastases development. The assessment of osteonectin expression can be used as a prognostic criterion when the prostatic calculi are not observed. It will optimize and individualize the diagnostic and therapeutic tactics.

During the thesis preparation "The isolation method of intraluminal inclusions of the prostate glands from paraffinic histological blocks" was patented (patent of Ukraine for the utility model №u201702817). This method can be used in medical-diagnostic and scientific researches for the selection and direct physical, chemical and molecular-biological study of intraluminal inclusions.

Key words: *prostate cancer, immunohistochemistry, prostatic calculi, osteoblastic immunophenotype, calcium hydroxyapatite, osteonectin, inflammation.*

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Piddubnyi A., Danylchenko S., Romaniuk A., Moskalenko R. Prostatic calculi cause osteoblastic immunophenotype of prostate cancer. *Патологія*. 2019. Vol. 16, № 2(46). P. 170–176. (Дисертантом самостійно проведене морфологічне, імуногістохімічне дослідження, аналіз результатів, сформульовані висновки, підготована до друку стаття).
2. Prostate Cancer with Intraluminal Inclusions: the Association of the Immunophenotype with Grade Score / A. Piddubnyi [et al.]. *Iranian Journal of Pathology*. 2019. Vol.14, No.3. P. 212–222. (Дисертантом розроблений дизайн дослідження, проведені імуногістохімічні дослідження, статистична обробка результатів та їхній аналіз, сформульовані висновки).
3. Piddubnyi A., R. Moskalenko. Molecular aspects of the bone metastases development in prostate cancer. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2019. Vol. 7, №2. P. 96–108. (Дисертантом проведений пошук літературних джерел, їхній аналіз та узагальнення).
4. Піддубний А.М. Порівняльний аналіз впливу простатолітів та *сoppora amylosea* на імунофенотип раку передміхурової залози. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. Вінниця, 2019. №1. С. 64–69.
5. Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. *Art of medicine*. 2018. №3. С. 100–105. (Дисертантом проведено гістологічне вивчення препаратів та імуногістохімічне дослідження, опрацьовані отримані результати, сформульовані висновки, підготовлена стаття до друку).
6. Multifocal primary tumour with lesions in prostate gland and urinary bladder: clinical case / A. Romaniuk [et al.]. *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2017. Vol. 16, No 1. P. 161–165. (Дисертантом проведено

морфологічне та імуногістохімічне дослідження препаратів, аналізовані результати, сформульовані висновки).

7. Романюк А.М., Москаленко Р.А., Піддубний А.М., Сікора В.В. Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини передміхурової залози в Сумській області. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип.2, Т.1 (128). С. 94–97. *(Дисертантом проведений пошук та статистичний аналіз епідеміологічних показників захворюваності на рак передміхурової залози).*

8. The effect of prostatic stones on the immunophenotype of prostate cancer cells / A. Piddubnyi [et al.]. *Medicina: 77th International Scientific Conference of the University of Latvia (Riga, Latvia, 22 February 2019)*. Riga, 2019. Vol. 55, Supplement 1. P. 95. *(Дисертантом проведена практична частина дослідження, проаналізовані отримані результати, сформульовані висновки).*

9. Osteonectin overexpression in the case of prostate cancer with intraluminal inclusions / A. Piddubnyi [et al.]. *Virchows Archiv*. 2018. № 473. P. S45. *(Дисертантом створений дизайн дослідження, проведене гістологічне та імуногістохімічне вивчення зразків, аналізовані дані, сформульовані висновки).*

10. Hsp 90 overexpression in chronic bacterial prostatitis with corpora amylacea / A. Piddubnyi [et al.]. *Virchows Arch*. 2017. Vol. 471, Suppl. 1. P. S267–268. *(Дисертантом виконане морфологічне та гістохімічне дослідження зразків, аналізовані дані, сформульовані висновки).*

11. Prostate cancer leads to a change in the composition of tissue carbohydrates / A. Romaniuk [et al.]. *Virchows Arch*. 2019. Vol. 475, Suppl. 1. P. S.25. *(Дисертантом сформульовано схему дослідження, проведене гістохімічне дослідження та інтерпретація результатів, сформульовані висновки).*

12. Піддубний А.М. Аналіз захворюваності на рак передміхурової залози серед населення Сумської області. *Актуальні питання теоретичної*

та практичної медицини : зб. тез доп. V міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених (м. Суми, 21-22 квітня 2016 р.). Суми, 2016. С. 137.

13. Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати з парафінових гістологічних блоків: пат. 41235 Україна, МПК51, G01N 1/28, № u201702817; заявл. 27.03.2017; опубл. 11.09.2017, Бюл. №17. 4 с. *(Дисертантом розроблено базовий концепт корисної моделі, проведені експерименти щодо її підтвердження, сформульовано заявку на патент).*

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	13
Вступ.....	14
Розділ 1 Огляд літератури.....	21
1.1 РПЗ: епідеміологія, етіологія, класифікація, діагностика	21
1.2 ІлВ у тканині ПЗ: класифікація та етіологія, структура, роль у патології	28
1.3 Молекулярно-біологічне підґрунтя теорії розвитку кісткових метастазів “seed and soil” при злоякісних новоутвореннях ПЗ	30
Розділ 2 Матеріали і методи дослідження	43
Розділ 3 Епідеміологічна характеристика РПЗ у Сумській області	49
Розділ 4 Дослідження тканини РПЗ з біомінеральними ІлВ	54
Розділ 5 Дослідження тканини РПЗ без ІлВ	74
Розділ 6 Морфологічний і фізико-хімічний аналіз мінеральної складової біомінеральних ІлВ РПЗ	89
Розділ 7 Статистичний аналіз результатів ІГХ дослідження тканини РПЗ за умов наявності та відсутності ІлВ	101
Розділ 8 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	113
Висновки	135
Практичні рекомендації	137
Примітки	138
Список використаної літератури	139
Додатки	170

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

Вах – білок Вах.

СА – *corroga amylasea*.

Casp3 – каспаза 3-го типу.

Col I – колаген I типу.

Col II – колаген II типу.

Hsp70 – білок теплового шоку з молекулярною масою 70 кДа.

Hsp90 – білок теплового шоку з молекулярною масою 86 кДа.

IRS – інфрачервона спектроскопія.

MMP1 – матриксна металопротеїназа 1-го типу.

MPO – мієлопероксидаза.

p53 – білок p53.

pH – показник кислотності.

SEM/EDS – сканувальна електронна мікроскопія з енергодисперсійною спектроскопією.

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту.

XRD – рентгенодифракційне дослідження.

AP – рецептори до андрогенів.

ДГПЗ – доброякісна гіперплазія передміхурової залози.

ІГХ – імуногістохімічне дослідження.

ІЛВ – інтралюмінальні включення.

ОСН – остеонектин.

ПЗ – передміхурова залоза.

ПК – простатичні конкременти.

РПЗ – рак передміхурової залози.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Зростання онкологічної захворюваності є актуальною проблемою сьогодення. У 2012 році у світі було зареєстровано 14,1 млн нових випадків онкологічної патології та 8,2 млн смертей, пов'язаних із злоякісними новоутвореннями [1]. У 2018 році ці показники досягали 18,1 та 9,6 млн. Аналіз темпів приросту епідеміологічних показників свідчить про те, що у XXI столітті онкологічна патологія посяде провідне місце в структурі захворюваності та смертності населення [2]. Аналіз онкологічної захворюваності в Україні засвідчує відповідність глобальних епідеміологічних трендів до зростання цих показників. У 2020 році очікується 200 тис. нових випадків злоякісних новоутворень [3].

Рак передміхурової залози (РПЗ) є однією з найбільш поширених злоякісних патологій в усьому світі. Він займає провідні місця в структурі онкологічної захворюваності та смертності й має тенденції до зростання цих показників. У 2015 році у світі зареєстровано 1,6 млн нових випадків РПЗ та 366 тис. пов'язаних із ним смертей [4]. Це зумовлює високе соціально-економічне значення зазначеної патології. Впровадження новітніх інструментальних, клініко-лабораторних та імуногістохімічних діагностичних методів призвело до зростання показників захворюваності на цю патологію впродовж останніх тридцяти років [5].

Проблема оцінювання клінічного статусу та прогнозування ризиків розвитку ускладнень у разі злоякісних новоутворень є актуальним питанням сучасної медицини. Розроблені методики оцінювання ризику розвитку метастазів РПЗ орієнтовані виключно на біохімічні ланки процесів метастазування, але не враховують морфологічних характеристик пухлин [6]. Система CAPRA, яка використовується у Північній Америці та низці країн Європи, враховує 5 змінних. З них лише оцінка пухлини за шкалою Глісона має безпосереднє відношення до пухлинної тканини [7]. Таким чином,

впровадження у клінічну практику нового діагностичного методу, який дасть змогу оцінити метастатичний потенціал пухлини, дозволить покращити показники виживаності пацієнтів та якість їхнього життя.

Поширеність кальцифікатів передміхурової залози (ПЗ), за даними різних досліджень, становить від 7 % до 70 %, однак їх клінічне значення є нез'ясованим [8-12]. Доведені вплив простатичних конкрементів (ПК) на зниження ефективності антибіотикотерапії при хронічному простатиті та розвиток урологічних симптомів, таких як порушення сечовипускання і біль. Однак їх патогенетична участь у процесах прогресії РПЗ не встановлена [13-14].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконане згідно з планом наукових досліджень кафедри патологічної анатомії Медичного інституту Сумського державного університету та є частиною науково-дослідної роботи «Розробка методу діагностики пухлин органів репродуктивної системи з використанням молекул клітинної адгезії раково-ембріонального антигену» (номер державної реєстрації 0117U003937, 2017–2020 рр.), в якій автор був відповідальним виконавцем, та частиною науково-дослідної роботи «Ефективність «liquid biopsy» та тканинної біопсії у діагностиці та лікуванні злоякісних пухлин» (номер державної реєстрації 0118U003570, 2018–2020 рр.), у якій дисертант виконав розділ дослідження щодо вивчення морфологічних та імуногістохімічних особливостей тканини раку передміхурової залози.

Тема дисертації була затверджена вченою радою Сумського державного університету МОН України (протокол № 1 від 28.08.2015) та уточнена вченою радою Сумського державного університету МОН України (протокол № 10 від 21.03.2019).

Мета дослідження. Охарактеризувати патоморфологічні особливості ацинарної аденокарциноми передміхурової залози з біомінеральними

інтралюмінальними включеннями, з'ясувати їх склад та вплив на імуногістохімічні характеристики пухлини.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз частоти та структури захворюваності на рак передміхурової залози в Сумській області за період 2010–2017 років за даними Національного канцер-реєстру України, відділу статистики Сумського обласного онкологічного диспансеру та Сумського обласного канцер-реєстру.

2. Установити особливості взаємодії біомінеральних інтралюмінальних включень із тканиною раку передміхурової залози.

3. Визначити імуногістохімічні особливості тканини раку передміхурової залози з біомінеральними інтралюмінальними включеннями.

4. Вивчити патологічні біомінеральні утворення тканини раку передміхурової залози фізико-хімічними методами дослідження.

5. Оцінити роль простатолітів у формуванні остеобластичного імунофенотипу пухлинних клітин передміхурової залози.

Об'єктом дослідження є аденокарцинома передміхурової залози з біомінералізацією.

Предметом дослідження є клініко-морфологічні, молекулярно-біологічні, імуногістохімічні та фізико-хімічні ознаки тканин раку передміхурової залози з біомінеральними інтралюмінальними включеннями.

Методи дослідження:

1. Макроскопічний метод: візуальне вивчення стану тканини пухлин передміхурової залози за умов патологічної мінералізації.

2. Гістологічний метод із забарвленням тканини передміхурової залози гематоксилін-еозином.

3. Гістохімічний метод: забарвлення препаратів пухлин передміхурової залози за фон Коссом, конго червоним, алізариновим червоним, альціановим синім, застосування PAS-реакції. Дослідження тканин у флуоресцентному та поляризованому світлі.

4. Імуногістохімічний метод: застосування антитіл до різних білків: рецепторів до андрогенів (AR), остеонектину (OCH), p53, каспази 3 (Casp3), Вах, CD68, мієлопероксидази (MPO), матриксної металопротеїнази 1 (MMP1), судинного ендотеліального фактора росту (VEGF), Hsp70, Hsp90, колагену I типу (Col I), колагену II типу (Col II).

5. Морфометричний метод: визначення основних обсягів структурних компонентів тканин передміхурової залози з біомінералізацією.

6. Рентгенодифракційне дослідження та інфрачервона спектроскопія мінералізованого матеріалу.

7. Сканувальна та просвічувальна електронна мікроскопія.

8. Статистичні методи – застосування параметричних та непараметричних статистичних показників.

Наукова новизна одержаних результатів. За результатами дослідження було встановлено, що наявність біомінеральних інтралюмінальних включень (ІлВ) у тканині РПЗ супроводжується ремоделюванням пухлинної тканини, розвитком гострого та хронічного запалення. Були виявлені статистично достовірні відмінності експресії маркерів апоптозу Вах та Casp3, маркера ангиогенезу VEGF і стресового маркера Hsp90 між тканиною РПЗ із ІлВ та неопластичною тканиною без них. Уперше було продемонстровано вплив ІлВ на різні ланки процесу апоптотичної загибелі клітин, їх зв'язок із механічним травмуванням неопластичної тканини. За результатами дослідження було встановлено, що різні за складом ІлВ мають принципово різні механізми формування, а отже, і різний хімічний склад. Було показано, що переважним мінеральним компонентом ПК є гідроксіапатит кальцію. Установлений стимулювальний вплив простатолітів на розвиток остеобластичного імунофенотипу пухлинних клітин, що виявляється підвищеною експресією OCH та Col I. Сукупність зазначених чинників має стимулювальний вплив на процеси розвитку метастазів РПЗ до кісток.

Практичне значення одержаних результатів. Було доведено стимулювальний вплив біомінеральних ІлВ на процеси ремоделювання пухлинної тканини РПЗ, апоптозу (Bax і Casp3), запалення (MPO й CD68) та експресію остеобластичних маркерів (ОСН і Col I). Зазначені імуногістохімічні та морфологічні ознаки дають можливість включити фактор наявності біомінеральних ІлВ у діагностичні алгоритми РПЗ і використовувати їх наявність як прогностично-негативний показник щодо оцінювання ризику розвитку ускладнень РПЗ, а саме метастазів до кісток. Було запропоновано алгоритм гістохімічного дослідження тканини РПЗ для виявлення біомінеральних ІлВ.

Під час виконання дисертаційного дослідження було отримано патент на корисну модель «Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати з парафінових гістологічних блоків».

Результати дослідження можуть бути використані в практичній діяльності лікарів-патологоанатомів, лікарів-онкологів, лікарів-урологів, лікарів лабораторної діагностики, лікарів-хіміотерапевтів.

Матеріали дисертаційного дослідження впроваджені в навчальний процес на кафедрах патологічної анатомії Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця, Харківського національного медичного університету, Буковинського державного медичного університету, Медичного інституту Сумського державного університету, кафедри патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету, кафедри патологічної анатомії, судової медицини та права Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова, кафедрах патологічної анатомії з секційним курсом ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава), Одеського національного медичного університету, кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «Дніпропетровської медичної академії МОЗ України», кафедри загальної та клінічної патології Харківського національного медичного університету ім. В. О. Каразіна, кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та

судовою медициною Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського. Результати дослідження використовують у діагностичній роботі Полтавського, Вінницького, Одеського, Чернігівського обласних патологоанатомічних бюро, Чернівецької ОКМУ «Патологоанатомічне бюро» та Державного патологоанатомічного центру України.

Особистий внесок дисертанта. Здобувач самостійно сформував дизайн дослідження, сформулював мету та завдання, провів пошук та дослідження матеріалу, а також виконав гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне дослідження зразків тканин. Автор самостійно провів пошук та аналіз літературних даних, статистичне оброблення одержаних результатів та їх інтерпретацію, визначення основних положень, що виносяться на захист, оформлення дисертації і формулювання висновків. Рентгенодифракційне дослідження та інфрачервона спектроскопія були виконані в Інституті прикладної фізики НАН України з консультативною допомогою кандидата фізико-математичних наук С. М. Данильченка.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені на: 29-му, 30-му та 31-му Європейських конгресах патологів (м. Амстердам, Нідерланди, 2017; м. Більбао, Іспанія, 2018; м. Ніцца, Франція, 2019), 77-й Міжнародній науковій конференції Університету Латвії (м. Рига, Латвія, 2019), семінарі кафедри медичної біохімії та біофізики Університету Умео (м. Умео, Швеція, 2019), Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих учених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» (м. Суми, СумДУ, 2016). Дисертаційну роботу заслухано на міжкафедральному семінарі Медичного інституту Сумського державного університету 26 червня 2019 року (протокол № 6).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць: 7 статей, з яких 5 – у наукових фахових виданнях України, 2 – у закордонних журналах, що індексуються наукометричною базою Scopus, 5 –

у матеріалах і тезах конференцій та конгресів, 1 патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 192 сторінках комп'ютерного тексту й складається з анотацій, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень (5 розділів), аналізу та обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, приміток, списку використаних джерел, а також додатків. Робота містить 71 рисунок, 5 таблиць та список використаних джерел із 269 джерел (11 кирилицею та 258 латиницею).

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 РПЗ: епідеміологія, етіологія, класифікація, діагностика

Епідеміологія

РПЗ – це злоякісне новоутворення ПЗ, яке є другим найбільш поширеним онкологічним захворюванням серед чоловічого населення по всьому світу та займає п'яте місце серед причин онкологічної смертності чоловіків [15-17]. Проблема епідеміології РПЗ є актуальною у зв'язку з гетерогенністю даного класу пухлин, варіабельністю клінічних проявів та протоколів діагностики [18-20].

За результатами досліджень Dorr V. J. та ін., більше ніж у 2/3 чоловіків старших за 80 років під час розтину був виявлений РПЗ [21]. За даними ВООЗ, у 2012 році у більше ніж у 1,1 млн чоловіків у світі було діагностовано РПЗ, що складає 15 % від злоякісних новоутворень усіх локалізацій [22].

Найвищий рівень захворюваності на РПЗ реєструється серед населення країн південної та північної Америки, Нової Зеландії та Австралії, західної та північної Європи та деяких країнах Африки. Однак для чоловіків азійських країн характерний низький рівень захворюваності на РПЗ, хоча виявляється тенденція до поступового росту цього показника [23-24]. У країнах західної Європи показник захворюваності на РПЗ складає 96,00 випадків на 100 тис. населення, смертності від РПЗ – 19,30 на 100 тис. населення та стрімко зростають [25-27]. Останнім часом 5-річна відносна виживаність пацієнтів з РПЗ збільшилася з 73,40 % у 1999-2001 роках до 83,40 % у 2005-2007 роках [28].

Рівень захворюваності на РПЗ серед української популяції значно нижчий порівняно із загальноєвропейським. Було покзано, що найбільший показник захворюваності на РПЗ відмічається у Норвегії (193,20 випадків на

100 тис. населення) та Німеччини (187,50 випадків на 100 тис. населення), тобто для розвинутих країн. Це пояснюється малорухливим стилем життя, а також значним розвитком скринінкових програм. Найнижчі ж показники виявляються у країнах східної Європи та країнах, що розвиваються. Так для Албанії показник захворюваності складає 24,80 випадків на 100 тис. населення, а для Боснії і Герцоговині – 32,70 на 100 тис. населення (рис. 1.1) [25].

Для більш точного опису рівня смертності від РПЗ використовується стандартизований віковий показник, який враховує рівень летальності від РПЗ відповідно до віку пацієнтів. Для світового чоловічого населення віком від 45 років простежується чітка тенденція до зростання виживаності та зниження рівня «ранньої» та «пізньої» смертності від РПЗ [29]

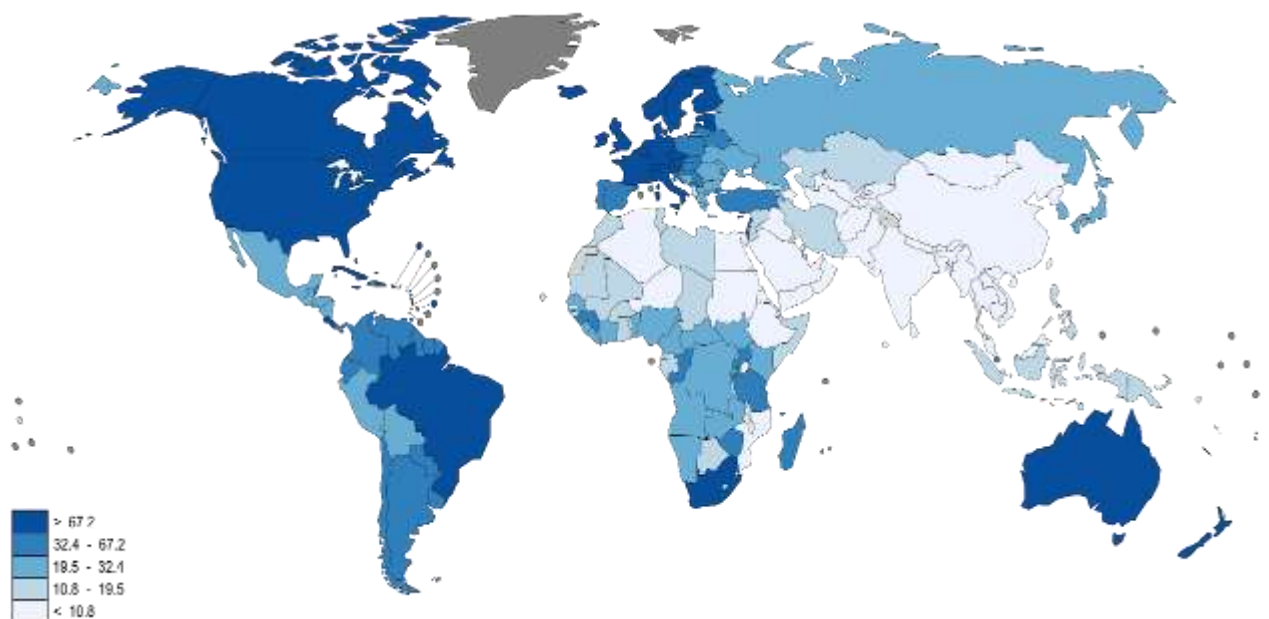


Рисунок 1.1 – Показник захворюваності на РПЗ серед світового чоловічого населення за 2012 рік [23]

Етіологія

До факторів ризику щодо розвитку РПЗ відносяться расова належність та обтяжений генетичний анамнез, тобто наявність різних онкологічних захворювань, зокрема ПЗ, у найближчих родичів, дієтичні фактори

(вживання підвищеної кількості жирів як рослинного, так і тваринного походження), дисгормональні порушення з гіперестрогенемією, переважання нічного способу життя, а також дії екзогенних полютантів, таких як Бісфенол А та солі важких металів [30-37].

У 1863 році німецький вчений Р. Вірхов висунув ідею щодо можливості виникнення неопластичних процесів у вогнищах хронічної запальної реакції [38]. Підтвердженням цієї ідеї слугують статистичні дані: 15-20 % випадків раку шлунку асоціюють з персистуванням *Helicobacter pylori* в слизовій оболонці шлунка, доведена роль вірусних гепатитів В та С в патогенезі гепатоцелюлярного раку печінки та шистосомної інфекції в розвитку раку сечового міхура [39]. Тому дослідження останніх років виявили, що близько 60 % випадків РПЗ супроводжуються явищами простатиту різного ступеню активності, однак відсутні роботи, які підтверджують безпосередню роль запалення в канцерогенезі у ПЗ [40].

Також до факторів ризику розвитку РПЗ відносяться неінфекційні фізичні подразники, такі як інтралюмінально розташовані крохмальні тільця (*corpora amylacea*) та біомінерали, які можуть стимулювати канцерогенез у ПЗ шляхом підтримки хронічного запалення та ушкодження клітин ПЗ [41]. Ця гіпотеза тісно пов'язана з інфекційною теорією канцерогенезу, бо в ході досліджень з простатичних включень були виділені бактеріальні білки *E. coli*, а самі включення повністю чи частково склалися з білків гострого запалення та залишків мікроорганізмів [42]. Інші дрібні сторонні тіла, фізичні подразники та найпростіші, хімічні канцерогени та рефлюкс сечі можуть сприяти виникненню хронічного запалення та розвитку РПЗ [43].

Іншим важливим етіологічним фактором розвитку РПЗ є частота еякуляцій. В ході досліджень було проанкетовано чоловіків з РПЗ та з'ясовано стійкий зв'язок між частотою еякуляцій і РПЗ. Цей факт можна пояснити інтенсивністю та тривалістю взаємодії хімічних та фізичних подразників з епітеліальними клітинами, а також швидкістю утворення конкрементів ПЗ [44-45]. Тобто збільшення частоти та інтенсивності руху

простатичного секрету може зменшити потенційний негативний ефект фізичних та хімічних подразників, таким чином знижуючи ризик ровзитку РПЗ.

Класифікація РПЗ

Згідно з класифікацією ВООЗ (2016 р.), залежно від гістогенезу, виділяють епітеліальні, нейроендокринні, мезенхімальні, гематолімфоїдні та змішані первинні пухлини ПЗ [46]. Найбільш поширеним варіантом епітеліальних пухлин ПЗ є ацинарна аденокарцинома [47].

У 1968 році американський патолог Дональд Глісон створив унікальну систему оцінки РПЗ, яка базується на гістоархітектоніці пухлини [48]. Градація за Глісоном наразі є загальноприйнятою моделлю оцінки аденокарциноми ПЗ, що дає змогу оцінити прогноз та призначити адекватну терапію для пацієнта.

Згідно зі шкалою Глісона, виділяють наступні типи аденокарциноми ПЗ (рис. 1.2) [49-50].

1. Залози аденокарциноми добре сформовані, нагадують залози незміненої ПЗ, мають округлу чи овальну форму, мономорфні, розміщені близько одна до одної, дрібні, можуть формувати пухлинні вузли, без ознак інвазії до оточуючих тканин. Даний тип відповідає високодиференційованій аденокарциномі;

2. Тканина представлена добре сформованими, відділеними одна від одної, залозами, які мають порівняно більший розмір, дещо деформовані, зі збільшеною кількістю стромального компоненту. Може спостерігатися мінімальне проростання пухлинних клітин до навколишньої тканини. Представлений тип також відповідає високодиференційованій аденокарциномі;

3. У біоптаті представлені добре розпізнавані залози, які сформовані клітинами з гіперхромними ядрами. Деякі з клітин мігрують за межі залози та проростають в оточуючі тканини (мають виражений інвазивний ріст).

Атипові залози мають варіабельну форму та розмір. Даний тип відповідає помірнодиференційованій аденокарциномі;

4. У тканині неможливо розрізнити відокремлені залози. Вся пухлинна тканина представлена злитими атиповими залозами з поодинокими просвітами, які формують ланцюги, гнізда та групи з незначною кількістю стромального компоненту, що надає вигляду часткової відокремленості залоз. Відзначається значна інфільтрація оточуючих тканин неопластичними клітинами. Наведені ознаки характерні для низькодиференційованої аденокарциноми;

5. У досліджуваному зразку відсутні або наявні одиничні залозисті структури. Найбільш часто даний тип представлений виключно пухлинним полем чи тяжами ракових клітин у оточуючій тканині. Описані зміни відповідають недиференційованому РПЗ.

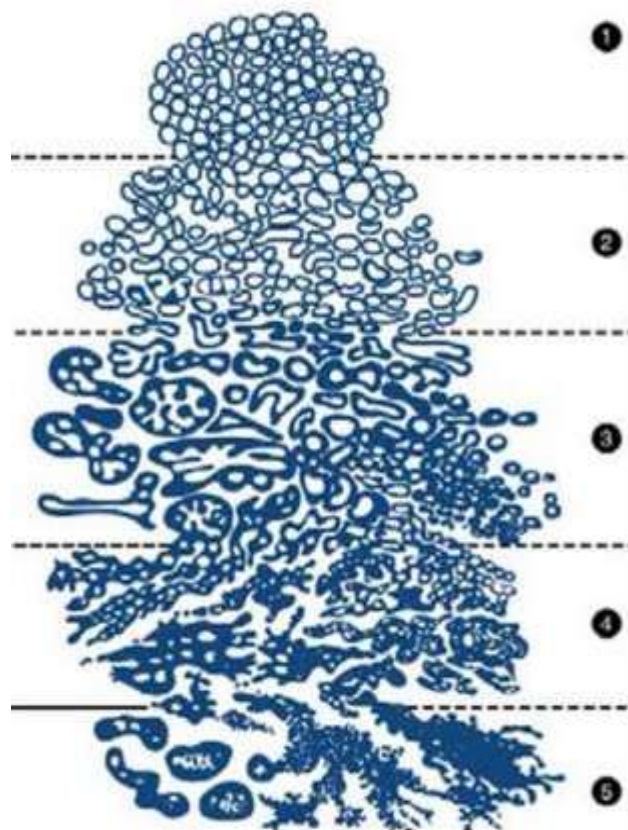


Рисунок 1.2 – Типи ацинарної аденокарциноми ПЗ відповідно до градації за Глісоном [51]

Під час аналізу зразків тканини визначаються первинний (домінуючий) тип, який займає більше 50 % від загального пухлинного поля та вторинний тип, який має складати від 5 % до 50 % площі пухлини. Стадія аденокарциноми ПЗ вираховується як сума двох доданків (первинного та вторинного типу) і складає від 2 до 10 [52-53].

Однак, згідно з рішенням ВООЗ та Міжнародної Асоціації Уропатологів, з 2016 року в практичній діяльності не рекомендоване визначення 1-го та 2-го типів аденокарциноми ПЗ у тонкогілкових біопсіях у зв'язку зі складощами у інтерпретації та відтворенні результатів гістологічного дослідження [54]. Тому найнижчим рівнем аденокарциноми ПЗ стала стадія 6 за шкалою від 2 до 10. Однак найбільші труднощі виникали між розподіленням групи 7 (3 + 4 чи 4 + 3) внаслідок розбіжностей між можливими наслідками та тактикою лікування. То ж був запропонований принцип розподілення РПЗ на класи відповідно до оцінки за шкалою Глісона [55-56].

- клас 1 – 6 стадія за шкалою Глісона;
- клас 2 – стадія 7=3 + 4 за шкалою Глісона;
- клас 3 – стадія 7=4 + 3 за шкалою Глісона;
- клас 4 – стадія 8 за шкалою Глісона;
- клас 5 – стадія 9-10 за шкалою Глісона.

Діагностика

Рання та точна діагностика проліферативної патології ПЗ, зокрема РПЗ, є ключовою ланкою успішного лікування пацієнтів, підвищення рівня виживаності та якості життя [57]. Провідну роль у підвищенні рівня захворюваності на РПЗ належить удосконаленню існуючих та впровадженню нових діагностичних методів. Так, згідно з рекомендаціями Агенції з попередження захворювань США, у 2008 році всім чоловікам, старшим за 75 років, рекомендоване визначення рівня простат-специфічного антигену

(ПСА), а з 2012 року рекомендовано визначення ПСА у чоловіків усіх вікових груп [58]. Нормальним вважається рівень ПСА нижче 4 нг/мл, однак цей показник залежить від віку пацієнта, раси та індивідуальних фізіологічних особливостей [59-62]. Якщо рівень ПСА у сироватці пацієнта вищий ніж 10 нг/мл, то результат вважається позитивним, що вказує на високий ризик розвитку РПЗ. За результату 4-10 нг/мл пацієнт перебуває в так званій «сірій зоні», а співвідношення вільного ПСА до загального показника вказує на специфічність неоплазії [63].

Саме проведення трансректального УЗД ПЗ та визначення рівня сироваткового ПСА є золотим стандартом діагностики РПЗ [64]. ПСА – це органоспецифічна калікреїнова серинова протеаза, яка спершу використовувалася як маркер сім'яної рідини у судово-медичній експертизі [65]. Основною функцією даної сполуки є підтримка рідкого стану сім'яної рідини. Існують і інші маркери РПЗ, які дають можливість діагностувати дану патологію. У 1938 році була виявлена простатична фракція кислій фосфатази, ферменту з молекулярною масою 100 кДа, яка продукується секреторним епітелієм ПЗ та впливає на його ріст. Але низька специфічність та діагностична цінність, труднощі інтерпретації результатів не дозволило широко впровадити цей метод у клінічну практику [66].

Проблема інтерпретації показників рівня сироваткового ПСА полягає в тому, що ця речовина є органоспецифічною, але її рівень може підвищуватися за дії багатьох чинників, тобто відмічається його низька специфічність [67]. Підвищення рівня цього маркера може спостерігатися у випадку доброякісної гіперплазії ПЗ (ДГПЗ), простатиту чи циститу, після еякуляції, травми чи стимуляції ПЗ під час клінічно-інструментальних досліджень, коли відбувається порушення цілісності базального шару епітелію та базальної мембрани, то ж ПСА може проникати у оточуючу строму та судини [59, 68]. До того ж Roobol M. J. та Carlsson S. V. у своїй роботі виявили, що 15 % РПЗ характеризується нормальним чи зниженим рівнем ПСА [69].

У випадку хибно-позитивного результату пацієнту показана трансректальна тонкогілкова біопсія ПЗ під контролем УЗД, що є інвазивним методом досліджень зі значною ймовірністю розвитку ускладнень [70-72]. Тому Üçera O. та ін. розробили метод комплексної оцінки ризику розвитку РПЗ, який включає в себе результати дослідження сироваткового ПСА, віку та об'єму ПЗ за результатами УЗД. Цей показник дістав назву «ПСА-віковий показник» та має ряд переваг у порівнянні з рутинним обстеженням пацієнтів з підозрою на РПЗ [73]. Також з метою діагностики можуть бути використані інші діагностичні високоспецифічні методики: ПЛР з визначенням циркулюючих пухлинних нуклеїнових кислот, рідинна біопсія з детекцією циркулюючих у кров'яному руслі пухлинних клітин [74].

1.2 ІЛВ у тканині ПЗ: класифікація, структура, роль у патології

Перша згадка про кальцифікати ПЗ датуються 1586 р. у роботі Donatus. У 1861 році Генрі Томпсон виявив у структурі ПЗ білкові утворення – *corpora amyloacea* (СА) та висунув припущення, що вони є попередниками кальцифікатів [75].

СА являють собою білкові конгломерати, які містяться у залозистих ацинусах ПЗ та виявляються у 25-84 % зразків тканини ПЗ [76-77]. Вони розміщені переважно у просвіті залоз, хоча повідомляється про можливе стромальне розміщення цих структур у пацієнтів зі СНІД, що пов'язано з атрофією ПЗ, деструкцією та дегенерацією гладком'язових волокон [78]. Структура СА представлена концентрично чи шарувато розміщеними депозитами безструктурної еозинофільної речовини, яка має варіабельну щільність. Ультраструктура СА представлена короткими концентричними та фібрилярними волокнами. Між шарами волокон розміщуються ділянки поліморфної щільної речовини [79].

На даний час розвиток СА вважають комплексним процесом, який залежить від рефлюксу сечі (надходження β 2-мікроглобуліну), присутності прозапальних протеїнів S100A8/A9, ферментів (мієлопероксидази),

підвищеної концентрації йонів цинку та кальцію, а також мікроорганізмів, зокрема *E. coli*. Виявлені фрагменти бактеріальної ДНК у структурі СА свідчать не лише про опосередкований вплив мікроорганізмів на процеси амілоїдогенезу, а й про їхню безпосередню участь у формуванні СА [80-82]. Також до структури СА входять лактоферин, ПСА, сироватковий альбумін, бета-гемоглобін та інші комплексні сполуки, що вказує на гетерогенність та циклічність процесів їхнього генезу [83].

Простатоліти, залежно від етіології та локалізації, діляться на первинні, або ендogenous (розвиваються в ацинусах ПЗ) та вторинні, або екзогенні (спричинені рефлюксом сечі до ПЗ, розміщуються переважно у протоках). Останні, зазвичай, є супутнім явищем патології нирок чи метаболічного синдрому [8].

Етіологія ПК, як і їхнє клінічне значення, залишається нез'ясованим. Більшість наукових досліджень пов'язують розвиток як СА, так і ПК з присутністю запалення та розглядають їх як ускладнення хронічного простатиту [83-84]. До етіологічних факторів розвитку ПК також можна віднести порушення ембріонального розвитку, зокрема закладки ПЗ та сім'яних міхурців [85]. Ramirez С. Т. у своїх дослідженнях виявив, що ендogenous ПК мають здебільшого округлу чи овальну форму, діаметр від 0,5 до 4,0 мм, гладку поверхню та варіабельний колір (від жовто-коричневого до яскраво-червоного). Їхня структура представлена шарами органічних речовин (холестерол, білки) з накопиченням неорганічних речовин (зокрема, апатиту) [86]. Хімічний склад мінерального компоненту ПК є гетерогенним та неоднорідним. Вони містять у своєму складі оксалат кальцію, карбапатит, уріцит, фосфат кальцію, аммоній-магнію фосфат гексагідрат та їхнє поєднання [8, 87-88].

У більшості випадків присутність ІЛВ не спричиняє розвитку клінічних симптомів. Однак встановлено, що у пацієнти з присутністю ПК відмічається зниження ефективності антибактеріальної терапії з приводу хронічного бактеріального простатиту [89-90] та можливий розвиток больового

синдрому [8]. Повідомлення щодо можливого впливу ІЛВ на розвиток злоякісних новоутворень ПЗ є суперечливими та не вказують на достовірні зв'язки між ними та РПЗ [9, 91]. Таким чином, патоморфологічний вплив ІЛВ на тканину ПЗ та РПЗ є невивченим.

1.3 Молекулярно-біологічне підґрунтя теорії розвитку кісткових метастазів “seed and soil” при злоякісних новоутвореннях ПЗ

Особливості метастазування РПЗ до кісток

Під час метастазування РПЗ та інших злоякісних неоплазій, зокрема раку молочної залози, відмічається переважне ураження кісткової тканини. Саме на вказані патології припадає до 80 % кісткових метастазів. [92]. Цікаво, що інші злоякісні новоутворення не мають подібної остеотропності [93-94]. Стефан Педжет, англійський хірург, вперше відмітив феномен колонізації пухлинними клітинами саме тих тканин, які можуть підтримувати їх життєдіяльність за рахунок сприятливого мікрооточення. Незважаючи на численні проведені дослідження, ця теорія не втратила актуальність, в тому числі і по відношенню до РПЗ [95].

Джеймс Юїнг також відмічав вкрай важливе значення кровоносних та лімфатичних судин на розвиток метастазів [95].

На сьогодні превалує думка, що червоний кістковий мозок, як один з основних компонентів кісткової тканини, має безпосередній вплив на процеси життєдіяльності пухлинних клітин. За рахунок значної кількості факторів росту, цитокінів, адгезинів, біологічно активних речовин, та метаболічних факторів, зокрема зниженої кислотності та концентрації кисню, гіперкальціємії в стромальному його компоненті, відбувається підтримка життєдіяльності пухлинних клітин та їх взаємодія з оточуючою тканиною [96-97].

Виділяють два основні типи розвитку метастатичних вогнищ у кістковій тканині: остеолітичні та остеобластні, за яких відбувається остеогенез. Саме останній варіант патологічного враження кісткової тканини

є характерним для РПЗ [98-99]. Однак ця кістка є неправильно сформованою та має схильність до розвитку переломів, в тому числі патологічних [100].

За ініціюючої стадії розвитку метастатичного вогнища, відбувається руйнування кісткової тканини. Це призводить до вивільнення пулу біологічноактивних речовин, зокрема інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF1) [101-102]. Також повідомляється про підвищення вмісту ендотеліну-1 у сироватці пацієнтів з метастатичним враженням кісток, що підтверджує підсиленням остеогенезу за рахунок проліферації остеобластів [103-104].

У ході експериментальних досліджень на живих організмах було показано, на тлі остеопорозу відбувається зниження схильності РПЗ до розвитку кісткових метастазів [105]. Ракові клітини також мають схильність до активації остеобластів BMP 1-залежним шляхом [106]. Повідомляється, що їх активація також відбувається за дії інших сполук, зокрема ПСА та UPA, шляхом розщеплення IGF-зв'язуючих протеїнів, що призводить до його вивільнення та підвищення його концентрації. Також була показана здатність ПСА взаємодіяти та пригнічувати функцію паратгормон-зв'язаних протеїнів, що призводить до інгібування остекластогенезу і деструкції кісткової тканини [107-109].

Статеві стероїдні гормони мають виражений анаболічний вплив на кісткову тканину [110-111]. Це підтверджується даними, що гіпоандрогенні чоловіки, як і жінки в менопазі, мають схильність до розвитку остеопорозу [112].

Бластний тип розвитку метастазів РПЗ, на відміну від інших первинних злоякісних пухлин, підтверджує зв'язок з андрогенами, які також експресуються в ядрах остеобластів [113]. Було показано, що за їх відсутності відбувається зниження кісткової маси, а також пригнічення функції остеобластів через інгібування sRANKL [114-116]. Здатність андрогенів до конформаційних змін може супроводжуватися його перетворення до естрогенів, які можуть взаємодіяти з рецепторами

остеобластів та остеокластів. Усі зазначені фактори і зумовлюють пригнічення явищ остеопорозу та сприяють утворення ОПГ в остеобластах.

Чутливість до стероїдних гормонів

Чоловічі стероїдні гормони необхідні для забезпечення нормальної життєдіяльності передміхурової залози та є есенціальними для її клітин [117]. Андрогени реалізують свої біологічні ефекти за рахунок взаємодії зі специфічними рецепторами (AR). Основними джерелами тестостерону є яєчка (клітина Лейдіга) та надниркові залози (синтезують до 10 % тестостерону сироватки крові) [118-120]. Клітини ПЗ мають здатність до перетворення тестостерону в дигідротестостерон, що підвищує його біологічну активність [121]. У ході активації AR відбувається їх розщеплення, після якого внутрішньоклітинний домен мігрує до ядра клітини. Результатом цього стає синтез ПСА, що відбувається під дією генів KLK 3, NKX3-1, KLK2 та STEAP2, а також за участі інших регуляторних генів: NOXB13, FOXA1 та ін. [122].

Було показано, що неопластичні клітини на початкових етапах злоякісного росту мають виражену чутливість до стероїдних гормонів. Це стало основою під час розробки первинних схем його лікування. Однак згодом було показано, що з часом чутливість до дії андрогенів, як і синтез AR у неопластичних клітинах знижується, що є проявом пухлинної прогресії. У результаті розвивається андроген-резистентний РПЗ [123-125]. Таким чином можна стверджувати про залежність між здатністю РПЗ синтезувати AR і ступенем його злоякісності. Незважаючи на це, навіть у тканині кастраційно-резистентного РПЗ відмічається підвищена присутність стероїдних гормонів, які можуть мати аутокринну дію [126].

Відсутність чутливості РПЗ до дії стероїдних гормонів пов'язана зі структурними змінами власне AR, що можуть бути спричинені їх ізомеризацією, мутаціями та збільшенням кількості копій відповідного гену [127]. Подібні AR не мають функціональної активності. Цікаво, що

ушкоджені AP не приймають участі у функціонування нормальної ПЗ чи за доброякісної її гіперплазії. [128].

Нещодавно було показано про можливість комбінованої взаємодії чоловічих та жіночих статевих гормонів під час розвитку злоякісних пухлин. Відомо, що з віком у чоловіків відбувається зниження синтезу андрогенів, при тому, що рівень жіночих статевих гормонів зростає або залишається постійним [129]. Біологічний ефект активації α ER полягає в підвищенні мітотичної активності епітеліоцитів залоз ПЗ, тоді як β ER пригнічують проліферацію та відповідно злоякісний ріст, а рівень їх експресії залежить від ступеню злоякісності пухлини [130-131]. Було показано, що на відміну від нормальної тканини ПЗ, у злоякісних пухлинах відмічається зниження експресії рецепторів до естрогенів. Рівень синтезу α ER також має пряму залежність від ступеню диференціювання пухлин та присутні як у пухлинних клітинах, так і в пухлинній стромі [132]. У дослідженнях Pisolato R. та ін. було показано поєднання варіабельності локалізації та алельності ізоформ рецепторів до естрогенів, що може впливати на функціонування сигнального шляху ERK1/2 у клітинній лінії РПЗ РС-3 [133].

Остеобластичні маркери у РПЗ

Остеонектин (ОСН), або SPARC має виражену здатність до зв'язування кальцію та відноситься до матричних білків [134-135]. За організацією він є глікопротеїдом зі спіральною структурою та має здатність до вибіркового зв'язування з вуглеводами [136-137].

Повідомлялося про його можливу участь у процесах біомінералізації, на вказує його значний вміст у кальцифікованих тканинах. Termine J. J. D. та ін. показали, що на цьому біологічні функції ОСН в організмі не обмежуються і він має значно ширший спектр біологічних ефектів [138]. Було відмічено, що присутність ОСН часто поєднується з колагеном I типу. Це пов'язано зі здатністю ОСН до специфічної одночасної взаємодії як з кальційвмісними біомінералами (гідроксиапатитом), так і з фібрилярною

структурою білку, що забезпечується С- та N-доменами молекули білку [139-140]. Це обумовлює його присутність та безпосередню участь під час формування кісткової тканини та біомінералізації [138]. Вплив цього білку також поширюється на процеси клітинного поділу та міграції, зміни структурних особливостей пухлинної стромы, ріст кровоносних судин [141-142]. Це обумовлене здатністю фібробластів та ендотеліоцитів синтезувати ОСН, який може чинити аутокринну дію [143]. Було показано, що тромбоцити та макрофаги здатні продукувати ОСН у вогнищах хронічного запалення [144-146].

На сьогодні залишаються невідомими молекулярні механізми участі ОСН у перебігу злоякісних пухлин, зокрема РПЗ, оскільки більшість вчених акцентують увагу саме на остеогенному впливі цього протеїну. Було показано, що у РПЗ біологічний потенціал ОСН реалізується шляхом стимуляції клітинного росту, що призводить до підвищення ступеня злоякісності пухлини, а відтак і збільшує вірогідність розвитку метастазів [147]. За даними Ruela-Agispe M. L. та ін. це пов'язано зі зниженням здатності пухлинних клітин до адгезії, що проявляється зміною їх тинкторіальних властивостей, підвищенням їх міграції. Таким чином було пояснено те, що у 30 % випадків РПЗ відмічається присутність ОСН, тоді як для незміненої ПЗ цей білок є нехарактерним [148].

Відмічається пряма залежність між ступенем диференціювання РПЗ за шкалою Глісона та вмістом фібрилярного колагену I та білків, необхідних для його синтезу [149]

Також повідомлялося про зв'язок між присутністю ОСН та підвищеною експресією матриксних металопротеїназ. Це може впливати на процеси розвитку та формування кісткових метастазів, що також також характеризується їх гіперекспресією [150].

Роль MMP1 у прогресуванні РПЗ

MMP1 є матриксною металопротеїназою, яка здатна руйнувати колагени [151-152]. Продукція цього ферменту відбувається у пухлинній тканині в ході її розвитку та підвищення ступеню злоякісності [153]. Саме за її дії відбуваються зміни фенотипу ракових клітин, що підвищує їх злоякісний потенціал [154-156]. Експериментальне пригнічення утворення MMP1 за рахунок BMP6 супроводжувалося зниженням метастатичного потенціалу пухлинних клітин [157]. MMP1 має здатність також впливати на інвазію пухлинних клітин та розвиток кровоносних судин, що може бути спричинено її взаємодією з PAR1 та MAPK [158]. Як і ADAMTS-1, MMP1 може спричиняти деструкцію кісткової тканини під час їх метастатичного ураження [159]. Активація ERK/cFos та JNK/cJun з промотором MMP1 показує на зв'язок між синтезом MMP 1 та RANK. Однак пригнічення цих механізмів супроводжується зниженням остеолізу та присутності остеокластів. Таким чином, було показано, що ракові клітини мають властивість продукувати MMP1. Цей біологічний ефект зумовлює підвищений метастатичний потенціал неопластичних клітин РПЗ та високий ступінь його злоякісності [160-161].

Білки теплового шоку та РПЗ

Функціональна активність будь-яких білків потребує підтримання їх просторової структури, що забезпечується суперсімейством білків-шаперонів, до яких відносяться зокрема і білки теплового шоку [162-163]. Hsp70 та Hsp90 є найбільш дослідженими представниками цього суперсімейства. Їхні біологічні функції полягають в участі у поділі, дозріванні та пухлинній трансформації клітин [164]. Також повідомлялося про те, що вони можуть брати участь у пригніченні запрограмованої загибелі клітин, зниженні чутливості ракових клітин до протипухлинних препаратів та в розвитку імунних реакцій [165]. Підвищення виживаності пухлинних клітин обумовлюється блокуванням активації каспаз цими білками. Це

створює умови для персистенції мутованих клітин, в тому числі які мають вищий злоякісний потенціал, що створює умови для подальшого прогресування хвороби [166].

Підвищений синтез БТШ епітеліальними пухлинними клітинами є прогностично-несприятливим фактором [167]. Поєднання кількох білків за участі Hsp90 (комплекс FKBP51-Hsp90-p23) є важливим у процесах пухлинної прогресії. Так, ця сполука взаємодіє з AP і сприяє проліферації клітин, що також супроводжується зниженням кількості Hsp70 [168-169]. Проте існує і протилежна думка щодо участі цих білків у пухлинній прогресії РПЗ. Так, БТШ низької молекулярної маси (такі як Hsp27) можуть бути використані як показники рецидивного потенціалу пухлини [170].

Незважаючи на відсутні доказки прямого впливу сімейства Hsp на процеси мінералоутворення, вони були виявлені у складі кальцифікованих структур. Було продемонстровано, що Hsp70 у значній кількості міститься у біомінералах сечовидільної системи людини та виконує роль матричного білку [171]. Повідомлялося також, що Hsp70 разом з OPN можуть зумовлювати трансформацію структури конкрементів та зниження їх біологічних ефектів [171-172]. Також була показана безпосередня участь Hsp70 у розвитку та дозріванні мультипотентних клітин сполучної (мезенхімальної) тканини та остеогенезі за рахунок його взаємодії з лужною фосфатазою. Цей біологічний ефект реалізується за допомогою ERK каскаду. Однак слід відмітити, що подібний сценарій є можливим лише за його концентрації в позаклітинному матриксі, яка перевищує 200 нг/мл [173].

Як і Hsp70, Hsp90 також бере участь у процесах кальцифікації, що відбуваються у сечостатевої системі. Було показано, що він має виражену здатність до специфічного приєднання іонів кальцію. Дослідження цього процесу виявило наявність Hsp90 в ендоцитозних везикулах ендотелію [174]. Також є дані, що Hsp90 має вплив на процеси внутрішньоклітинного обміну кальцію. Функціональна активність протеїну Hsp90 обумовлена наявністю АТФ-зв'язувального сайту, який призводить до дефіциту АТФ всередині

клітини. Це супроводжується деактивацією білків кальцієвих мембранних каналців та накопиченням іонів Ca^{2+} в клітині [175]. Також є протилежні дані про те, Hsp27 може інгібувати процеси біомінералізації кісткової тканини шляхом пригнічення остеокальцину в остеобластах.

Апоптоз та ангіогенез у тканині РПЗ

Програмована загибель клітин може бути активована за внутрішнім (мітохондріальним) та зовнішнім механізмами [177]. Екстрацелюлярна активація відбувається за рахунок TNF-рецепторів (Fas, TRAIL), активація яких призводить до вивільнення та набуття функціональної активності каспази 8, яка послідовно активує каспази 3, 6 та 7 [178]. Vcl-2-індукований апоптотичний шлях провокується оксидативним стресом, пошкодженням спадкового матеріалу клітини, дисбалансом внутрішньоклітинних регуляторних механізмів та ін. [179-180].

Білок p53 має виражений пригнічуючий вплив на апоптоз за рахунок його здатності гальмувати клітинний цикл. Це реалізується шляхом взаємодії з Вах та підвищенням проникності зовнішньої мітохондріальної мембрани [181-182]. Вказані біологічні ефекти є характерними для так званого дикого типу білку p53, який є характерним для нормальних клітин. Більшість же неопластичних клітин характеризуються експресією мутантного p53. Між мутантним і диким варіантом p53 має місце конкурентна взаємодія. Тому вважається, що синтез пухлинною клітиною мутантного варіанту p53 зумовлює підвищену виживаність неопластичних клітин, зміну їх проліферативного потенціалу та зростання ступеню злоякісності пухлини [183]. Це призводить до погіршення прогнозу перебігу захворювання, нівелює ефект хіміо- та радіотерапії [184].

Каспаза 3-го типу є рушієм апоптотичного процесу. У функціонально-неактивній формі вона має молекулярну масу 32 кДа та складається з p12 та p17 субодиниць. Зазначені мономери формують функціонально-активний ензим, який утворюється за аспартатним шляхом [185]. Саме тому каспаза 3-

го типу, а особливо активована її форма, може слугувати в якості критерію оцінки апоптотичного потенціалу злоякісних пухлин [186]. Апоптоз, обумовлений зовнішньоклітинними чинниками (в тому числі, bcl-2-асоційований) також супроводжується утворенням активної форми білку каспаза 3, що відбувається через Araf-1 та цитохром-С-опосередковані шляхи та супроводжується утворенням специфічного мембранного утворення – апоптосоми [187].

Вах є Bcl-2-залежним протеїном. За участі його активованої форми відбувається перебудова та втрата стабільності мембрани мітохондрій, що проявляється підвищенням її проникності та формуванням специфічних структур – пор, виходом у цитоплазму цитохрому С та активацією окисних процесів. Зазначені фактори призводять до порушення обміну кальцію в клітині [188-189]. Це є центральною подією в процесі загибелі клітини. Ось чому Вах вважається однією з основних ефекторних молекул як запрограмованої, так і некротичної загибелі клітин [190]. Слід також наголосити на здатності Вах взаємодіяти з каспазою 3-го типу, таким чином стимулюючи апоптоз за цим шляхом [191]. Окрім того, було продемонстровано, що Вах може взаємодіяти з генами Bcl-2 та Bcl-XL, які мають виражений супресивний ефект на апоптоз. Таким чином відбувається підсилення та потенціювання його дії [192]. Саме тому комбінація Bcl-2/Вах є дуже цікавою в рамках можливого її використання в якості цілі для нових хіміотерапевтичних препаратів. Вважається, що подібний вплив призведе до підвищення рівня апоптозу в пухлинах [193-194]. Існують повідомлення про позитивний досвід використання стимуляторів Вах для лікування злоякісних пухлин молочної залози [195]. Однак на сьогодні недослідженими залишаються питання зв'язку кількості Вах-позитивних клітин з присутністю кальцифікатів у тканині простати. Також недостатньо інформації про його вплив на процеси метастатичного поширення пухлини.

Пухлинний неоангіогенез є одним з ключових процесів росту та прогресії злоякісних пухлин, в тому числі РПЗ. Було показано значну

присутність фактору росту ендотелію судин в неопластичній тканині простати [196]. Накопичено багато інформації про участь VEGF у різноманітних проліферативних процесах [197-199]. Сума біологічних властивостей VEGF та його ізоформ (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E та PlGF) обумовлюється взаємодією з тирозинкіназовими рецепторами (VEGFR-1, VEGFR-2 та VEGFR-3) [200-201]. Серед них можна виділити ключову комбінацію між VEGF-A та VEGFR-2 яка має значну роль в прогресії РПЗ. Значні проліферативні ефекти у пухлинній тканині здійснюються через послідовність внутрішньоклітинних реакцій фосфорилування. У цій взаємодії має місце активація PI3K, Akt/PKB, NF-κB, p38MAPK, RAS, МАК та ERK [202]. Вивчення на експериментальних тваринах підтвердило ауто- та паракринні ефекти VEGF у кістках скелету. Судинний фактор росту має свій вплив на процеси хемоаттракції, росту, дозрівання та специфічні функції клітин кісткової тканини [203]. Тканина метастазу РПЗ порушує рівновагу між процесами остеолізу та остеогенезу завдяки здатності його клітин до синтезу VEGF. Таким чином можна пояснити утворення саме остеобластичних метастазів РПЗ. [204-205]. Саме тому синтез VEGF у клітинах РПЗ підтримує їх життєдіяльність та супроводжується проліферацією злоякісних клітин, розпочинає та підтримує розвиток кровоносних судин, призводить до підвищення ступеню злоякісності неоплазії та пухлинної прогресії [202].

Роль запалення в розвитку кісткових метастазів

Було встановлено, що запалення у тканині РПЗ призводить до порушення цілісності ДНК, сприяє росту і розмноженню клітин і судин, перебудові клітинного та позаклітинного матриксу [206-207]. Однак був виявлений і інший механізм взаємодії запалення та прогресії РПЗ.

Початкова ланка розвитку метастазів РПЗ полягає у епітеліально-мезенхімальній трансформації, що супроводжується послабленням міжклітинних контактів [208]. Таким чином підвищується мобільність

пухлинних клітин і їх здатність проникати до кровоносних судин та метастазувати [209]. CD68⁺ макрофаги є важливими учасниками цього процесу, саме тому їх значна кількість є прогностично-несприятливим фактором пухлинної прогресії РПЗ [210]. Клітини запальних імунних інфільтратів продукують низку біологічно-активних речовин, серед яких можна виокремити TNF α та ІЛ6, продукція якого залежить від активації NF- κ B нуклеарного фактору [211-2012]

Клітини кровоносних судин у запальних інфільтратах здатні синтезувати Р- та Е-селектини, внутрішньоклітинні адгезини та VCAM1. Ці протеїни є лігандами до (С-Х-С) (CXCR) 4/6/7 (CXCR4/6/7) хемокінів, α v β 3 інтегрину, RANK, CD44 та аннексину 2, що виділяються пухлинною тканиною. Специфічна їх активація дозволяє пухлинним клітинам щільно з'єднуватися з внутрішнім клітинним шаром судин, що сприяє їх переміщенню та прикріпленню в судинах кісток. [213]. Тому вважається, що за цих умов циркулююча в крові пухлинна клітина може знайти відповідну нішу в кістковій тканині та колонізувати її [214].

Отже, життєдіяльність та функціонування неопластичної тканини РПЗ характеризується наявністю значної кількості міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій. Незважаючи на значну кількість публікацій, присвячених цій патології, питання остеотропізму метастазів РПЗ та механізмів їхнього розвитку є вкрай актуальним та недостатньо вивченим. Особливу увагу до себе привертає відсутність досліджень ІЛВ у тканині РПЗ, незважаючи на значну частоту їхнього виявлення. Публікації, що вказували б на зв'язок між ІЛВ та розвитком кісткових метастазів, а також дослідження щодо їхнього впливу на зміну імунофенотипу РПЗ на сьогодні також відсутні. Низька висвітленість цих питань, а також відсутність методів оцінки ризику розвитку ускладнень є актуальною проблемою сучасної патології. Саме тому метою нашої роботи стало всебічне вивчення морфологічних та імуногістохімічних особливостей РПЗ за присутності ІЛВ,

а також з'ясування їхнього впливу на імунофенотип пухлинних клітин та розвиток метастазів.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:

[229]

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота виконана в Сумському державному університеті на кафедрі патологічної анатомії.

Протокол комісії етики. Дослідження було схвалене етичним комітетом Медичного інституту СумДУ (протокол № 1/1 від 08.04.2019 р.). Усі дослідження виконані згідно з Гельсинською декларацією (6-те видання, перегляд 2008 р., м. Сеул) та Універсальною декларацією біоетики та прав людини (2006 р.).

2.1 Зразки пухлин тканини ПЗ

Усі випадки РПЗ були обстежені клінічно та морфологічно (пункційна біопсія). Усім хворим було проведене хірургічне лікування в урологічних відділеннях СОКЛ, СМКЛ №1 чи СОКОД.

Для дослідження були вивчені 968 препаратів пухлинної тканини. Матеріал був представлений біопсійно-операційними зразками. Встановлено, що прояви патологічної біомінералізації спостерігалися у 27,27 % досліджених препаратів. Для дослідження було відібрано 60 зразків тканини: 30 зразків РПЗ з біомінералізованими ІлВ (І група) та 30 зразків РПЗ без ІлВ (ІІ група). Формування груп дослідження також передбачало включення ідентичних за морфологічним типом та ступенем диференціювання пухлин, що забезпечувало максимальну подібність між ними: 15 зразків РПЗ із сумою балів за шкалою Глісона від 6 (3 + 3) до 7 (3 + 4) та 15 зразків пухлинної тканини із сумою балів від 7 (4 + 3) до 10 (5 + 5). Проаналізовані клінічні дані дали змогу встановити та розподілити досліджувані випадки за класифікацією TNM, що дозволило оцінювати ступінь місцевого поширення пухлини, поширення її до регіонарних лімфатичних вузлів та розвитку віддалених метастазів (табл. 2.1). Також вивчалися результати УЗД та патогістологічні заключення.

Таблиця 2.1 – Розподіл випадків РПЗ I та II групи за клінічною класифікацією TNM. Числа вказують абсолютну кількість випадків

Клінічна стадія		I група $n = 30$	II група $N = 30$
Показник T	T_2	6	14
	T_3	24	16
Показник N	N_0	23	29
	N_1	7	1
Показник M	M_0	16	22
	M_1	14	8

2.2 Гістологічний та гістохімічний методи

Увесь біоопсійний та операційний матеріал спершу був фіксований протягом 24 годин у 10 % нейтральному формальдегіді. Уся подальша його обробка (дегідратація та просочування парафіном) проводилася на апараті карусельного типу «АТМ-4М» (Україна). Послідовні тонкі зрізи парафінових блоків (товщина 4×10^{-6} м) виконувалися на ротаційному мікротомі Shandon Finnesse 325 («Thermo Scientific», США). Депарафінування фіксованих на предметних скельцях гістологічних зрізів проводилося за допомогою двох змін диметилбензолу, а їх гідратація – за допомогою водних розчинів етанолу низхідної концентрації. Гістологічне дослідження полягало у забарвленні підготованих гістологічних препаратів гематоксиліном еозином та використання гістохімічних фарбників алізаринового червоного S (модифікація забарвлення за МакГі–Расселом), альціанового синього (з диференційною обробкою препаратів розчинами оцтової кислоти з рН 1,0 та 2,5), конго червоного та реакції фон Косса і PAS-реакції.

Під час мікроскопічного дослідження враховували такі характеристики РПЗ: гістологічний тип будови (згідно з класифікацією ВООЗ), тип кальцифікації, наявність метастазів, особливості васкуляризації. Дослідження нативних мікропрепаратів у люмінесцентному (довжина хвилі

збудження 495 нм) та циркулярному поляризованому світлі проводили за допомогою мікроскопів Zeiss Axio Imager Z1 і Leica DM4B відповідно.

2.3 Імуногістохімічне дослідження тканини РПЗ

Послідовні тонкі гістологічні препарати (товщина 4×10^{-6} м) були змонтовані на адгезивних предметних скельцях SuperFrost («Thermo Scientific», США) та підлягали температурній обробці впродовж 18 годин за температури 37 °С, що призводило до повного видалення вологи та кращої їх адгезії до поверхні скельця. Депарафінізація та гідратація гістологічних препаратів проводилося з використанням серії диметилбензолів та етилового спирту низхідної концентрації.

Подальша обробка препаратів полягала у демаскуванні антигенів формальдегід-фіксованої тканини. Для цього препарати обробляли у 10 мМ розчині цитратного буферу (рН 6,0) за температури 95–98 °С протягом 30 хв. Для візуалізації результатів імуногістохімічного дослідження застосовували систему детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer» (Thermo Scientific), що передбачала блокування ендогенної пероксидазної активності 3 % перекисом водню, блокування неспецифічного фонового фарбування з використанням «Ultra V Block», посилення реакції за допомогою «Primary Antibody Amplifier Quanto». Як хромоген використовувався діамінобензидин (DAB). У дослідженнях використана така панель антитіл: Rb a-Hu Collagen I (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США), Мо a-Hu Collagen II Ab-2 (*Clone 2B1.5*) («Thermo scientific», США), Bb a-Hu MMP-1 (Collagenase-1) Ab-6 (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США), Мо a-Hu Osteonectin/SPARK (*Clone 5031*) («Thermo scientific», США), Rb a-Hu Androgen Receptor (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США), Мо a-Hu Heat Shock Protein 70 (HSP70) Ab-2 (*Clone W27*) («Thermo scientific», США), Мо a-Hu CD68 (*Clone KP1*) («Thermo scientific», США), Rb a-Hu VEGF (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США), Rb a-Hu Myeloperoxidase (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США), Rb a-Hu HSP86 (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США), Rb a-Hu p53 (*Clone Y5*) («Thermo scientific», США), Rb a-Hu Bax (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США), Rb a-

Nu Caspase 3 (*Polyclonal*) («Thermo scientific», США). В якості контролю якості проведеного ІГХ дослідження проводили активний (використання тканини, з попередньо встановленою позитивною та негативною реакцією) та пасивний контроль отриманих результатів.

Проведення морфометричних досліджень складових елементів мікропрепаратів проводили за допомогою морфометричної програми «Zen 2.0». Кількість імунопозитивних клітин визначали в 6 відокремлених полях зору діаметром 1 000 мкм у кожному препараті. Для встановлення характеристик експресії маркерів без чітких патернів локалізації (Col I та Col II) був використаний метод аналізу площі експресії. Для цього в середовищі програми ImageJ виділяли фрагменти мікрофотографії з позитивним ІГХ-забарвленням та співвідносили його площу із загальною площею препарату.

2.4 Сканувальна та просвічувальна електронна мікроскопія

Із підготованого парафінового блоку тканини виготовляли гістологічні зрізи товщиною 12×10^{-6} м, які розміщували на предметному столику зі спектрально чистого графіту. Для максимального прикріплення біологічного матеріалу до предметного столика та розплавлення парафіну зрізи витримували в термостаті за температури 60 °С впродовж 30 хв. Для видалення парафіну зразки покривали ксилолом тричі по 3–4 хв, а потім – 96 % етанолом тричі по 5–6 хв та споліскували дистильованою водою. Після цього зразок біологічного матеріалу додатково заземляли струмопровідним скотчем, який обгортали навколо предметного столика. Виготовлені препарати досліджували на сканувальному мікроскопі PEMMA-100У з енергодисперсійним рентгенівським спектроскопом (SELMІ, Україна). Обробляли спектрометричну інформацію за допомогою штатного програмного забезпечення системи мікроаналізу. Просвічувальна електронна мікроскопія була проведена на електронному мікроскопі ПЕМ-125 К (SELMІ, Україна).

2.5 Фізико-хімічні методи дослідження

Вивчення біомінералів за допомогою методів прикладного матеріалознавства було проведене в лабораторії Інституту прикладної фізики НАН України (завідувач – канд. фіз.-мат. наук С. М. Данильченко).

Мінеральну складову відокремлювали від м'яких тканин депозиту шляхом термічного оброблення в електropечі (на повітрі) за t 200 °C впродовж 1 години. Відбувалося руйнування органічної частини депозиту і видалення вільної води при збереженні незміненої структури мінералу. Після такого низькотемпературного відпалювання здебільшого тверді частинки мінералу можна було легко відокремити механічно від золи органічних тканин. Також проводили оброблення матеріалу за 900 °C впродовж 1 години, що дозволяло повністю розділити органічну та неорганічну фази біомінералів.

Рентгенодифракційне дослідження (XRD) структури матеріалів виконане на дифрактометрі ДРОН4-07 («Буревісник», Росія) з використанням випромінювання $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154$ нм) за умов фокусування за Бреггом – Brentano ($\theta-2\theta$) (2θ – бреггівський кут). Зразки знімали в режимі безперервної реєстрації (швидкість $2\theta/\text{хв}$) в діапазоні кутів 2° від 10° до 70° . Попереднє оброблення експериментальних результатів було проведене в програмному пакеті DIFWIN-1 (ТОВ «Еталон ВТЦ»), ідентифікація кристалічної структури і фазового складу – за допомогою програмного пакета Crystallographica Search-Match (Oxford Cryosystems).

Інфрачервона спектроскопія (IRS) була виконана на Фур'є-спектрометрі Spectrum-One (PerkinElmer, USA, 2003). Перед дослідженнями зразки у вигляді порошку змішували з порошком KBr (3,0 мг зразка на 300 мг KBr) і спресовували в таблетки. Вимірювання та аналіз спектрів виконували з використанням штатного програмного забезпечення приладу.

2.6 Статистичний аналіз

Для дослідження епідеміологічних особливостей РПЗ серед населення Сумської області були використані дані відділу статистики Сумського

обласного онкологічного диспансеру, Сумського обласного канцер-реєстру та Національного канцер-реєстру України. Для статистичного аналізу показників захворюваності на РПЗ в Сумській області були використані середній показник захворюваності X_c , стандартне відхилення σ та середня похибка m .

Результати морфометричних вимірювань тканини ПЗ та дані ІГХ-дослідження були перевірені на нормальний розподіл (НР) за допомогою критерію Шапіро – Вілка (Shapiro – Wilk). У разі ненормального розподілу цифрових показників для оцінювання статистичної значущості використовували критерій Манна – Уїтні (Mann – Whitney).

Якщо вибірки даних мали правильний розподіл, їх порівнювали за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента за умови підтвердження випадковості розбіжностей ($F_{\text{крит}} > F_{\text{експ}}$) згідно з критерієм Фішера. Якщо $t_{\text{експ}} \geq t_{\text{крит}}$, то відмінність вважали достовірною.

РОЗДІЛ 3

ЕПІДЕМІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РПЗ У СУМСЬКІЙ ОБЛАСТІ

Для епідеміологічної оцінки РПЗ були проаналізовані показники Національного канцер-реєстру, Сумського обласного канцер-реєстру та відділу статистики Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру за період з 2010 по 2017 роки. Аналіз даних вказує на те, що первинна захворюваність на РПЗ в Україні знаходиться стабільно на високому рівні з тенденцією до зростання (рис. 3.1).

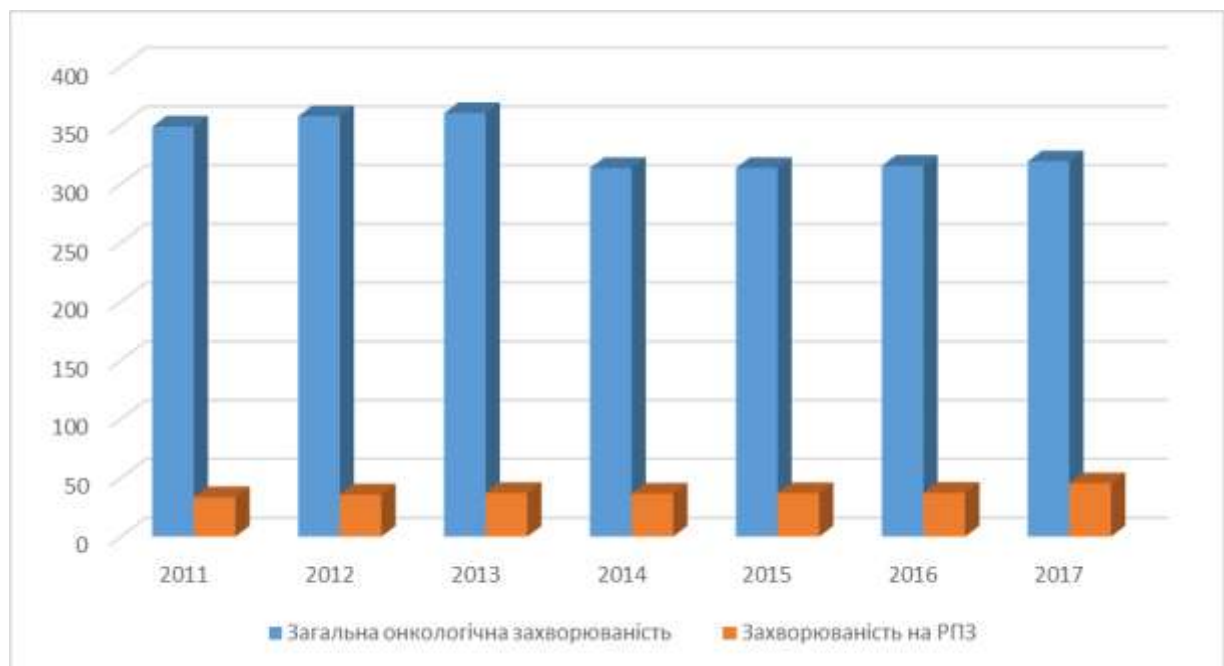


Рисунок 3.1 – Захворюваність на РПЗ та загальна онкологічна захворюваність населення України у 2011-2017 роках (на 100 тис. населення)

Основними причинами зростання захворюваності є підвищення якості надання медичних послуг, впровадження скринінгових програм щодо виявлення РПЗ, широке використання малоінвазивних методів діагностики (серологічне визначення рівня ПСА, УЗД). До факторів, які зумовлюють зростання показників захворюваності також слід віднести погіршення

екологічного стану навколишнього середовища, зміну вікової структури населення з тенденцією до переважання старшої вікової групи.

Впродовж 2010-2017 років в Сумській області спостерігався стабільно високий рівень захворюваності на РПЗ, який складав в середньому $34,48 \pm 3,48$ на 100 тис. на селення (табл. 3.1). У порівнянні із загальнодержавним показником ($36,79 \pm 1,39$ випадків на 100 тис. населення) достовірної різниці виявлено не було ($p > 0,05$). Тобто, показник захворюваності на РПЗ серед жителів Сумської області відповідає загальнодержавним показникам, однак також має тенденцію до зростання (рис. 3.2).

Таблиця 3.1 – Рівень первинної захворюваності у районах Сумської області впродовж 2010-2017 років на 100 тис. населення. X_c – середній показник захворюваності, σ – стандартне відхилення, m – середня похибка середнього арифметичного, - – відсутня інформація

№ з/п	Район	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	X_c	σ	m
1	Білопільський	33,20	40,70	49,20	33,20	29,40	17,00	42,90	30,2	34,48	9,85	3,48
2	Буринський	34,20	23,60	56,00	73,40	41,60	50,70	17,20	43,6	42,54	18,02	6,37
3	В. – Писарівський	30,60	30,90	-	42,20	53,50	54,50	44,20	67,1	46,14	13,27	5,02
4	Глухівський	27,80	11,00	11,20	33,80	41,90	34,60	38,90	43,3	30,31	12,83	4,54
5	Конотопський	20,70	8,80	19,50	26,70	25,10	30,60	23,60	43,9	24,86	10,03	3,55
6	Краснопільський	25,90	28,20	35,50	49,90	43,20	36,20	7,30	37,0	32,90	12,85	4,54
7	Кролевецький	24,10	16,10	37,90	27,30	27,60	67,00	33,90	51,5	35,68	16,44	5,81
8	Лебединський	24,60	18,10	18,20	36,90	56,30	42,50	57,20	52,8	38,33	16,52	5,84
9	Л. – Долинський	24,60	31,30	10,60	43,10	21,90	11,10	22,50	68,1	29,15	18,91	6,69
10	Недригайлівський	27,60	24,80	33,50	59,10	34,40	34,80	70,10	44,3	41,08	15,88	5,61
11	Охтирський	25,20	25,70	51,50	14,40	17,30	26,10	29,20	43,9	29,16	12,60	4,46
12	Путівльський	23,30	29,40	-	29,80	-	-	31,10	31,5	29,02	3,31	1,48
13	Роменський	28,60	21,70	30,30	16,90	22,80	37,60	35,30	14,8	26,00	8,31	2,94
14	С. – Будський	27,40	-	12,10	49,00	24,90	75,80	12,70	12,8	30,67	23,82	9,00
15	Сумський	21,30	13,60	20,30	16,90	47,50	40,90	44,20	60,7	33,18	17,32	6,12
16	Тростянецький	32,30	52,20	11,70	11,80	23,80	18,10	67,40	55,7	34,13	21,61	7,64
17	Шосткинський	27,60	24,10	22,00	42,20	51,50	29,40	29,70	48,3	34,35	11,34	4,01
18	Ямпільський	23,80	25,30	51,30	17,30	26,50	44,80	9,10	27,5	28,20	13,75	4,86
19	м. Суми	35,40	37,30	40,80	33,50	32,70	62,30	61,70	56,3	45,00	12,86	4,55
20	Сумська область	27,27	25,70	30,10	34,60	34,60	39,70	35,70	46,2	34,48	9,85	3,48

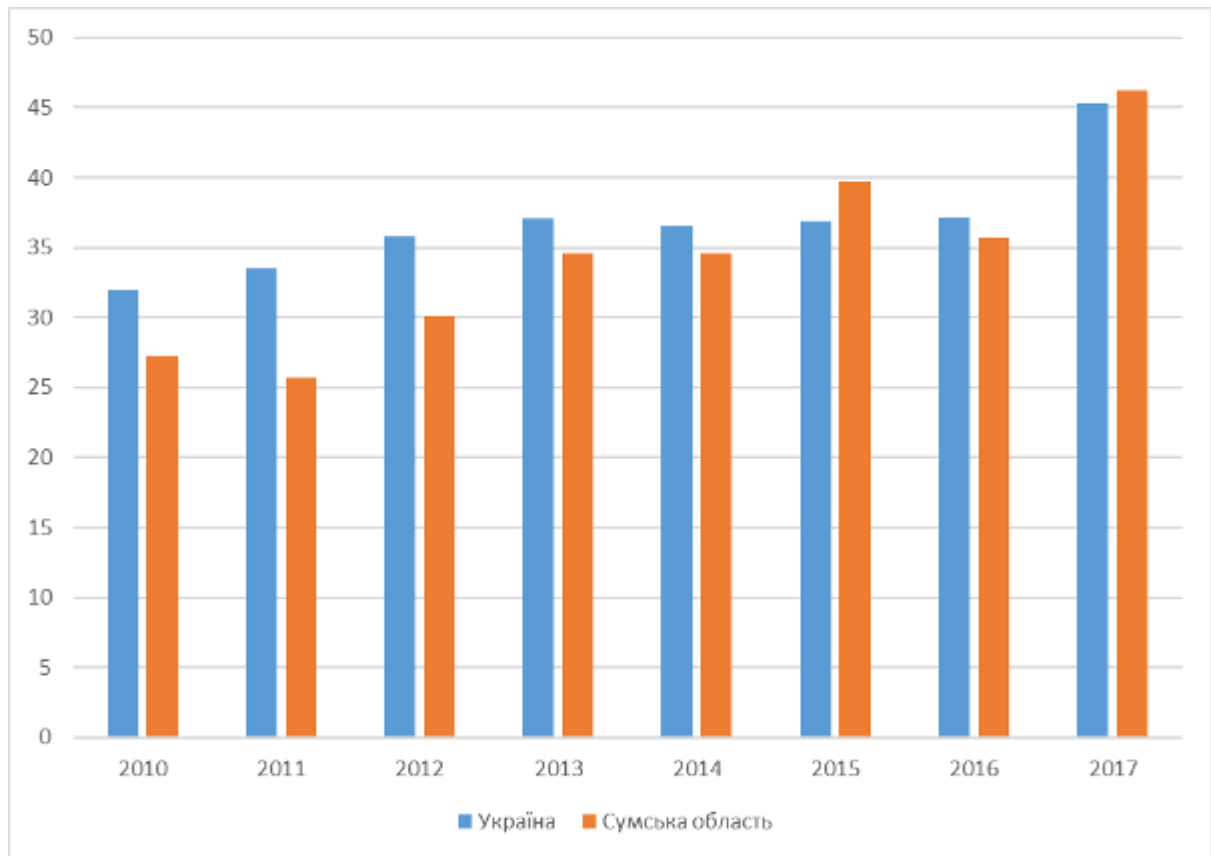


Рисунок 3.2 – Порівняння захворюваності на РПЗ в Україні та Сумській області впродовж 2010-2017 років (на 100 тис. населення), середні показники

До регіонів Сумської області з найвищою захворюваністю на РПЗ належать Великописарівський ($46,14 \pm 5,02$), Буринський ($42,54 \pm 6,37$), Недригайлівський ($41,08 \pm 5,61$), Лебединський ($38,33 \pm 5,84$) райони та м. Суми ($45,00 \pm 4,55$). Середні показники захворюваності на РПЗ у цих районах були вищими за загальнодержавні та поступово зростали впродовж періоду спостереження (2010-2017 рр.). Найнижчим рівнем захворюваності на РПЗ характеризувалися Конотопський ($24,86 \pm 3,55$), Роменський ($26,0 \pm 2,94$), Ямпільський ($28,2 \pm 4,86$), Путивльський ($29,02 \pm 1,48$) та Липоводолинський ($29,15 \pm 6,69$) райони Сумської області (рис. 3.3). Ці регіони також характеризувалися відсутністю значного коливання показників, хоча мали тенденцію до зростання.

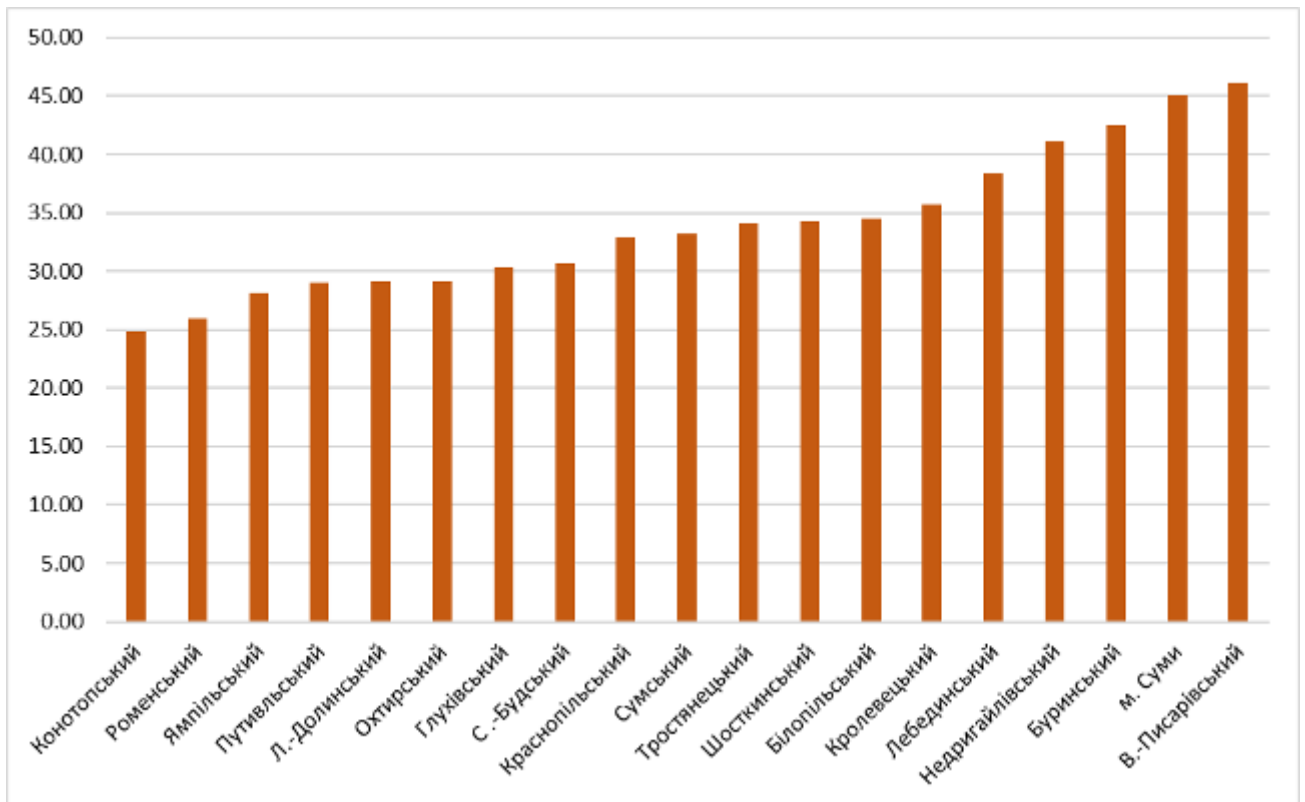


Рисунок 3.3 – Середні показники захворюваності на РПЗ в Сумській області у 2010-2017 рр. (на 100 тис.населення). Дані представлені за зростанням

За даними Національного канцер-реєстру України, за період з 2010 по 2017 роки в Сумській області було зареєстровано 1418 нових випадків РПЗ (в середньому $177,25 \pm 12,55$ випадків на 100 тис. населення у рік) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Захворюваність на РПЗ серед чоловічого населення Сумської області, абсолютна кількість випадків

Рік спостереження	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Кількість захворілих	140	135	158	164	171	209	208	233

Аналіз кількісних показників захворюваності на РПЗ серед районів Сумської області вказує на значну неоднорідність та варіабельність цих величин. Хоча Сумська область характеризується нижчим середнім рівнем захворюваності на РПЗ у порівнянні із загальнодержавними показниками, однак впродовж періоду спостереження дана різниця скорочується і у 2017

році цей показник був вищим за національний. Географічні відмінності між регіонами, концентрація хімічної та машинобудівної промисловості у південній частині Сумщини, а також відмінності у соціально-демографічному супроводі населення та їх комбінація можуть обумовити різницю рівнів захворюваності на РПЗ між районами Сумської області.

Таким чином, нами був проаналізований епідеміологічний статус РПЗ серед регіонів України та Сумської області. Були виявлені тренди у динаміці захворюваності на РПЗ, а також їхня територіальна залежність. Порівняння даного показника в Сумській області показало його відповідність до загальнодержавних значень. Також простежується динаміка до поступового зростання захворюваності на РПЗ як серед усіх регіонів Сумської області, так і України.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[221, 223]

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ РПЗ З БІОМІНЕРАЛЬНИМИ ІЛВ

4.1 Морфологічне дослідження зразків РПЗ з біомінеральними ІлВ

Середній вік пацієнтів даної групи становив $70,23 \pm 1,71$ років. Макроскопічна будова ПЗ характеризувалася наявністю цілісного або фрагментованого під час оперативного втручання органа. Зовні залоза була вкрита сполучнотканинною капсулою, яка у випадку поширеного РПЗ була щільно з'єднаною з оточуючою фіброзно-жировою тканиною. Форма ПЗ варіювала від округлої до неправильної, у деяких випадках встановити форму залози було неможливо у зв'язку з вираженим інфільтративним пухлинним ростом. Розмір органів варіював від 2,5 до 7,5 см діаметром. Поверхні фіксованих залоз мали світло-сіруватий колір, були бугристими та неоднорідними (рис. 4.1А).

На розрізі ПЗ були представлені рожево-сіруватою тканиною щільної консистенції з часточковою структурою. Також були виявлені прошарки білої тканини, яка мала високу щільність та пружність. Були присутні поодинокі крововиливи, кістозно розширені залози. Ці кісти мали округлу форму та діаметр від 0,1 до 1,0 см, були виповнені вмістом білуватого кольору.

Пухлини ПЗ мали вигляд відокремлених вузлів без чітких меж росту або суцільних пухлинних полів, що проростали до капсули чи оточуючих структур. В неопластичній тканині визначалися крововиливи, ділянки міксоматозу та некрозів. Ряд пухлин містили в собі порожнисті утворення, виповнені мутною рідиною жовтуватого кольору. У пухлинній тканині були присутні згруповані чи поодинокі розміщені включення сіруватого, жовтаво-брунатного чи білуватого кольорів. Під час секції тканини ПЗ даної групи під лезом ножа відчувався хрускіт у місцях, де були виявлені ці утворення. Їхня локалізація також відповідала переважно периферійним частинам органа.

Середній розмір макроскопічних ПК склав $0,37 \pm 0,06$ см та варіював від 0,1 до 0,8 см. Макроскопічні ПК, розміщені поодинокі, мали порівняно більший розмір, більш округлу форму та рівну поверхню. Для цих утворень був характерним більш світлий колір поверхні. ПК, які мали згруповане розташування та менший розмір, переважно мали полігональну, неправильну форму з великою кількістю заглиблень на поверхні (рис. 4.1Б). Тканина, що оточувала ПК, була ущільненою, з множинними ділянками крововиливів.

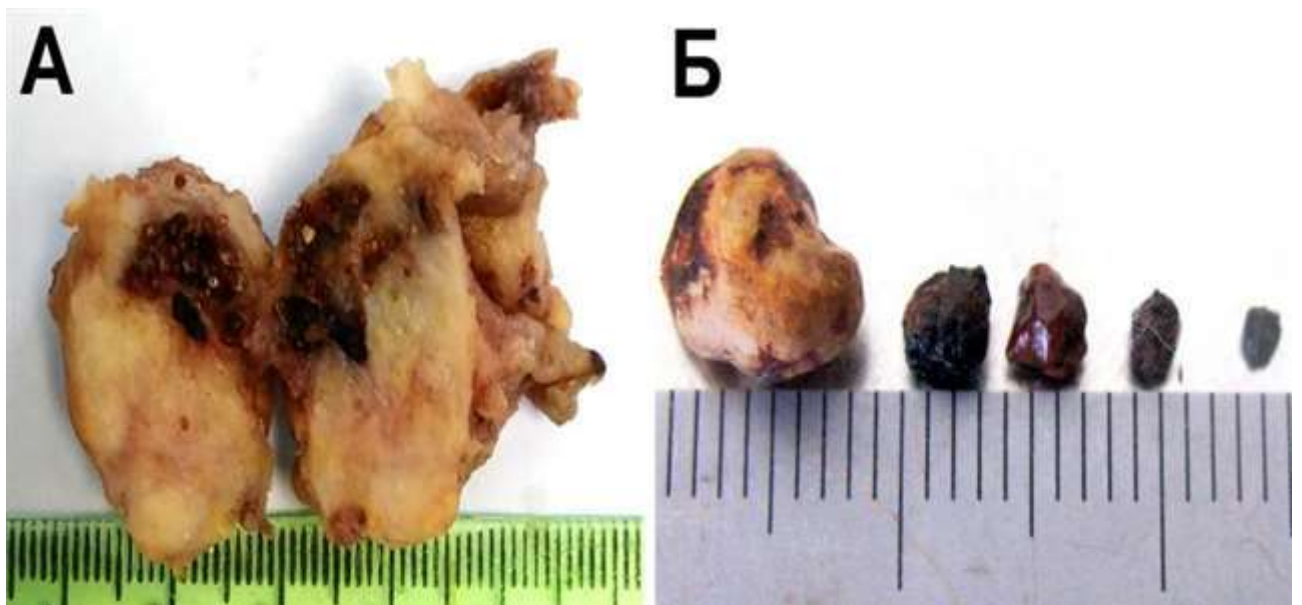


Рисунок 4.1 – Макроскопічне дослідження тканин РПЗ з інтралюмінальними включеннями. Зразки простатичних каменів. А – згруповані ПК у тканині ПЗ, Б – вилучені ПК

Частота виявлення пухлини у лівій частці ПЗ склала 26,7 %, у правій частці пухлина виявлялася у 18,3 % випадків. 55,0 % зразків характеризувалися двобічним пухлинним ураженням ПЗ та порівняно більшими розмірами неоплазії.

4.2 Гістологічне, гістохімічне та імуногістохімічне дослідження тканини РПЗ з біомінеральними ІлВ

Усі досліджені зразки були представлені ацинарною аденокарциномою ПЗ з сумою оцінки за шкалою Глісона від 6 до 10. Пухлини були представлені розростаннями видозмінених залоз, які склалися з клітин із вираженим атипізмом. Ці клітини мали округлі поліморфні ядра, еозинофільну збіднену цитоплазму, високе ядерно-цитоплазматичне співвідношення та формували криброзні чи псевдотрабекулярні структури. У більшості неопластичних клітин відмічалася присутність щонайменше одного чітко вираженого ядерця. Ці клітини характеризувалися підвищеною мітотичною активністю (від 2 до 20 мітозів в полі зору, в т.ч. патологічних). Поміж пухлинними комплексами визначався сполучнотканинний стромальний компонент.

Спостерігалось значне порушення гістоархітектоніки органа зі спрощенням гістологічної його будови. Більшість залоз у препаратах мали просвіт. Деякі неоплазії були представлені суцільним полями пухлинного росту без формування залозистих структур чи просвітів. В цих випадках пухлинні клітини розміщувалися у вигляді пластів, цугів чи мали виражений інфільтративний ріст без чітких меж у вигляді розсипу клітин. Біля вогнищ пухлинного росту визначалися осередки незміненої тканин ПЗ чи з ознаками ДГПЗ.

У неопластичній тканині виявлялася присутність ІлВ, які були представлені СА або простатолітами. У більшості зразків були одночасно виявлені різні варіанти ІлВ: як ПК, так і СА. Їхній розподіл не мав чітко визначених закономірностей, вони також могли знаходитися в безпосередній близькості один до одного.

У стромі та оточуючій пухлинній тканині визначалися значна запальна змішаноклітинна інфільтрація з гранулоцитів, лімфоцитів та макрофагів, крововливи, набряк та міксоматоз стромы, вогнища некрозів.

У залозах, які містили у своєму просвіті ІлВ, визначалися десквамація епітелію, присутність клітинного детриту у просвіті та явища застою секрету. Патологічні вclusions у більшості випадків повторювали форму залоз, у яких вони були виявлені. ПК мали вигляд гомогенних структур, які мали округлу форму та часто фрагментувалися під час виготовлення гістологічних препаратів. СА здебільшого мали шарувату структуру, блідо-рожевий колір, часом полігональну (неправильну) форму та завжди локалізувалися у просвіті залоз (рис. 4.2).

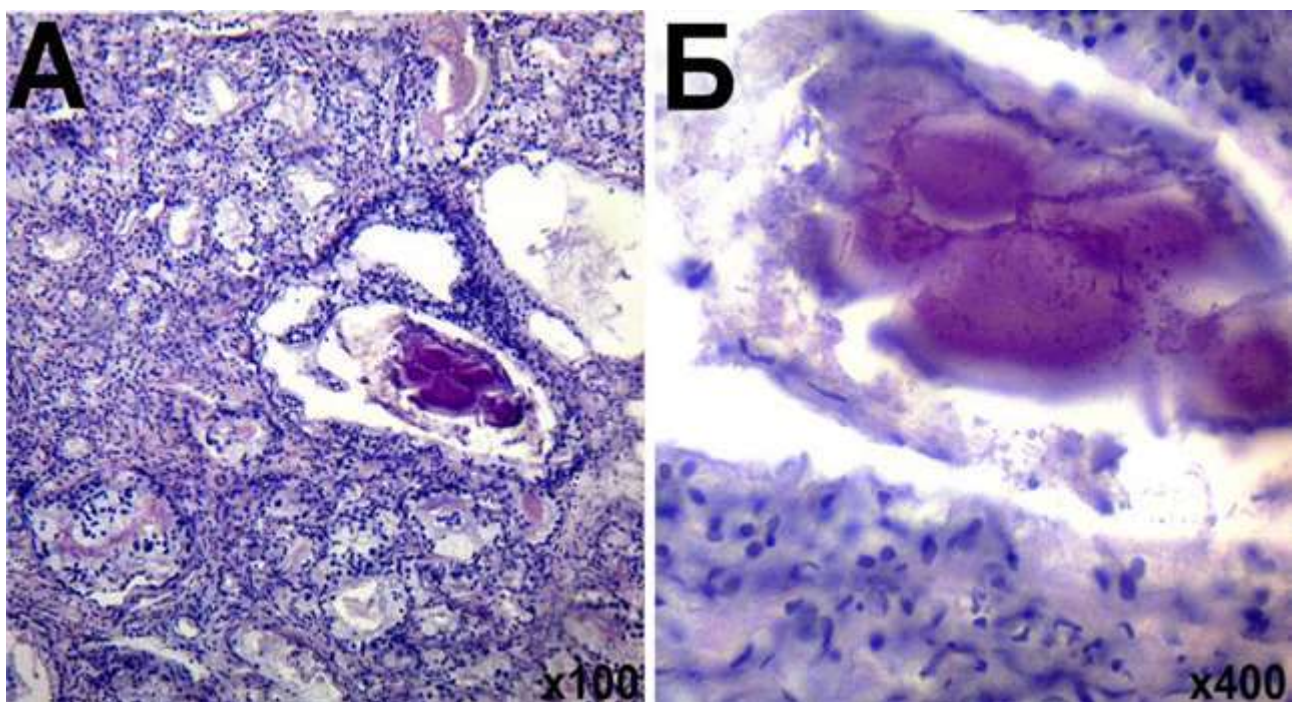


Рисунок 4.2 – Гістологічне дослідження пухлинної тканини І групи. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

4.3 Гістохімічне дослідження тканини РПЗ з біомінеральними ІлВ

Усі зразки РПЗ І групи були забарвлені конго червоним. У світлому полі СА мали вигляд чітко відокремлених яскраво-червоних утворень, які локалізувались у просвіті неопластичних простатитичних залоз. Вони мали неоднорідну шарувату структуру, інтенсивно накопичували барвник (рис. 4.3А). Дослідження мікропрепаратів у поляризаційному світлі (кільцева

поляризація) дозволило виявити феномен рефракції за типом «мальтійського хреста» та феномен «світіння зеленого яблука», що є характерними для амілоїдовмісних структур (рис. 4.3Б). Під час дослідження фрагментів тканини РПЗ I групи з ПК подібні явища не спостерігалися. Це вказує на відсутність амілоїду у структурі ПК, а відтак і на відмінні механізми формування різних за природою інтралюмінальних включень.

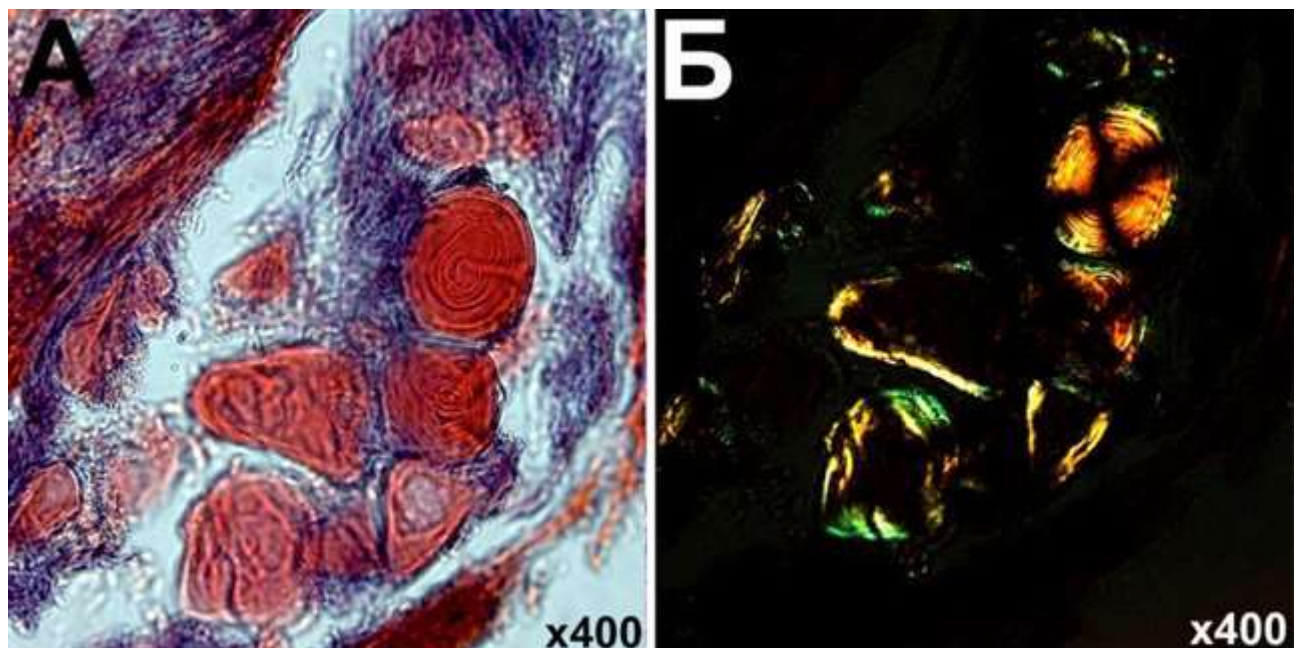


Рисунок 4.3 – Гістохімічне дослідження тканини РПЗ I групи. А – дослідження препаратів у світлому полі; Б – дослідження препаратів у циркулярному поляризаційному світлі. Забарвлення конго червоним.

Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Визначення присутності вуглеводних сполук у тканині РПЗ I групи було проведене за допомогою забарвлення альціановим синім та проведення PAS-реакції.

PAS-забарвлення зразків РПЗ I групи виявило помірну присутність PAS-позитивних сполук (складних полісахаридів, комплексних вуглеводних сполук: глікозаміногліканів, гліколіпідів та глікопротеїнів) у секреті

неопластичних залоз РПЗ, у пухлинній тканині та більшості немінералізованих ІлВ (рис. 4.4).

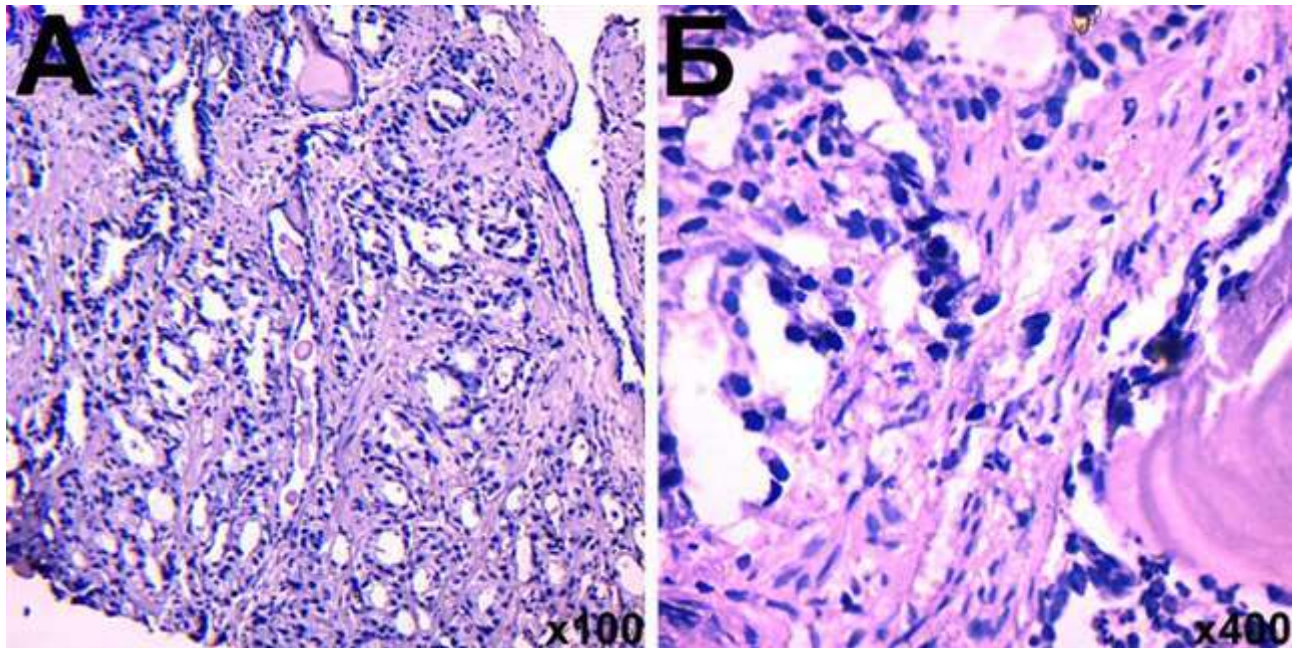


Рисунок 4.4 – Гістохімічне дослідження тканини I групи. PAS-реакція. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Інкубація тканини з розчином альціанового синього за рН 2,5 була використана для якісного визначення карбоксильованих муцинів та кислих глікозаміногліканів. Секрет пухлинних залоз РПЗ I групи мав виражену позитивну гістохімічну реакцію. Також було виявлено інтенсивне забарвлення сполучнотканинного компонента пухлин, що прилягала до ІлВ або вогнищ запалення (рис. 4.5Б). Забарвлення тканини РПЗ з ІлВ за допомогою альціанового синього за рН 1,0 встановило незначну присутність сульфатованих глікозаміногліканів у секреті неопластичних залоз та поодиноких ділянках пухлинної строми (рис. 4.5А).

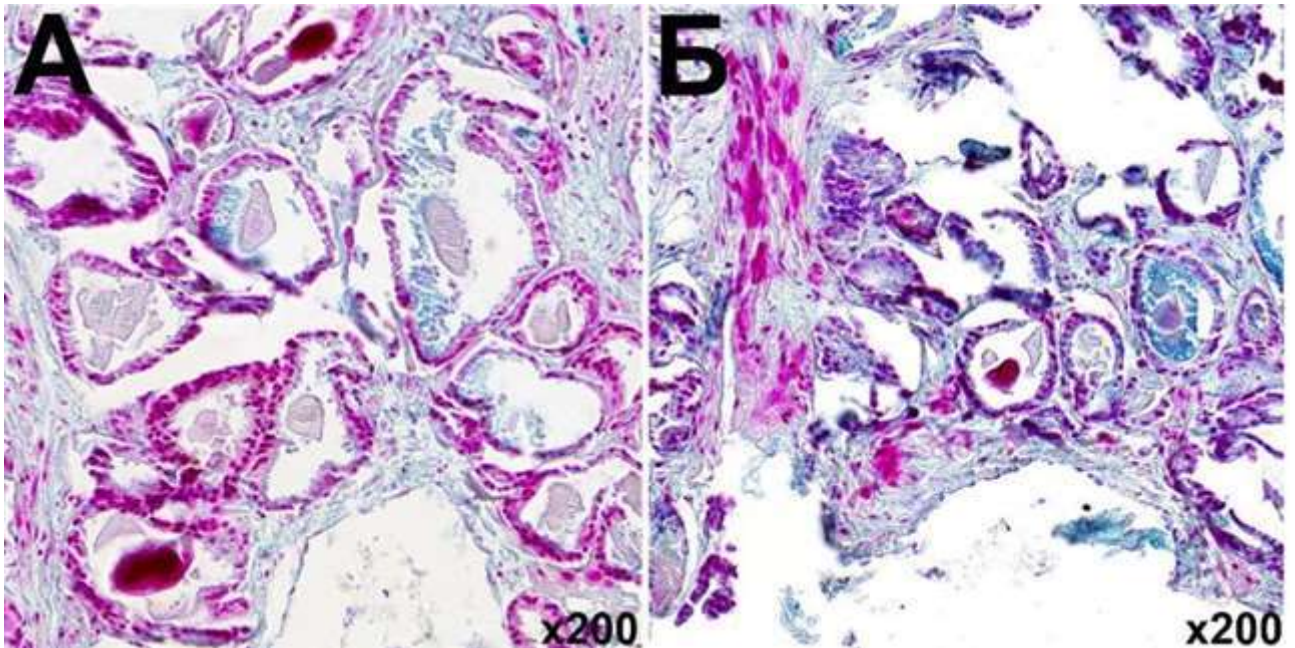


Рисунок 4.5 – Гістохімічне дослідження тканини РПЗ I групи. Забарвлення альціановим синім. А – інкубація за рН 1,0; Б – інкубація за рН 2,5; Контрастування ядер сафраніном О. Збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення

4.4 ІГХ дослідження тканини зразків РПЗ з біомінералізованими ІЛВ

Для оцінки чутливості клітин РПЗ до дії стероїдних гормонів було вивчено експресію АР у пухлинній тканині. У разі виявлення більше 1 % позитивно-збарвлених ядер пухлина вважалася андроген-залежною. Фрагменти незміненої тканини ПЗ були використані у якості позитивного контролю.

Під час ІГХ дослідження АР мали чітко виражений ядерний характер експресії як у клітинах РПЗ, так і в поодиноких клітинах стромального компоненту пухлин (рис. 4.6Б). Накопичення хромогену у цитоплазмі клітин не враховувалося під час дослідження і було розцінене як фонове (рис. 4.6А).

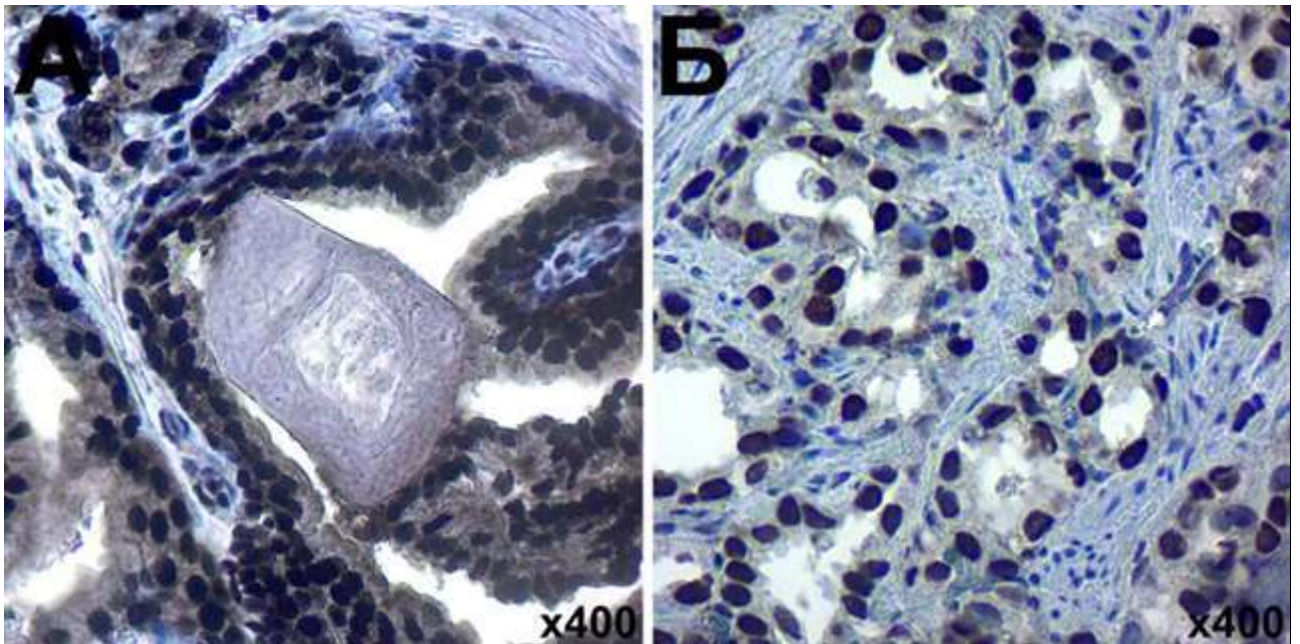


Рисунок 4.6 – Варіанти експресії АР у тканині РПЗ. А – експресія АР у ядрі та цитоплазмі пухлинних клітин (фонове забарвлення); Б – позитивна ядерна експресія АР. Імуногістохімічне дослідження з антитілами до АР. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Імунопозитивні клітини мали здебільшого однорідну колоризацію ядра. У зразках І групи було виявлено в середньому $378,85 \pm 22,42$ імунопозитивних клітин у полі зору діаметром 1000 мкм. Аналіз інтенсивності та локалізації АР-позитивних клітин показав, що у пухлинних клітинах, які знаходилися у безпосередній близькості до ІЛВ, спостерігалася знижена експресія АР (рис. 4.7). Під час дослідження було виявлено лише 1 зразок пухлинної тканини І групи з відсутньою експресією АР (низькодиференційована аденокарцинома ПЗ).

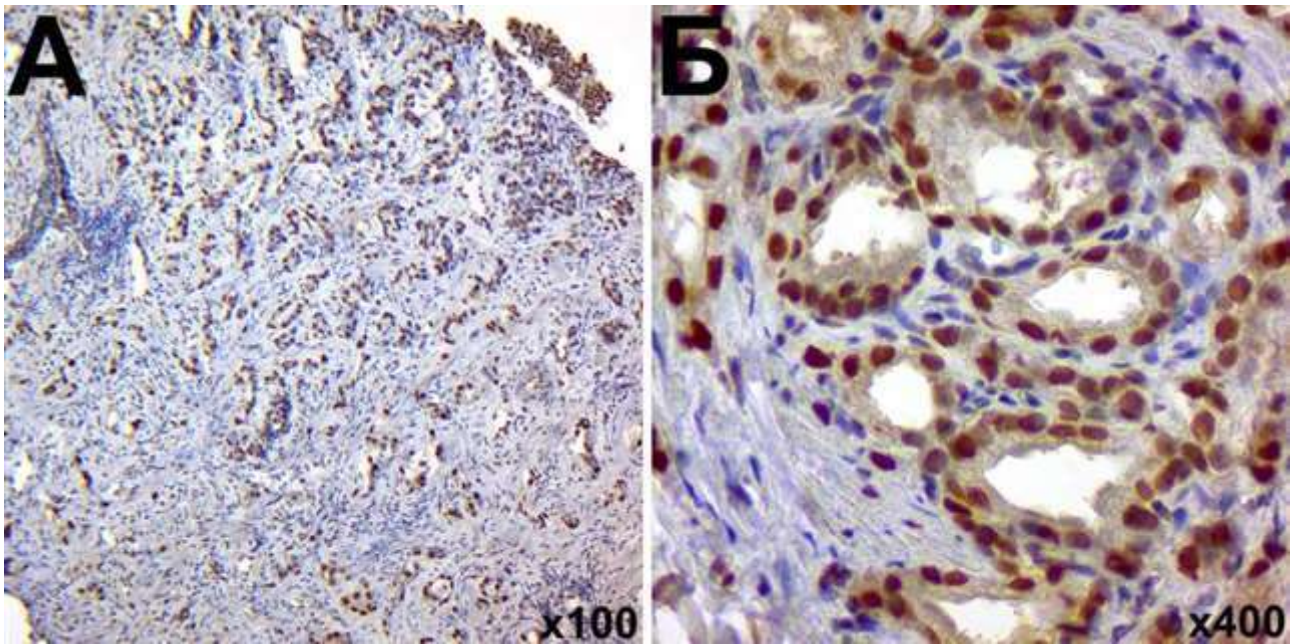


Рисунок 4.7 – ІГХ визначення експресії АР у тканині РПЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Дослідження апоптотичного потенціалу тканини зразків РПЗ проводилося за допомогою оцінки експресії маркерів p53, Casp 3 та Вах.

Протеїн p53 мав виражений ядерний патерн експресії. Діапазон інтенсивності ІГХ-зabarвлення коливався у досить широких межах. p53-позитивні клітини були локалізовані переважно у пухлинних залозах з ІлВ чи за присутності вираженої запальної інфільтрації тканини. У зразках РПЗ І групи в середньому було виявлено $39,89 \pm 2,31$ p53-позитивних клітин (рис. 4.8).

Вивчення експресії проапоптотичного протеїну Вах виявило його присутність у неопластичних клітинах. Цей білок мав цитоплазматичну локалізацію та помірну інтенсивність ІГХ сигналу. У зразках пухлин І групи було в середньому ідентифіковано $61,62 \pm 2,36$ Вах-позитивних клітин у полі зору. Також було відмічене ІГХ-позитивне забарвлення ІлВ що може свідчити про накопичення цього протеїну у їхній структурі (рис. 4.9).

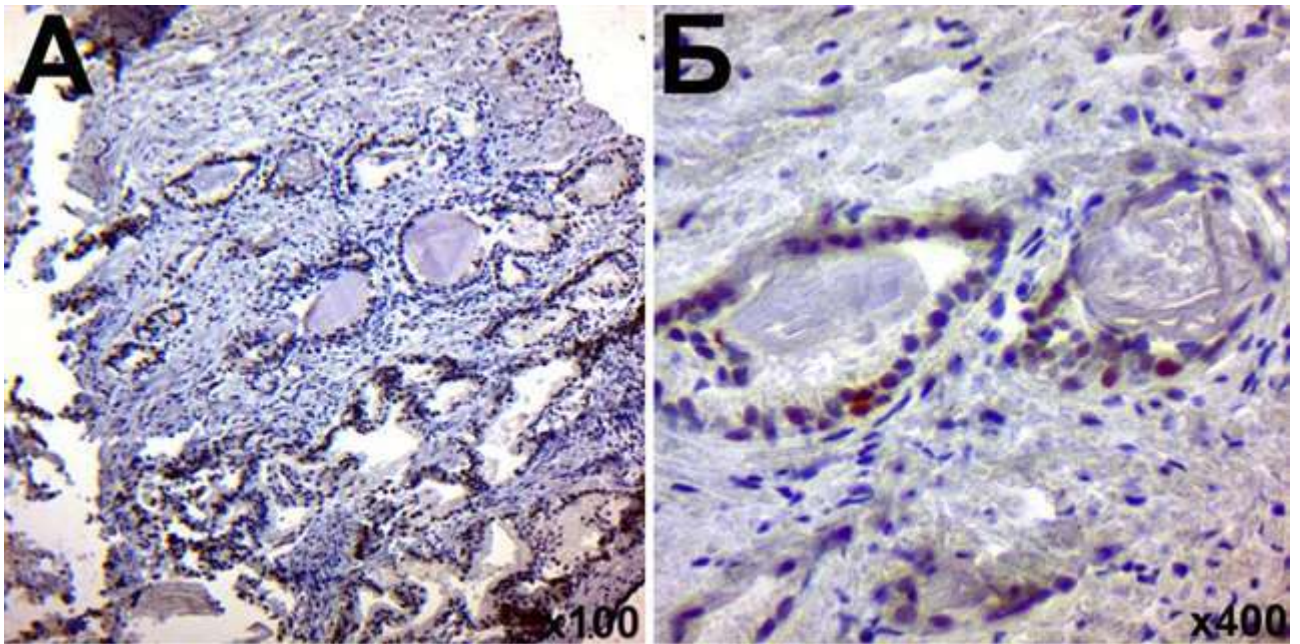


Рисунок 4.8 – ІГХ дослідження експресії p53 у тканині РПЗ I групи.
Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення
вказане у правому нижньому куті зображення

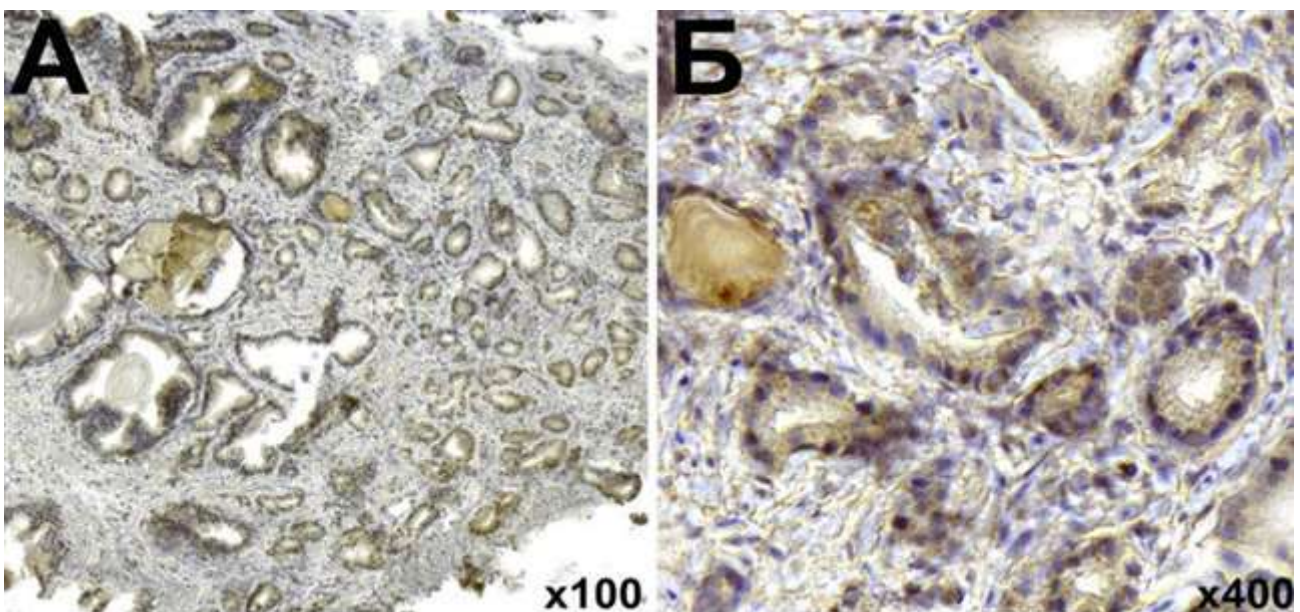


Рисунок 4.9 – ІГХ дослідження експресії Вах у тканині РПЗ I групи.
Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення
вказане у правому нижньому куті зображення

Casp3, як безпосередній маркер апоптозу, виявлялася у неопластичних клітинах у вигляді дифузного цитоплазматичного забарвлення. Інтенсивність

ІГХ-сигналу мала високу варіабельність. У неопластичній тканині РПЗ І групи в середньому виявлялося $50,90 \pm 2,36$ Casp3-позитивних пухлинних клітин у полі зору діаметром 1000 мкм. У пухлинній тканині, яка знаходилася навколо ІлВ, було відмічену підвищену інтенсивність експресії цього протеїну. Деякі ІлВ також мали позитивне ІГХ-зabarвлення, як і оточуючі тканини (рис. 4.10).

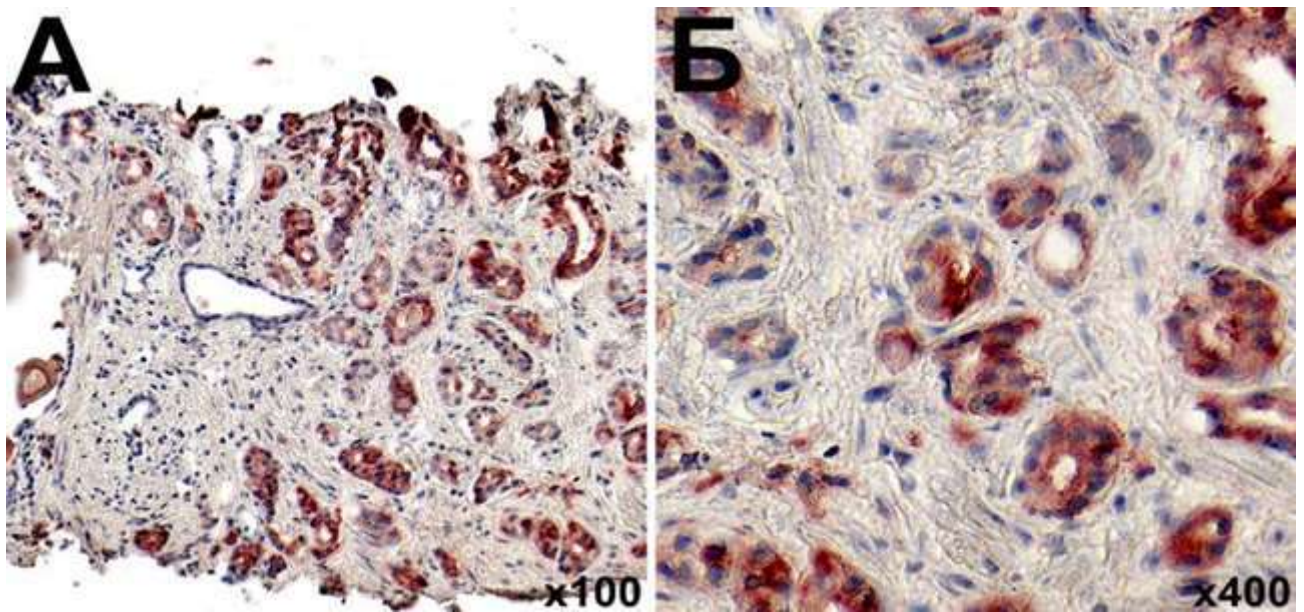


Рисунок 4.10 – ІГХ дослідження експресії Casp3 у тканині РПЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

ІГХ виявлення глікопротеїну ОСН показало, що для нього є характерною змішана, цитоплазматично-ядерна локалізація експресії. Він був виявлений як у неопластичних клітинах, так і в клітинах запального інфільтрату. Однак цікавим є той факт, що цей маркер також був присутнім у структурі обох типів ІлВ РПЗ. У ПК він виявлявся у вигляді дифузного забарвлення усіх часток ПК. У СА даний глікопротеїн був ідентифікований між шарами цих білкових утворень.

У тканині РПЗ І групи було виявлено $77,57 \pm 5,65$ ОСН-позитивних клітин в одиниці виміру площі (рис. 4.11).

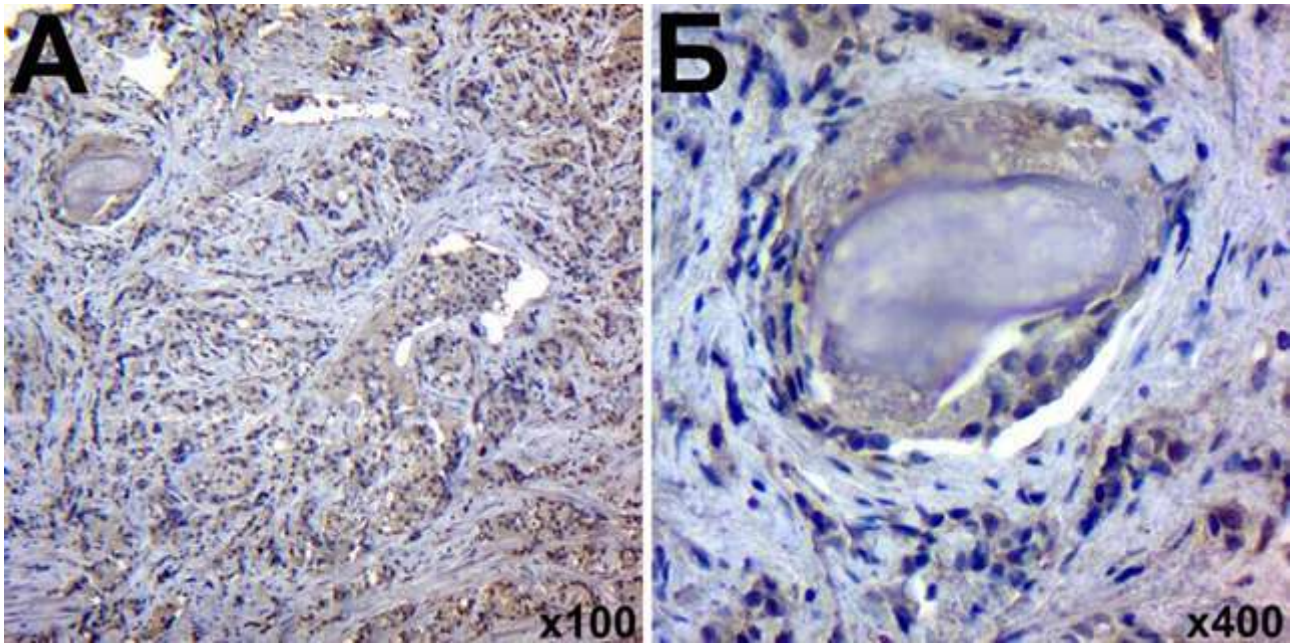


Рисунок 4.11 – ІГХ дослідження експресії ОСН у тканині РПЗ I групи низького ступеня диференціювання. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксилином Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Однак, процеси біомінералізації у тканині РПЗ, що супроводжуються розвитком запальних процесів різного ступеня інтенсивності, що спричиняє зміни як в пухлинній тканині, так і у стромальному компоненті пухлини. Для вивчення змін, які виникають у сполучнотканинній пухлинній стромі, нами було проведене виявлення експресії Col I, який є невід'ємною складовою кісткової тканини. У якості негативного контролю нами були використані антитіла до Col II, який за нормальних умов міститься у хрящовій тканині та не експресується ані в тканині ПЗ, ані в кістковій тканині.

Експресія колагену була оцінена за відносною площею позитивно-забарвлених волокон до загальної площі полів зору. Він виявлявся у вигляді дифузно- чи поодинокі розміщених фібрилярних волокон у складі сполучнотканинного матриксу стромального компоненту пухлини. Інтенсивність ІГХ забарвлення значно варіювала та характеризувалася значним її підвищенням

у тканині з біомінералізованими ІлВ. Відмічалися вогнища “dot-like” ІГХ-забарвлення у поодиноких пухлинних клітинах, які також знаходилися у безпосередній близькості до ІлВ.

Так, у зразках пухлинної тканини РПЗ I групи було виявлено, що $36,22 \pm 1,53$ % пухлинної стромі є позитивними щодо експресії Col I. Також присутність Col I була встановлена у зовнішніх шарах немінералізованих ІлВ. Інтенсивність ІГХ сигналу була вищою у неопластичній тканині, що знаходилася у безпосередній близькості до ІлВ (рис. 4.12).

Імуногістохімічне виявлення білку Col II у неопластичній тканині вказало на його незначну присутність. Він був ідентифікований у вигляді поодинокі забарвлених волокон та у вигляді локальних седиментів у стромі пухлини. Оцінка рівнів експресії Col II у тканині I групи показала, що лише $9,88 \pm 0,58$ % стромі пухлин були позитивними. ІГХ сигнал мав низьку та помірну інтенсивність та не мав чіткої локалізації (рис. 4.13).

Процеси ремоделювання сполучнотканинного компоненту пухлини включає в себе не лише синтез нових сполук (колагенові білки), але й процеси деструкції органічних компонентів. Ці процеси здебільшого є ензим-індукованими та супроводжуються накопиченням та виділенням даних речовин у міжклітинну речовину.

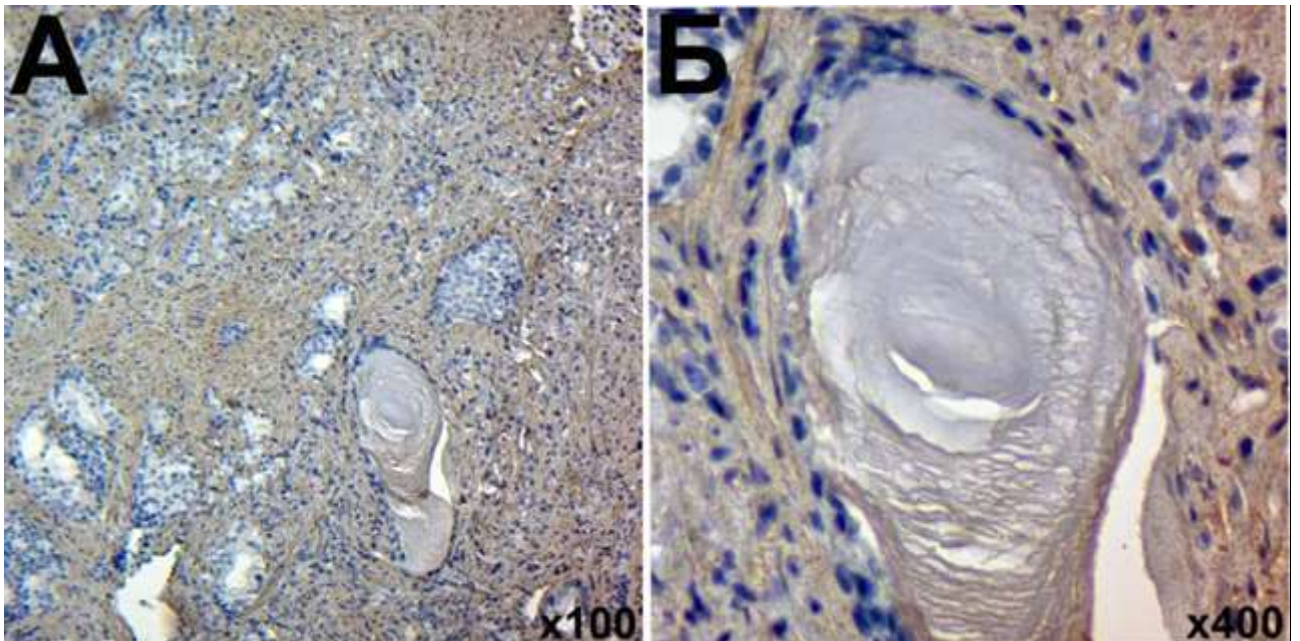


Рисунок 4.12 – ІГХ дослідження експресії Col I у тканині РПЗ I групи.
Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення
вказане у правому нижньому куті зображення

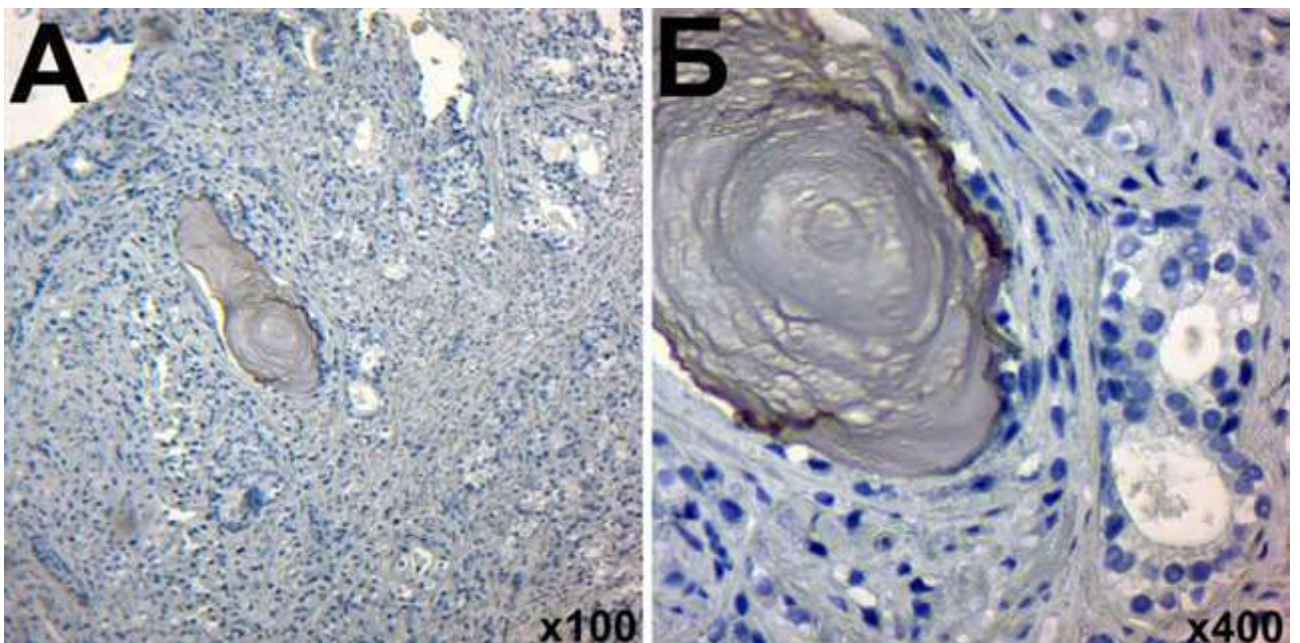


Рисунок 4.13 – ІГХ дослідження експресії Col II у тканині РПЗ I групи.
Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення
вказане у правому нижньому куті зображення

ММР1 мала цитоплазматичний характер експресії та помірний ступінь інтенсивності сигналу. Переважною локалізацією ММР1-позитивних клітин у зразках І групи були ділянки щільного прилягання неопластичної тканини до ІлВ, елементів запального інфільтрату, вогнищ некрозів. Також даний фермент був ідентифікований і у стромальному компоненті пухлин. У середньому, в одиниці поля зору у зразках РПЗ з ІлВ було ідентифіковано $38,21 \pm 1,59$ ММР1-позитивних пухлинних клітин (рис. 4.14).

У неопластичних залозах, які склалися переважно з ММР1-позитивних клітин, даний фермент був ідентифікований також і у структурі СА.

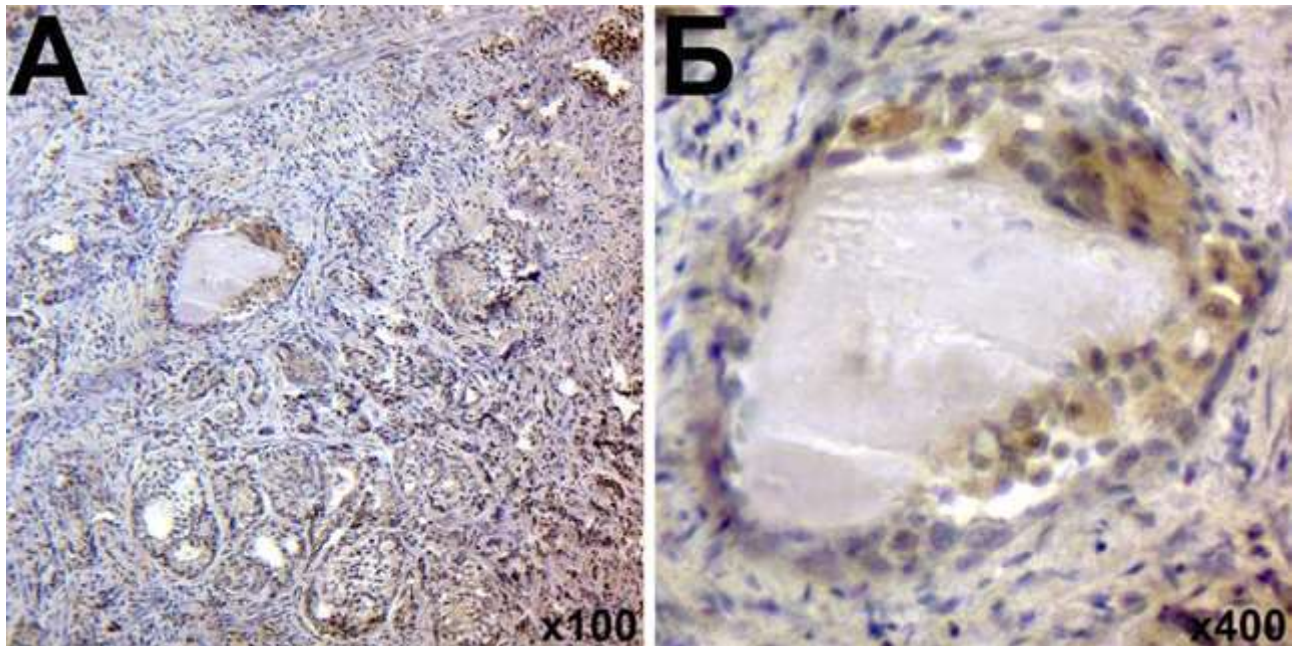


Рисунок 4.14 – ІГХ дослідження експресії ММР1 у тканині РПЗ І групи.

Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

VEGF мав виражений цитоплазматичний характер експресії. Він виявлявся у вигляді дифузного цитоплазматичного ІГХ забарвлення різного ступеня інтенсивності. У тканині РПЗ І групи він локалізувався переважно у неопластичних клітинах, стінці судин та капілярів. Також його присутність була ідентифікована у секреті деяких неопластичних залоз та зовнішніх

шарах ІлВ. В середньому у тканині даної групи було виявлено $50,81 \pm 2,38$ імунопозитивних клітин у полі зору діаметром 1000 мкм (рис. 4.15).

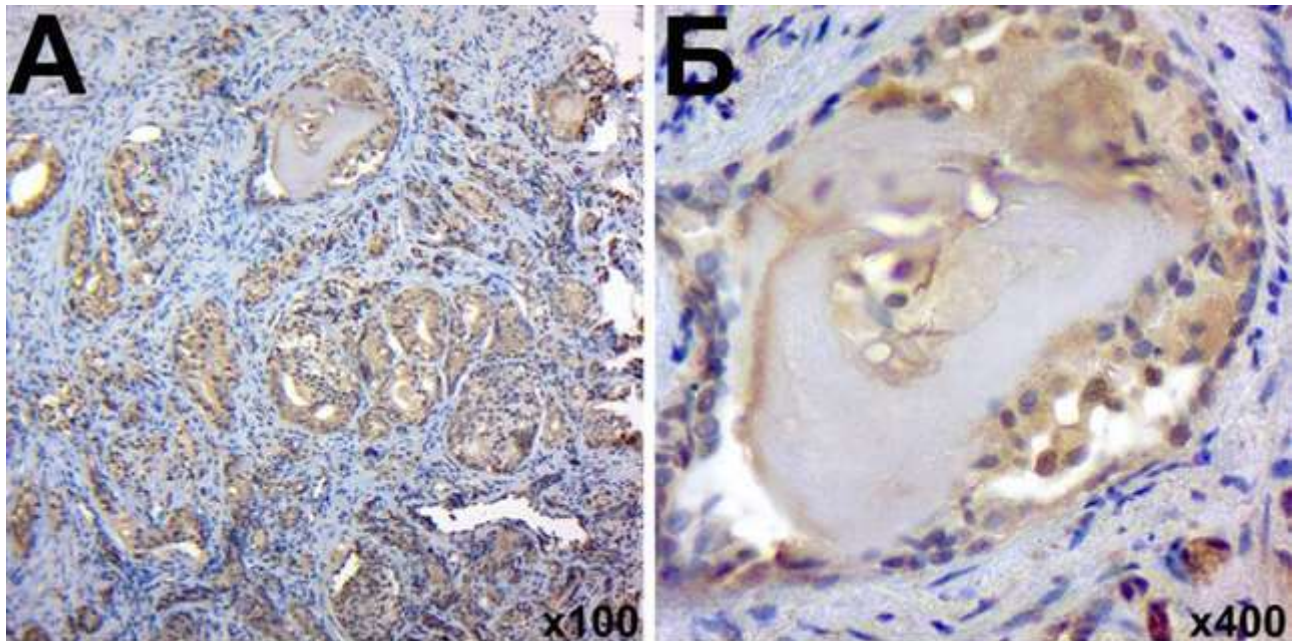


Рисунок 4.15 – ІГХ дослідження експресії VEGF у тканині РПЗ І групи Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Дослідження рівнів експресії білків теплового шоку Hsp70 та Hsp90 було використане зокрема в якості оцінки відповіді тканини РПЗ на стресові фактори.

Hsp70 виявлявся у вигляді дифузного цитоплазматичного забарвлення. Підвищена інтенсивність його експресії була виявлена у неопластичній тканині, яка знаходилася у безпосередній близькості до ІлВ. В середньому у пухлинній тканині РПЗ І групи було виявлено $312,06 \pm 13,39$ Hsp70-позитивних клітин у полі зору (рис. 4.16).

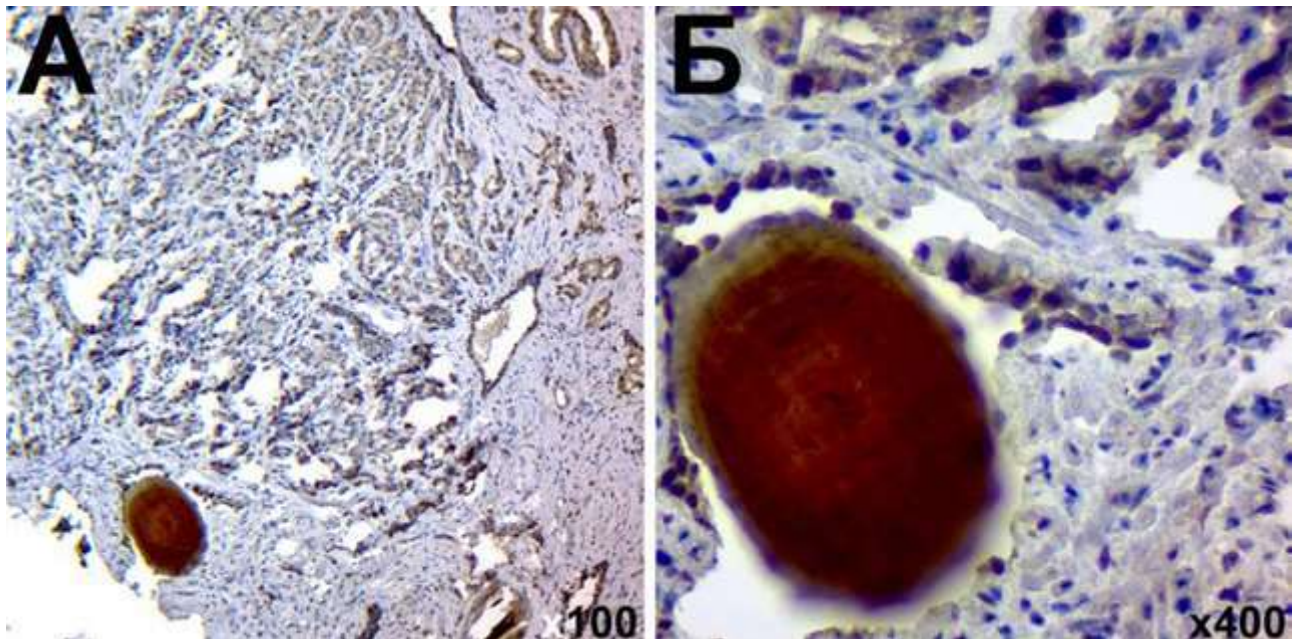


Рисунок 4.16 – ІГХ дослідження експресії Hsp70 у тканині РПЗ I групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Високомолекулярний білок теплового шоку Hsp90 мав змішаний ядерно-цитоплазматичний патерн експресії. Його присутність була ідентифікована у неопластичних клітинах, елементах пухлинної стромы та у структурі ІлВ. Пухлинна тканина, яка знаходилася у місцях локалізації ІлВ, мала підвищену інтенсивність його експресії. У середньому було виявлено $342,06 \pm 19,19$ Hsp90-позитивних пухлинних неопластичних клітин у полі зору з діаметром 1000 мкм (рис. 4.17).

У якості характеристики, яка описувала б ступінь хронічної запальної інфільтрації у тканині РПЗ, було використано число макрофагів. Їхня присутність вказувала на розвиток хронічного запалення. CD68 мав цитоплазматичний характер експресії. Позитивні клітини розміщувалися як поодинокі, так і малими групами (рис. 4.18).

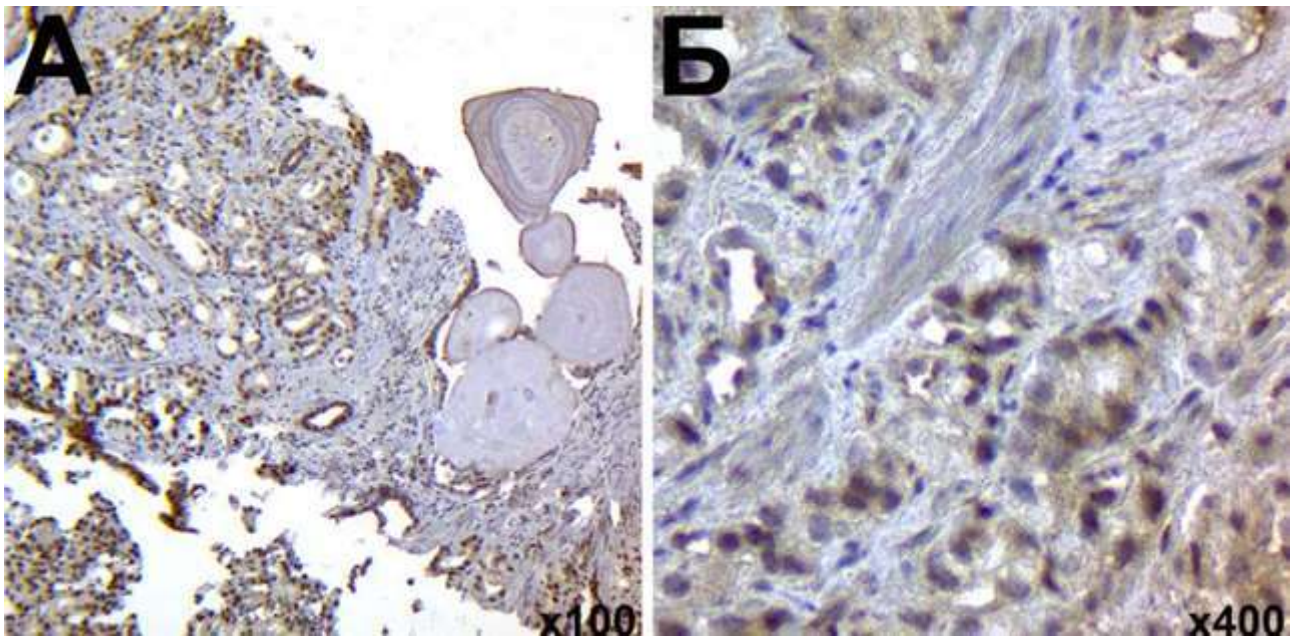


Рисунок 4.17 – Імуногістохімічне дослідження експресії Hsp90 у тканині РПЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

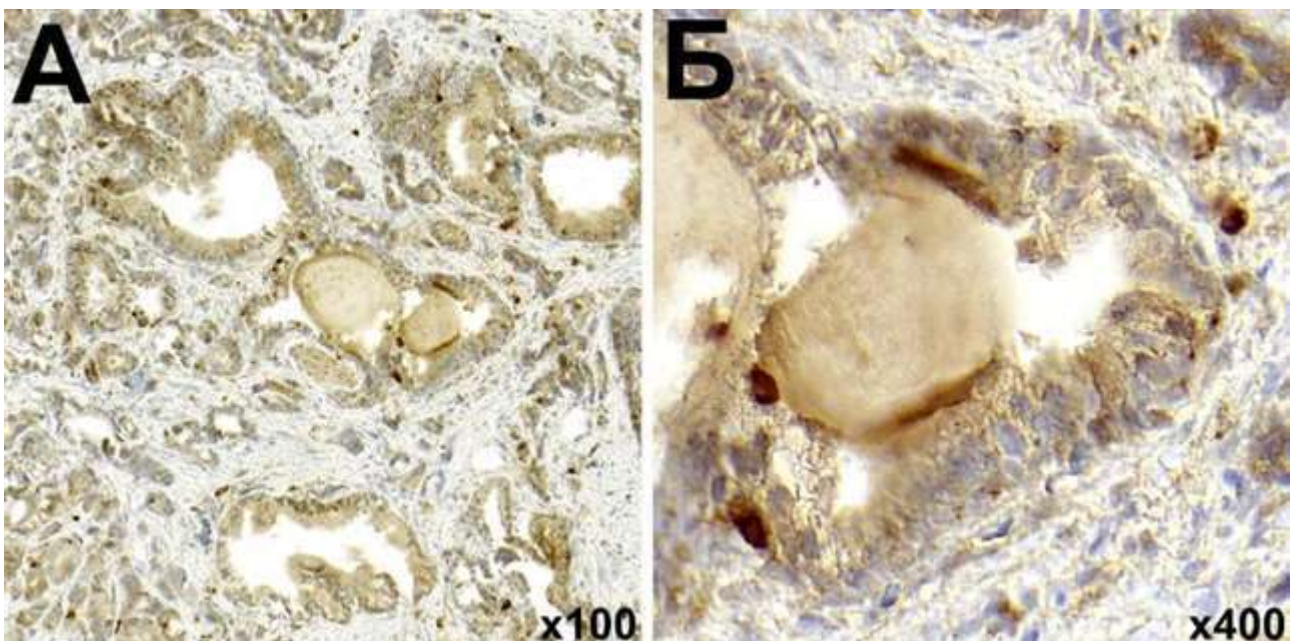


Рисунок 4.18 – Імуногістохімічне виявлення CD68-позитивних клітин у тканині РПЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

У середньому, зразки пухлинної тканини І групи містили $137,48 \pm 3,39$ CD68-позитивних клітин на одиницю площі. Більш компактне розташування клітин з експресією CD68 було відмічене у осередках запальної інфільтрації та у стромальному компоненті пухлин, який перебував у безпосередній близькості до ІлВ. У деяких випадках дані клітини були також виявлені у просвіті неопластичних залоз та у тяжках пухлинних клітин.

Ступінь розвитку гострого запалення був визначений за числом нейтрофілів. Для виявлення вказаних клітин були використані антитіла проти МРО. У зразках пухлинної тканини І групи в середньому було виявлено $31,50 \pm 1,71$ МРО-позитивних клітин у полі зору діаметром 1000 мкм. МРО мала виражений цитоплазматичний характер експресії та виявлялася у вигляді дифузно розміщених гранул у цитоплазмі клітин. Дані клітини розміщувалися переважно у вогнища запалення, некрозів, місцях локалізації ІлВ (рис. 4.19).

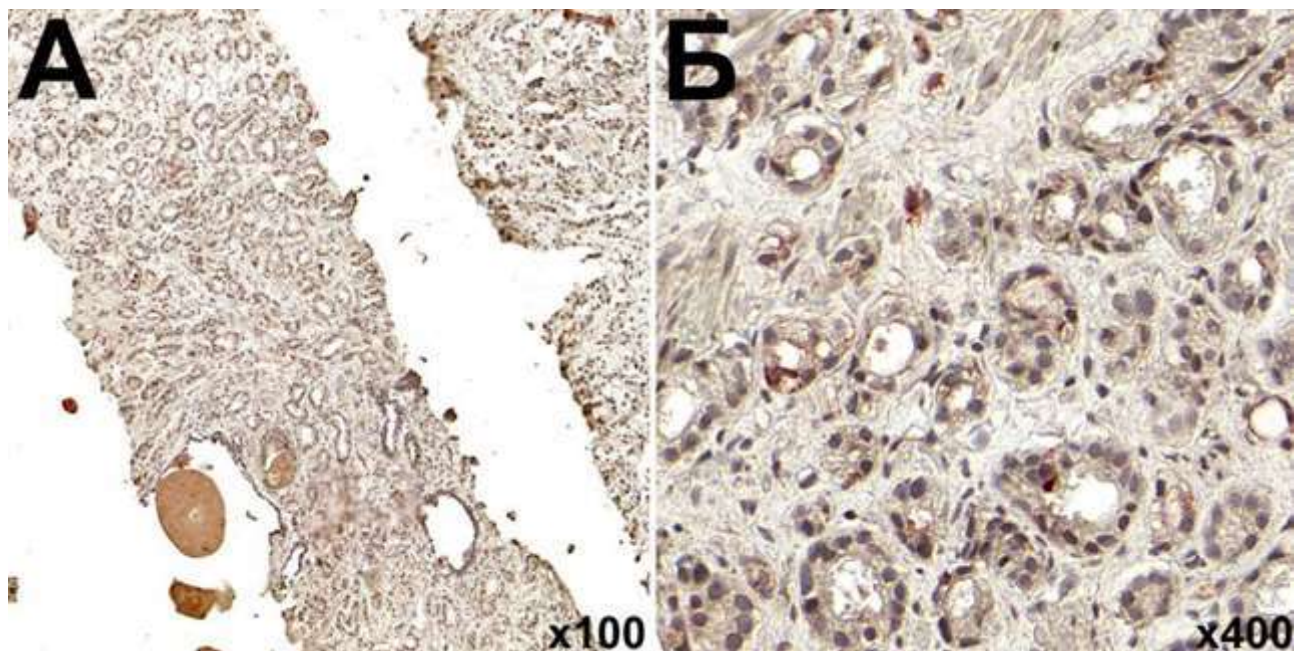


Рисунок 4.19 – Імуногістохімічне виявлення МРО-позитивних клітин у тканині РПЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Таким чином, було проведене морфологічне, гістохімічне та ІГХ дослідження тканини РПЗ з присутністю біомінералізованих ІлВ. Було визначено, що їхня присутність супроводжується ремоделюванням пухлинної тканини: розвитком запальної імунної відповіді, кістозною трансформацією залоз, травмуванням неопластичної тканини, десквамацією епітеліального компоненту неоплазії. СА мають у своєму складі значний вміст білку-амілоїду, що має позитивну реакцію під час забарвлення Конго червоним. Додаткове дослідження забарвлених за цим методом препаратів у циркулярному поляризаційному світлі дозволяє підтвердити їхню амілоїдну природу за рахунок виявлення дифракції у вигляді «мальтійського хреста» та феномену «світіння зеленого яблука».

Диференційне забарвлення альціановим синім за різних показників рН дозволило виявити переважання кислих глікозаміногліканів у тканині РПЗ з ІлВ. Також було виявлено присутність вказаних структур не лише в стромальному компоненті пухлини, а і в складі секрету неопластичних залоз та СА. Проведене ІГХ дослідження встановило особливості присутності рецепторів до стероїдних гормонів (андрогенів), маркерів апоптозу (p53, Вах, Casp3), остеобластичних маркерів (ОСН, Col I, Col II), MMP1, VEGF, білків теплового шоку (Hsp 70, Hsp 90) та клітинних елементів запального інфільтрату (CD68 та MPO). Було продемонстровано, що локалізація деяких маркерів (зокрема, p53, ОСН, Col I, MMP1, CD68 та MPO) є асоційованою з локалізацією ІлВ.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[215, 234, 237, 241, 243, 248, 253, 259, 260, 266]

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ РПЗ БЕЗ ІЛВ

5.1 Морфологічне дослідження зразків РПЗ без ІлВ

Для дослідження було використано 30 зразків РПЗ без присутності ІлВ. Середній вік пацієнтів II групи складав $68,27 \pm 1,27$ років.

Макроскопічно ПЗ мали вигляд солідного чи фрагментованого органа діаметром від 3,0 до 8,0 см. Поверхня органа була вкрита сполучнотканинною капсулою, що щільно прилягала до залози. У випадку вираженого інфільтративного росту чітко диференціювати капсулу було неможливо. Поверхня залози також була деформована, бугриста, з наявністю поодиноких чи множинних утворень щільної консистенції, що підіймалися над поверхнею.

Усі досліджені органи після формалінової фіксації мали сірувато-бурий колір поверхні. На розрізі вони мали також сіро-рожевий колір, неоднорідну структуру за рахунок розростань тканини без чітких меж, яка мала високу щільність та пружність (рис. 5.1). На розрізі були присутні вторинні зміни пухлинної тканини у вигляді поодиноких вогнищ некрозів, крововиливів, кістозної трансформації залоз.

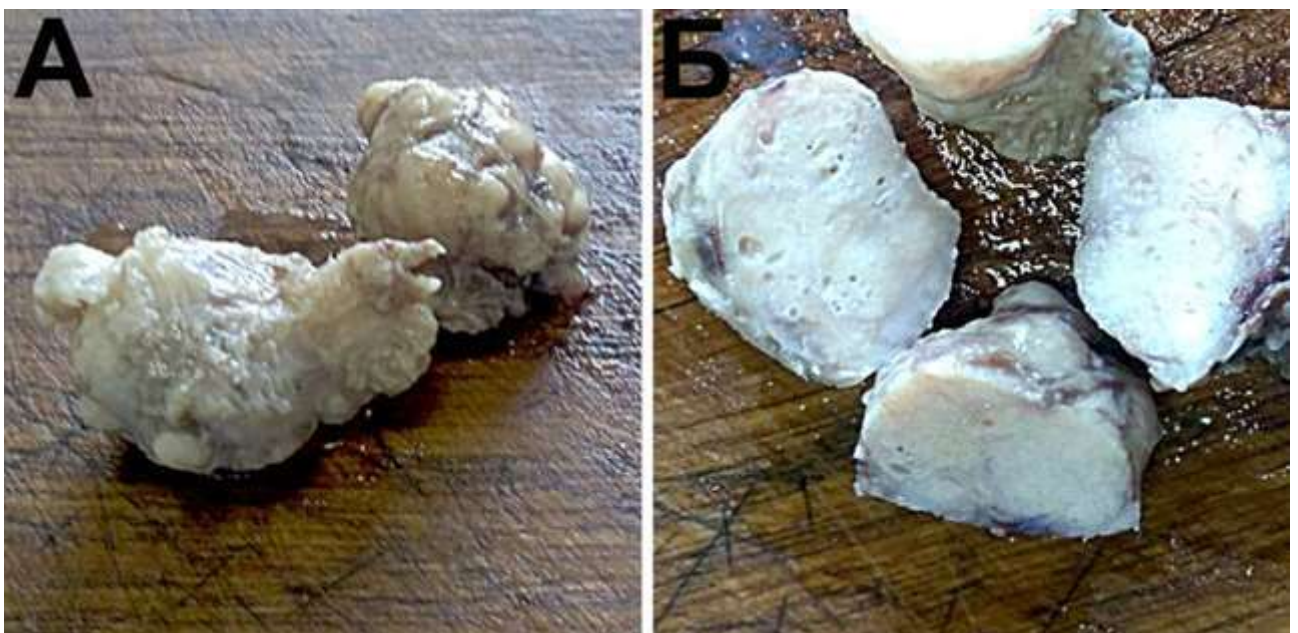


Рисунок 5.1 – Макроскопічне дослідження тканини РПЗ II групи

Неопластична тканина була представлена розростаннями у вигляді вузлів чи пухлинних пластів без чітких меж росту. Деякі кістозно трансформовані залози містили у собі секрет, який був представлений непрозорою білуватою чи жовтуватою рідиною.

У 76,67 % випадків спостерігалася двобічна локалізація пухлинного процесу. 6,67 % пацієнтів мали РПЗ у правій долі ПЗ, у 16,67 % пацієнтів РПЗ був виявлений виключно у лівій долі ПЗ.

5.2 Гістологічне дослідження РПЗ без ІлВ

Усі досліджені зразки РПЗ II групи були представлені ацинарною аденокарциномою ПЗ з сумою балів за шкалою Глісона від 6 до 10.

Тканина неоплазій мала виражені ознаки тканинного атипізму, які проявлялися у зміні форми та розміру залозистих ацинусів, формуванні суцільних пластів пухлинних клітин без утворення структур з просвітом. У деяких залозах були виявлені розростання у вигляді криброзних чи папілярних структур, у їхньому просвіті містилася незначна кількість секрету, поодинокі десквамовані клітини та залишки клітинного детриту.

Пухлинні клітини характеризувалися підвищеним ядерно-цитоплазматичним індексом. Деякі з них зберігали полярність та мали збіднену слабо-еозинофільну цитоплазму, здебільшого одне добре окреслене ядрце. В інших випадках ядра були гіперхромними, з нерівномірним розподілом хроматину, фігурами патологічних мітозів (рис. 5.2). Кількісне співвідношення «строма/паренхіма» у пухлинній тканині значно варіювала до повної відсутності стромального компонента у деяких пухлинах, які були представлені низькодиференційованим РПЗ.

У пухлинній стромі також відмічалися поодинокі крововиливи, запальна інфільтрація з залученням макрофагів, гістіоцитів та поодиноких нейтрофілів, набряк.

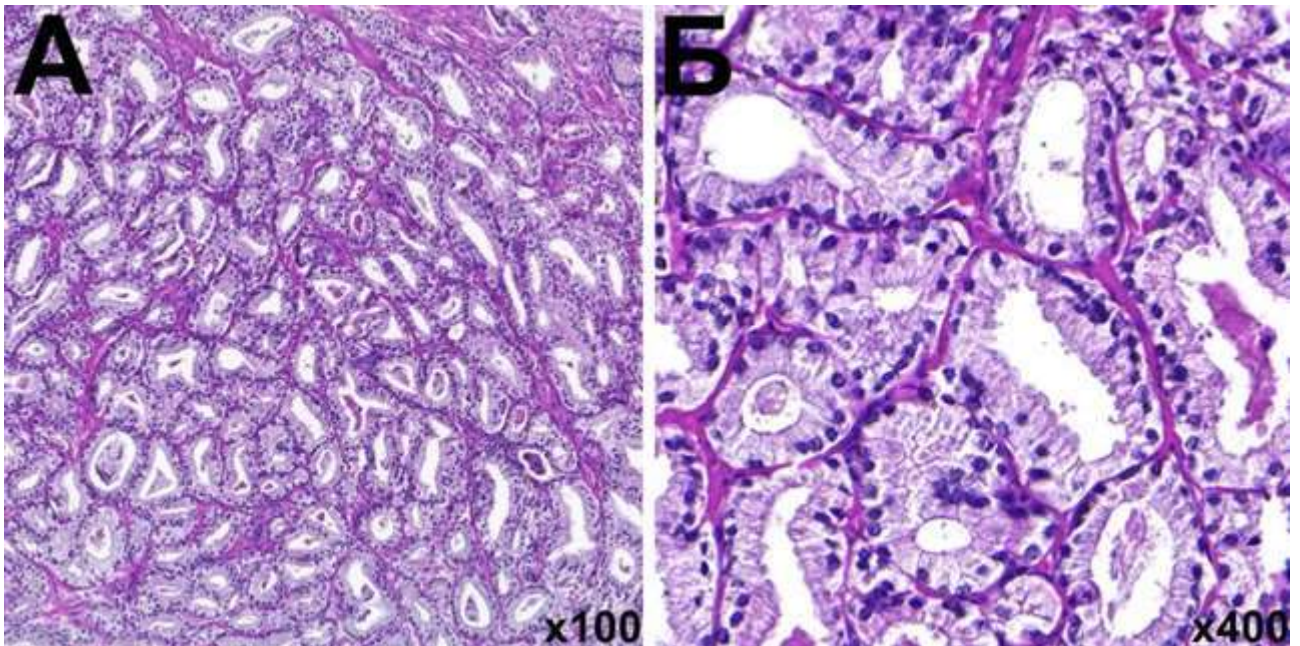


Рисунок 5.2 -. Гістологічне дослідження пухлинної тканини II групи. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

5.3 Гістохімічне дослідження тканини РПЗ II групи

Для оцінки ступеню глікозилювання неопластичної тканини РПЗ II групи усі зразки були забарвлені за допомогою альціанового синього та PAS-реакції.

PAS-позитивне забарвлення виявлялося у вигляді поодиноких рожевих структур у просвіті неопластичних залоз та елементах пухлинної стромы, мало помірну інтенсивність. Звертає на себе увагу значна гетерогенність локалізації полісахаридів у пухлинній тканині з майже повною їхньою відсутністю у цитоплазмі ракових клітин (рис. 5.3).

Оцінка присутності різних класів глікозаміногліканів проводилася шляхом застосування розчину барвника альціанового синього з різним показником рН.

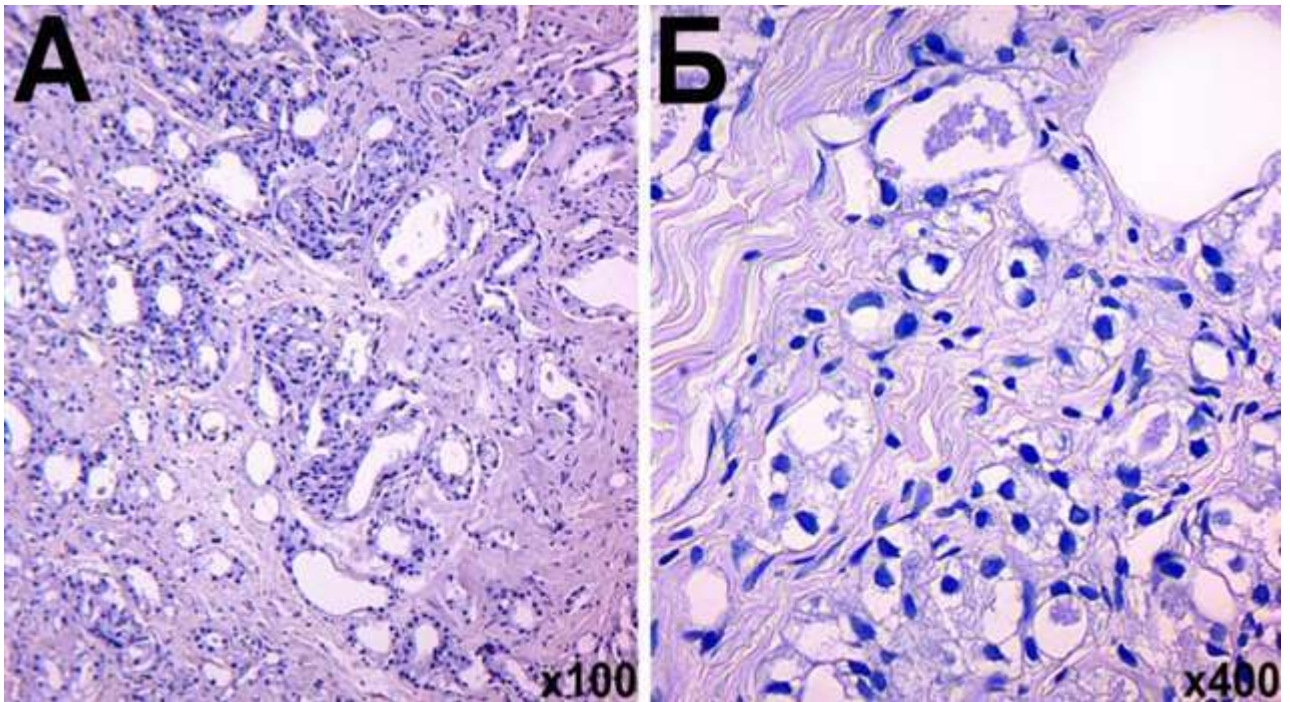


Рисунок 5.3 – Гістохімічне дослідження тканини II групи. PAS-реакція. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Забравлення альціановим синім за рН 2,5 виявило незначну присутність кислих глікозаміногліканів у неопластичній тканині. Їхньою переважною локалізацією був секрет неопластичних та незмінених залоз. Сполучнотканинна строма мала низьку інтенсивність забарвлення альціановим синім (рис. 5.4Б). Використання розчину барвника із рН 1,0 дозволило встановити помірну присутність сульфатованих глікозаміногліканів з переважною їхньою локалізацією у пухлинній стромі та незначний їхній вміст у секреті неопластичних залоз (рис. 5.4А). Встановлено гетерогенність їхнього вмісту у пухлинній тканині, що проявлялося різною інтенсивністю забарвлення у різних ділянках пухлин.

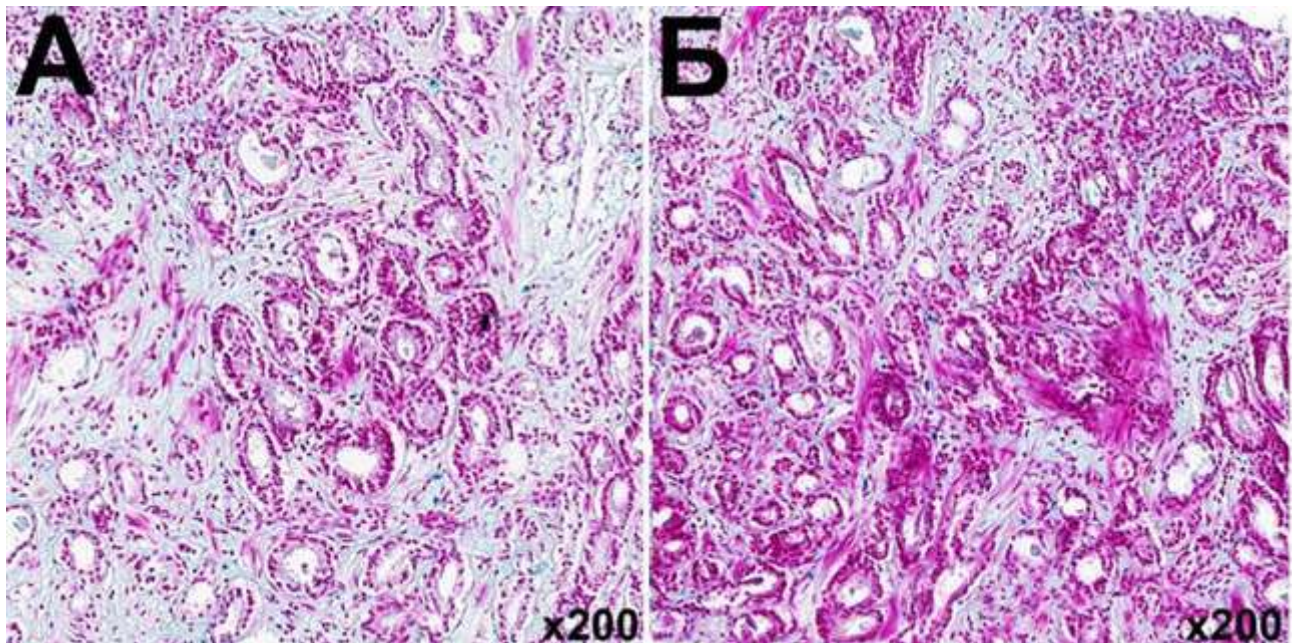


Рисунок 5.4 – Гістохімічне дослідження тканини РПЗ II групи. Забарвлення альціановим синім. А – інкубація за рН 1,0; Б – інкубація за рН 2,5; Контрастування ядер сафроніном О. Збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення

5.4 ІГХ дослідження тканини зразків РПЗ без ІлВ

АР мали виражений ядерний патерн експресії. Забарвлення локалізувалося переважно у пухлинних клітинах та поодиноких елементах строми. Усі досліджені зразки мали АР-позитивний статус, мали високу інтенсивність та однорідність ІГХ сигналу, розміщувалися поодинокі, малими групами чи формували залозисті утворення. У РПЗ II групи в середньому було виявлено $421,02 \pm 32,82$ АР-позитивних клітин у полі зору із діаметром 1000 мкм (рис. 5.5).

Маркер апоптозу p53 мав ядерний характер експресії. Позитивні клітини розміщувалися дифузно, місця їхньої локалізації у пухлинній тканині були асоційованими з вогнищами запалення та некрозів. У неопластичній тканині РПЗ II групи в середньому було ідентифіковано $36,48 \pm 2,46$ p53-позитивних клітин у полі зору (рис. 5.6). Також була відмічена тенденція до підвищення рівнів експресії p53 зі зниженням ступеню диференціювання пухлини.

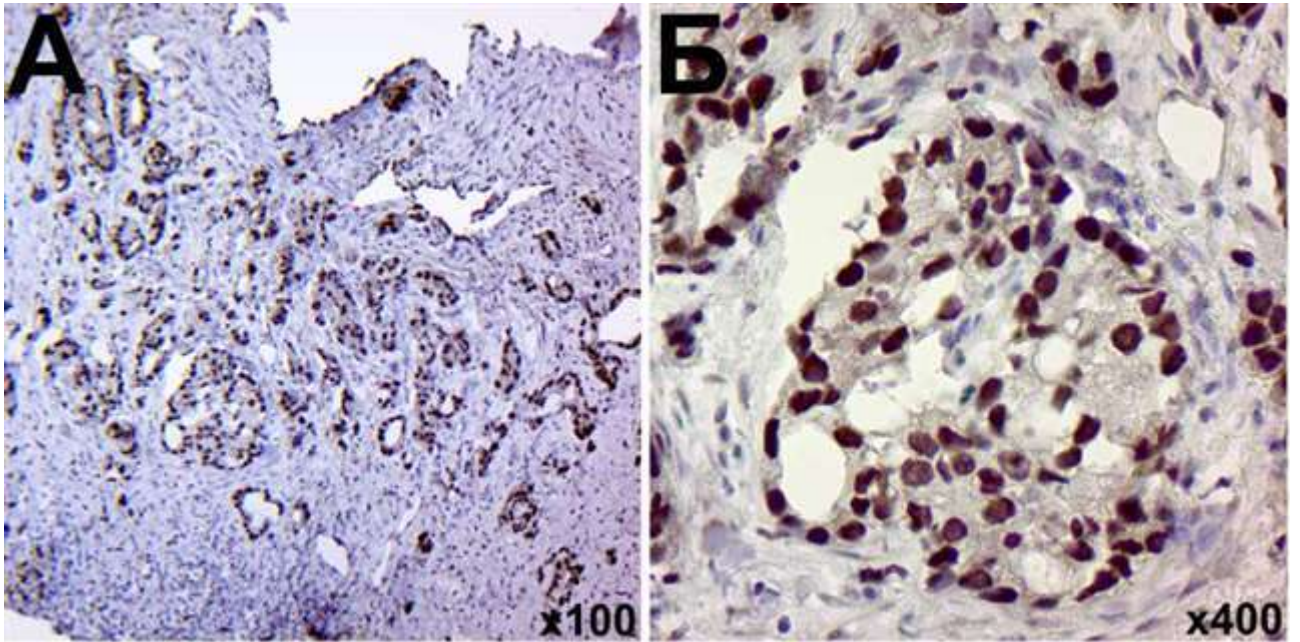


Рисунок 5.5 – ІГХ визначення експресії АР у тканині РПЗ ІІ групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

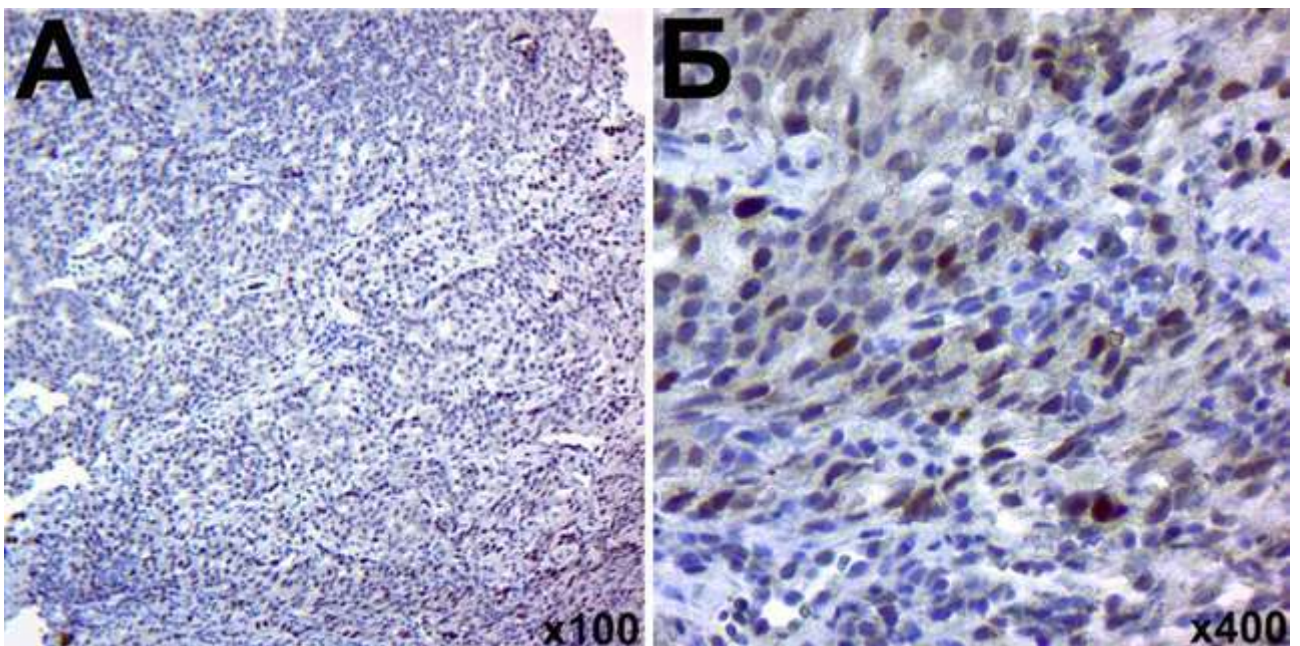


Рисунок 5.6 – ІГХ визначення експресії р53 у тканині РПЗ ІІ групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Проапоптотичний протеїн Вах у тканині РПЗ II групи мав виражений цитоплазматичний характер експресії. Він виявлявся як у пухлинних комплексах, так і у неопластичних клітинах, що проростали до оточуючих тканин. У середньому в даній групі виявлялося $44,62 \pm 2,94$ Вах-позитивних клітин у полі зору діаметром 1000 мкм (рис. 5.7). Також було відмічено вищу інтенсивність ІГХ сигналу у неопластичних клітинах поблизу вогнищ запалення.

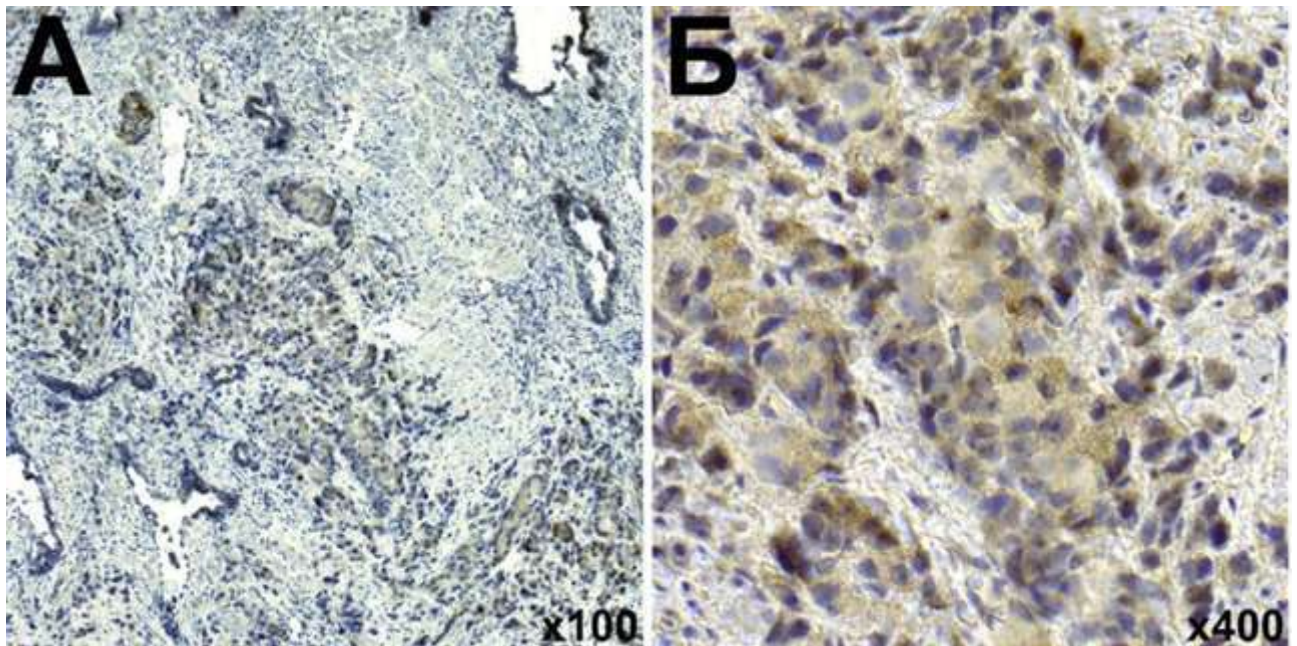


Рисунок 5.7 – ІГХ дослідження експресії Вах у тканині РПЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Casp3 виявлялася у неопластичних клітинах та поодиноких елемента пухлинної стромы. Даний протеїн був присутній у цитоплазмі та мав порівняно нижчу інтенсивність забарвлення. У досліджуваних зразках в середньому виявлялося $31,88 \pm 1,79$ ІГХ-позитивних клітин (рис. 5.8). Також було встановлено значну його присутність у клітинному детриті у місцях локалізації вогнищ некрозів (рис. 5.8А)

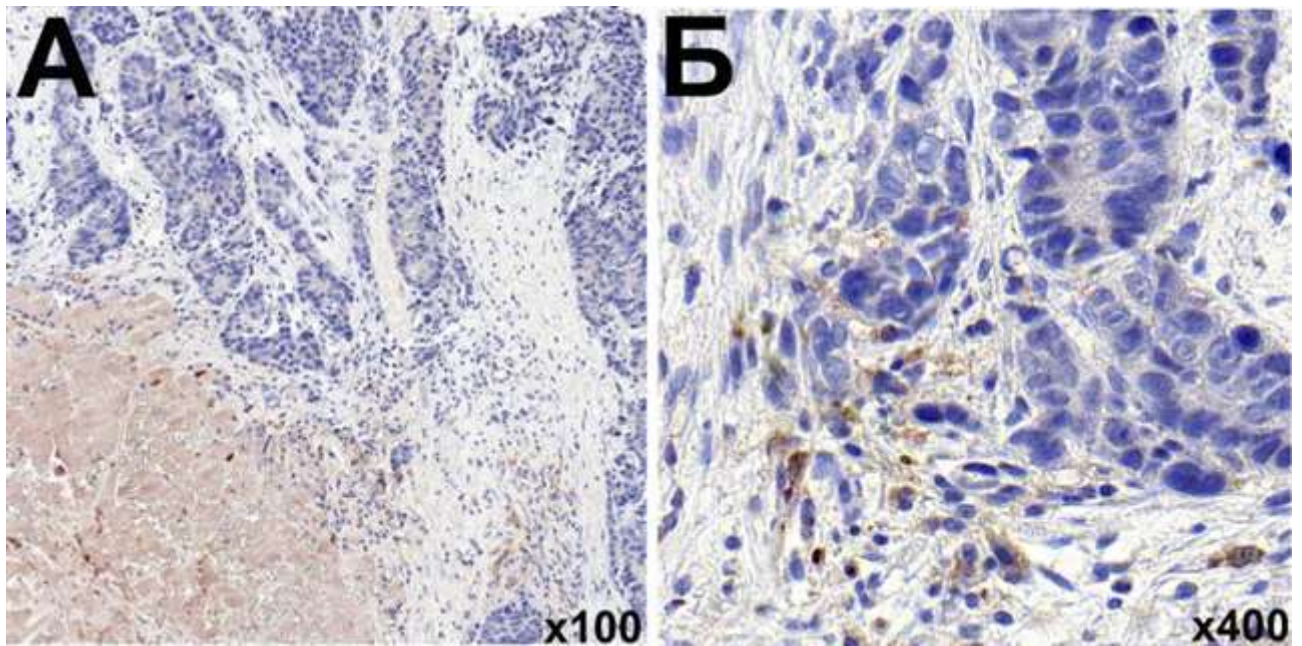


Рисунок 5.8 – ІГХ дослідження експресії Casp3 у тканині РПЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Для ОСН була характерною змішана цитоплазматично-ядерна локалізація ІГХ забарвлення та низька його інтенсивність. Він виявлявся як у структурі пухлинних клітин, так і в дифузно розміщених клітинних елементах пухлинної строми та запального інфільтрату, секреті неопластичних залоз. У тканині РПЗ II групи було виявлено в середньому $36,80 \pm 2,50$ ОСН-позитивних клітин (рис. 5.9). Інтенсивність його експресії пухлинною тканиною підвищувалася за наявності вогнищ запалення. Процеси ремоделювання сполучнотканинного матриксу РПЗ були вивчені за допомогою оцінки рівнів експресії Col I, Col II та MMP1.

Col I у зразках РПЗ II групи був присутнім у вигляді поодинокі розміщених волокон, які мали неоднорідну інтенсивність забарвлення. Їхня локалізація була дифузною. В середньому $28,19 \pm 1,17$ % площі пухлинної строми були позитивними щодо експресії Col I (рис. 5.10А-Б). ІГХ виявлення Col II у тканині РПЗ вказало на його незначний вміст у пухлинній тканині. Так лише $10,69 \pm 0,56$ неопластичної тканини були позитивними щодо експресії Col II (рис. 5.11А-Б).

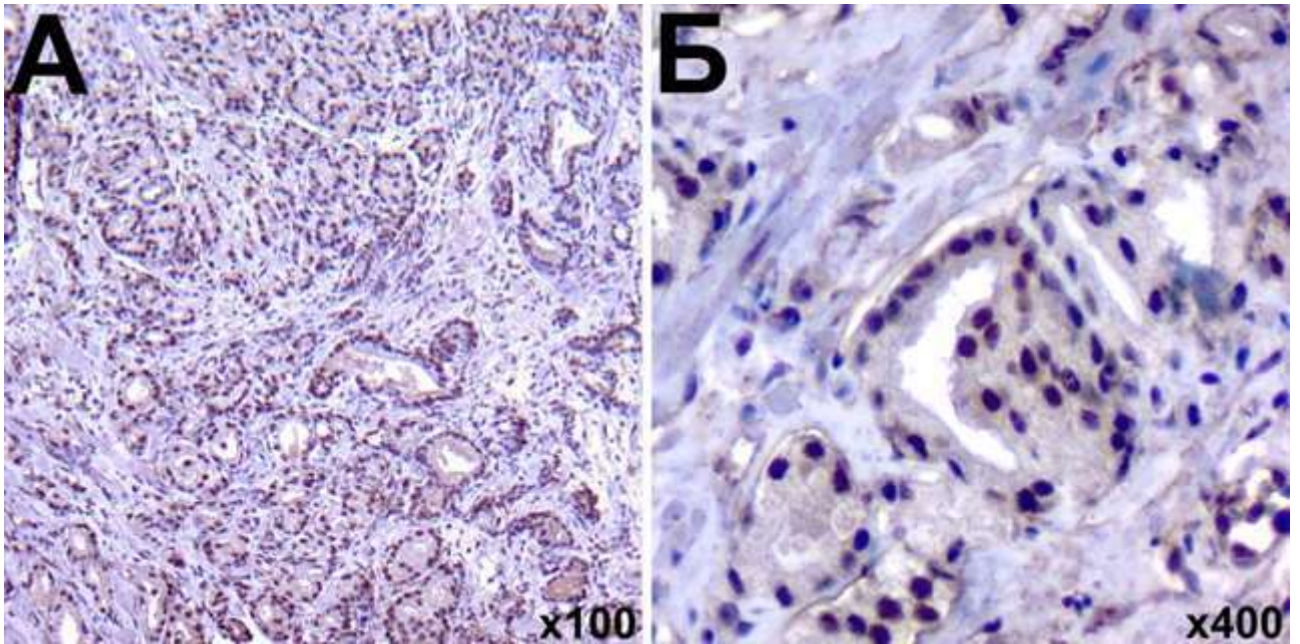


Рисунок 5.9 – ІГХ дослідження експресії ОСН у тканині РПЗ ІІ групи.
Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення
вказане у правому нижньому куті зображення

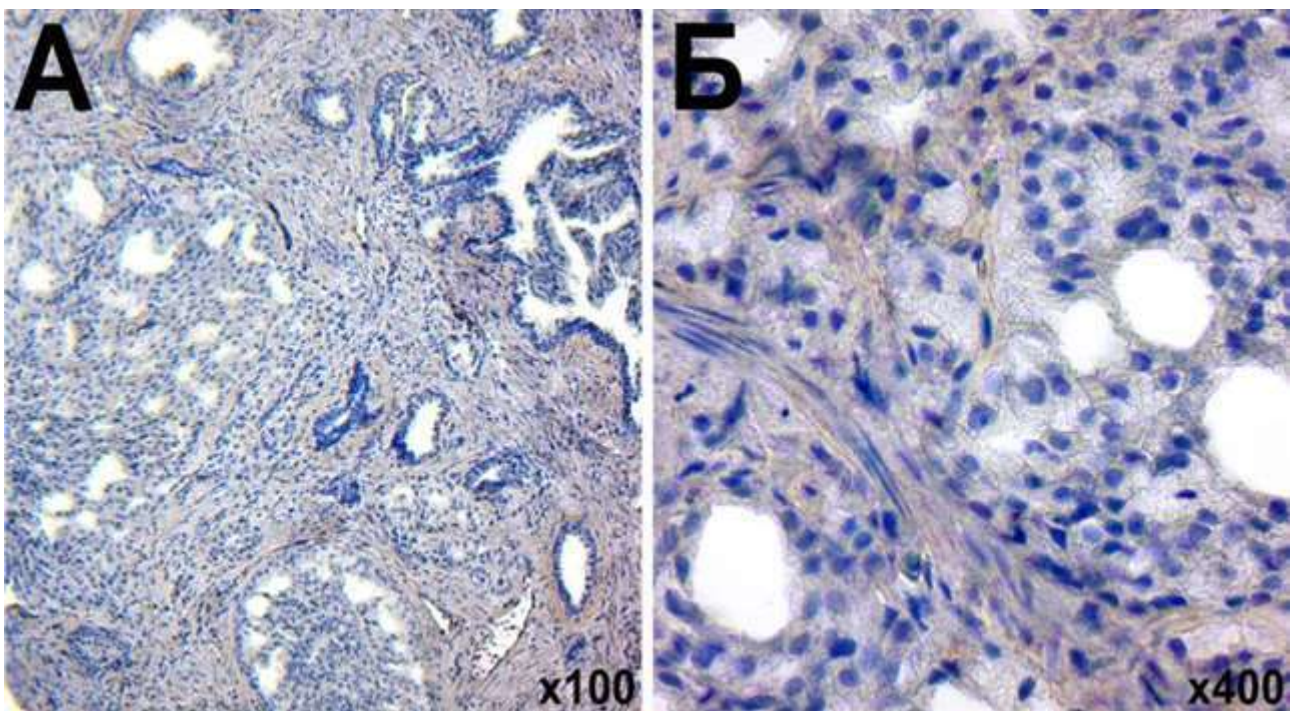


Рисунок 5.10 – ІГХ дослідження експресії Col1 у тканині РПЗ ІІ групи.
Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення
вказане у правому нижньому куті зображення

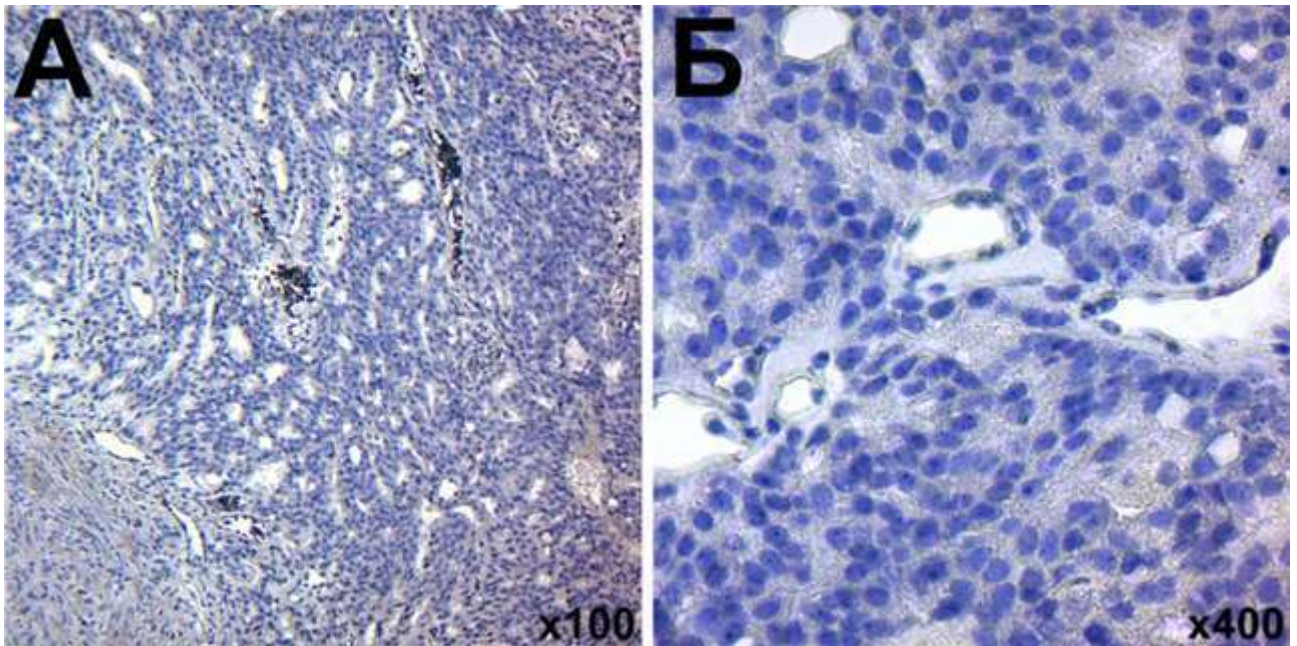


Рисунок 5.11 – ІГХ дослідження експресії Col II у тканині РПЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

MMP1 виявлялася у вигляді дифузного цитоплазматичного ІГХ забарвлення, яке мало варіабельну інтенсивність сигналу. У РПЗ II групи в середньому було виявлено присутність $36,84 \pm 1,88$ MMP1-позитивних клітин в полі зору (рис. 5.12). Рівень експресії MMP1 підвищувався зі зростанням ступеня злоякісності пухлинної тканини та інтенсивності інвазивного росту.

Для дослідження інтенсивності процесів неоангіогенезу у тканині РПЗ був використаний маркер VEGF. Він мав виражений цитоплазматичний характер експресії, виявлявся у структурі неопластичних клітин, елементах стромального компоненту пухлин та капілярах. Також відмічалася порівняно висока інтенсивність ІГХ сигналу. У неопластичній тканині цієї групи в середньому було виявлено $61,46 \pm 2,92$ VEGF-позитивних пухлинних клітин (рис. 5.13).

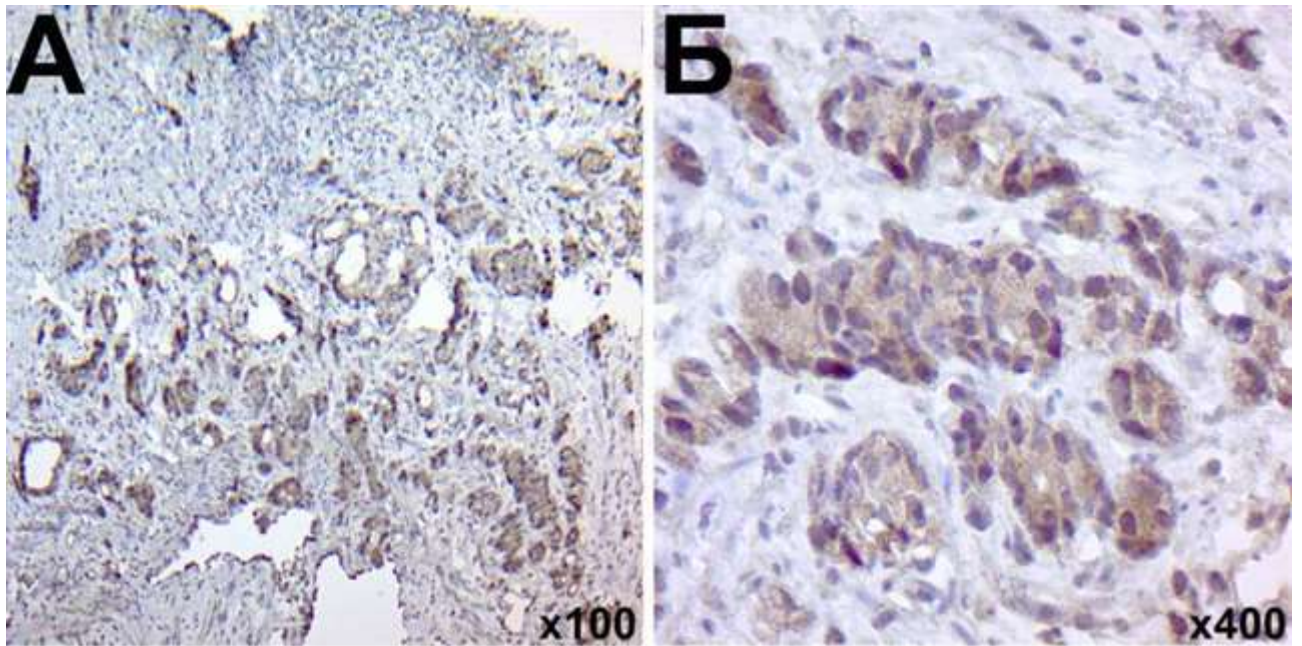


Рисунок 5.12 – ІГХ дослідження експресії MMP1 у тканині РПЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

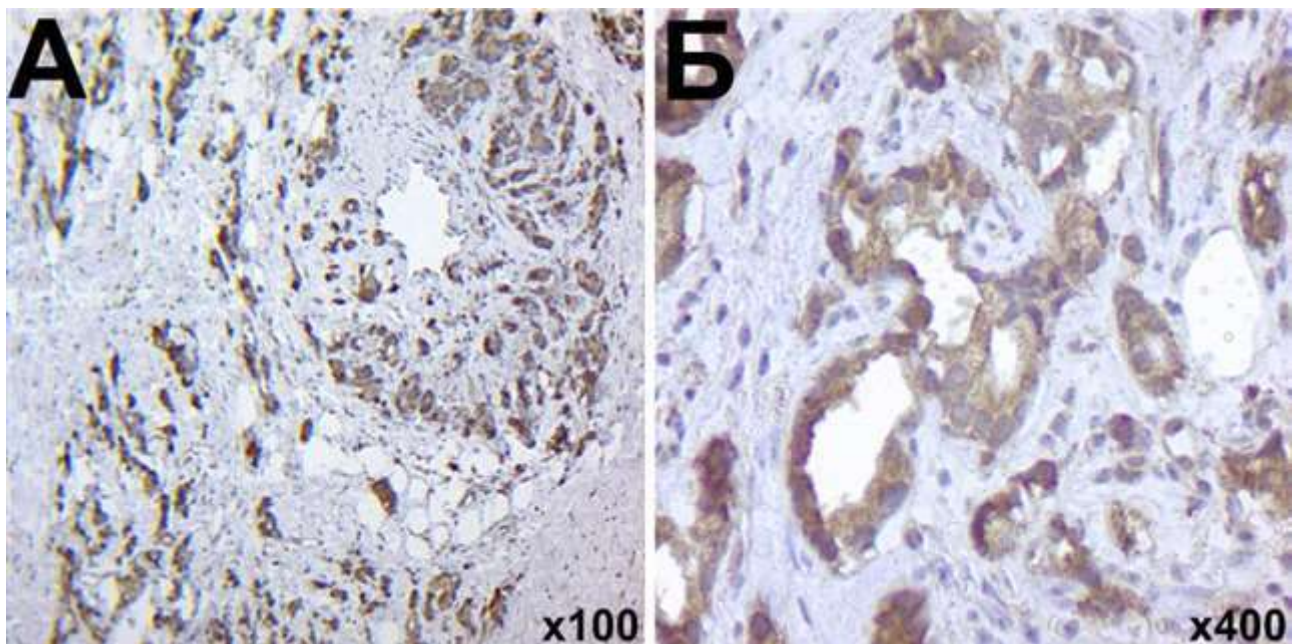


Рисунок 5.13 – ІГХ дослідження експресії VEGF у тканині РПЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

У неопластичній тканині II групи в середньому було виявлено $267,73 \pm 18,32$ Hsp70-позитивних клітин з ядерно-цитоплазматичною локалізацією ІГХ забарвлення (рис. 5.14). Інтенсивність експресії даного протеїну значно варіювала між зразками. Імунопозитивні клітини розміщувалися переважно дифузно, без чітких закономірностей. Також виявлялася позитивна ІГХ-колоризація секрету неопластичних залоз, елементів стромального компоненту пухлин та клітинних елементів запальних інфільтратів.

Hsp90 мав переважно ядерно-цитоплазматичний патерн експресії, імунопозитивні клітини розміщувалися дифузно та невелики групами без чітких закономірностей локалізації. У неопластичній тканині РПЗ II групи в середньому було виявлено $434,14 \pm 21,63$ Hsp90-позитивних ракових клітин (рис. 5.15).

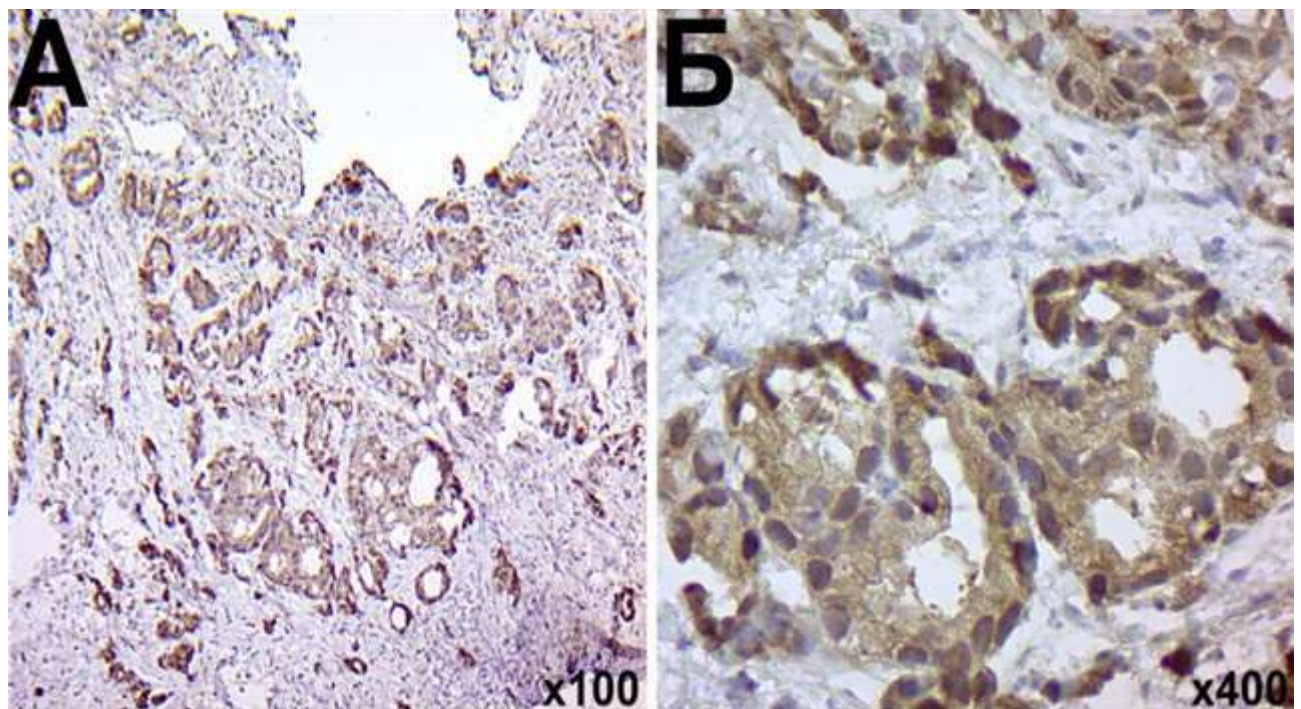


Рисунок 5.14 – ІГХ дослідження експресії Hsp70 у тканині РПЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

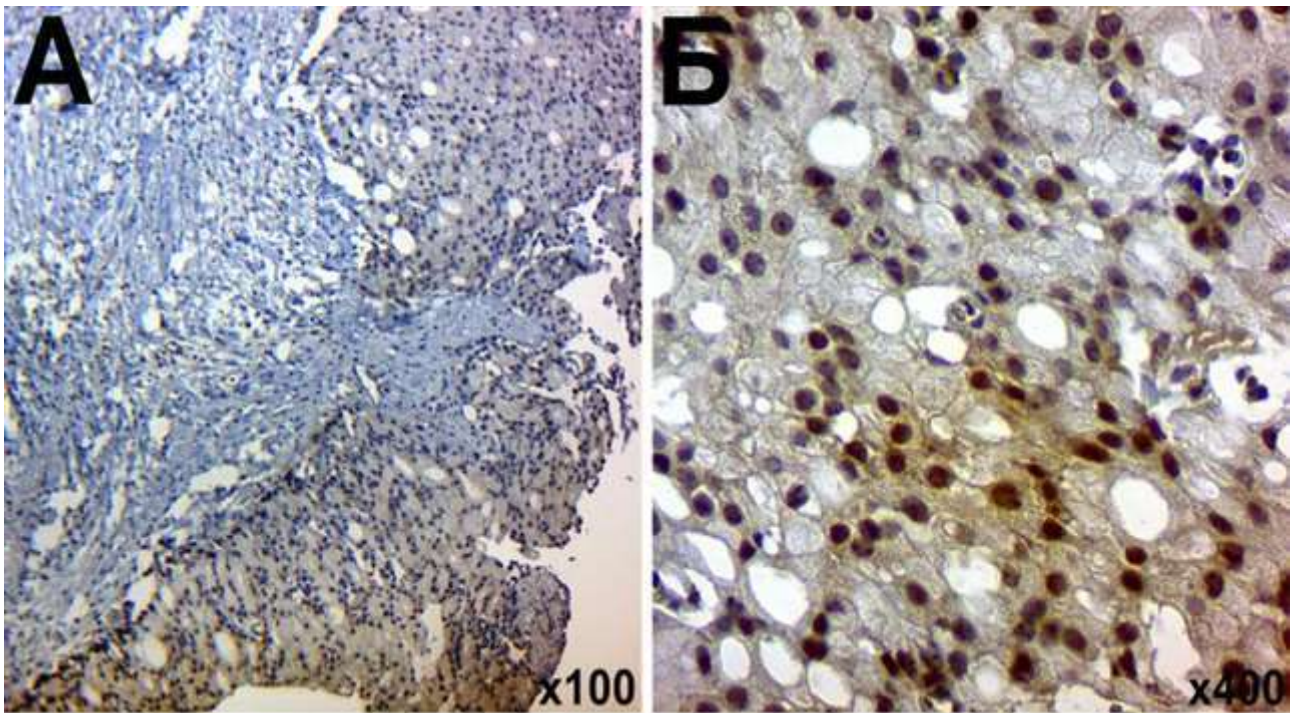


Рисунок 5.15 – ІГХ дослідження експресії Hsp90 у тканині РПЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Зразки РПЗ II групи характеризувалися помірним ступенем розвитку запалення. Так, у пухлинній тканині даної групи в середньому було виявлено $92,14 \pm 4,12$ CD68-позитивних клітин (рис. 5.16). Вони розміщувалися переважно у місцях локалізації хронічних запальних інфільтратів. Також відмічалася підвищена присутність тканинних макрофагів у місцях пухлинної інвазії до оточуючих тканин.

У тканині РПЗ II групи в середньому виявлялося $13,89 \pm 1,26$ МРО-позитивних клітин у полі зору. Вони мали дифузне цитоплазматичне забарвлення, розміщувалися дифузно чи малими групами. Було відмічено їхню переважну локалізацію у вогнищах гострого запалення, вогнищах некрозів та посеред клітинного детриту, де вони розміщувалися із високою щільністю. У деяких випадках вони мали інтралюмінальне розміщення (рис. 5.17).

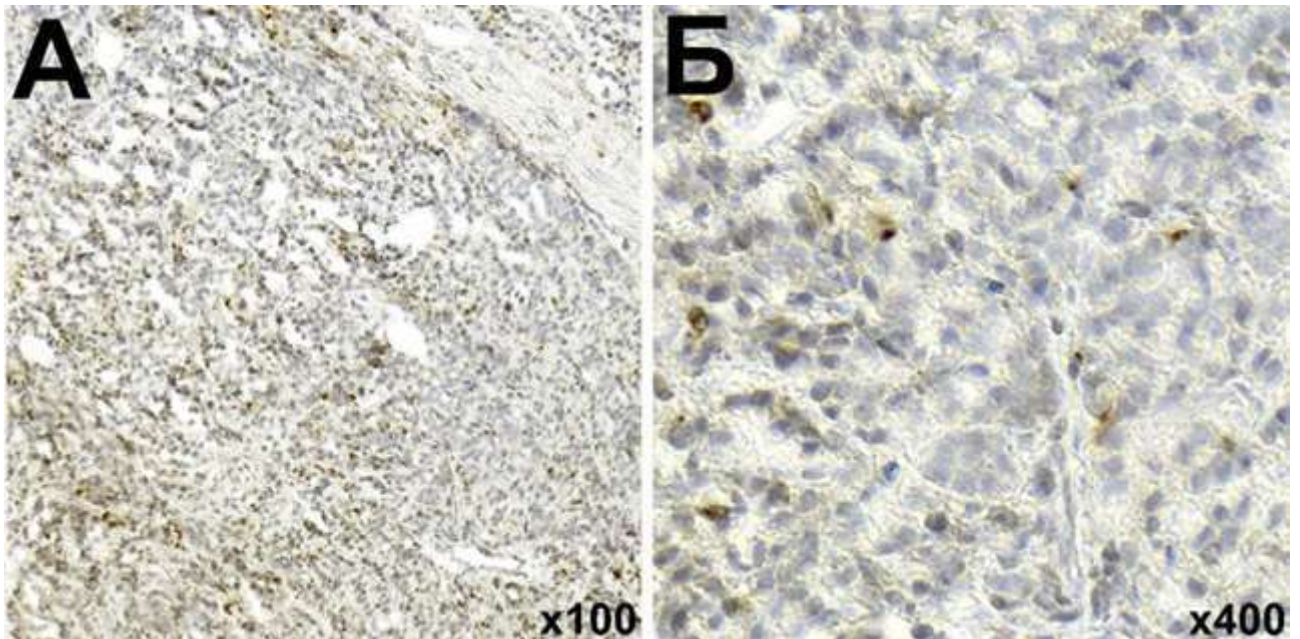


Рисунок 5.16 – ІГХ виявлення CD68-позитивних клітин у тканині РПЗ ІІ групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

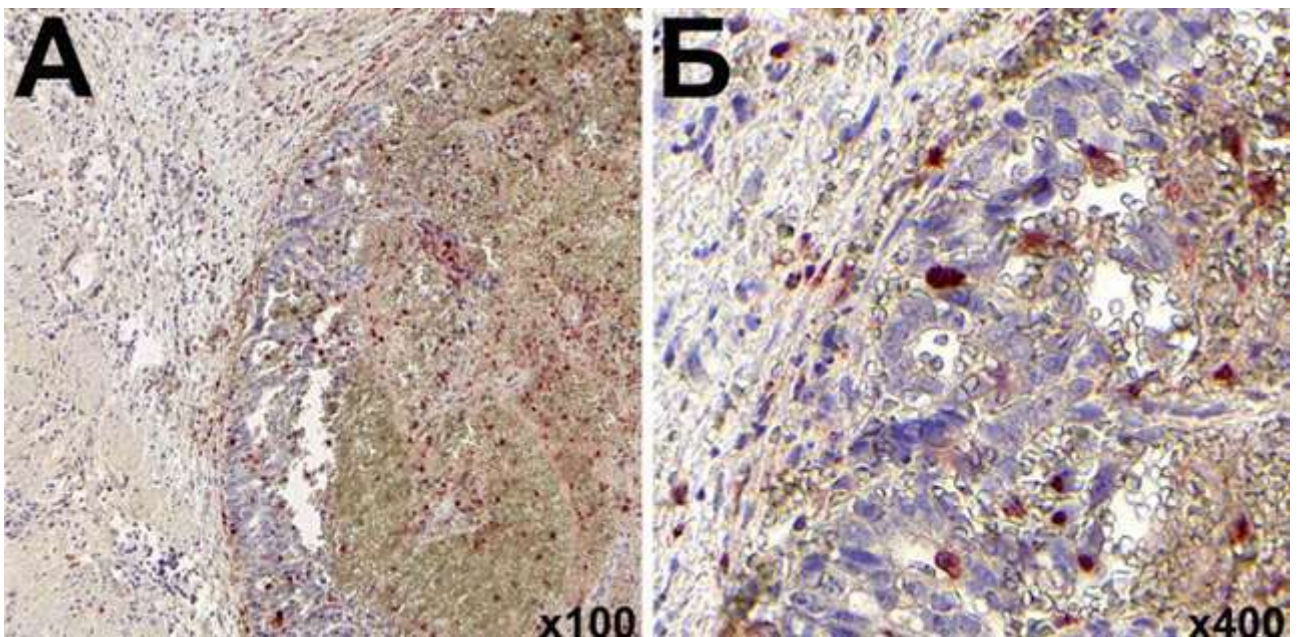


Рисунок 5.17 – ІГХ виявлення МРО-позитивних клітин у тканині РПЗ ІІ групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказане у правому нижньому куті зображення

Таким чином, було проведене морфологічне та імуноморфологічне дослідження тканини РПЗ без ІЛВ. Було встановлено, що пухлинні клітини мають порівняно нижчий рівень вмісту нейтральних полісахаридів, виявлених за допомогою PAS-реакції, низьку присутність кислих глікозаміногліканів та помірний вміст сульфатованих глікозаміногліканів як у тканині РПЗ, так і в секреті неопластичних залоз. Нами не було встановлено чітких закономірностей локалізації експресії маркерів апоптозу (p53, Bax, Casp3), MMP1, AP, VEGF, білків теплового шоку (Hsp70, Hsp90) у пухлинній тканині РПЗ без ІЛВ. Зразки даної групи також мали незначну чи негативну експресію остеобластичних маркерів (Col I, Col II та ОСН). Було встановлено, що переважним місцем локалізації MPO та CD68–позитивних клітин є вогнища некрозів та запальних інфільтратів.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[234, 237, 241, 243, 248, 253, 259, 260, 266]

РОЗДІЛ 6

МОРФОЛОГІЧНИЙ І ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ МІНЕРАЛЬНОЇ СКЛАДОВОЇ БІОМІНЕРАЛЬНИХ ІЛВ РПЗ

Комплекс морфологічних досліджень біомінерального компоненту простатолітів, які були виявлені у тканині РПЗ, складався з макроскопічного дослідження, гістохімічного забарвлення мікрокальцифікатів за методом фон Косса та алізариним червоним; окремо для макроскопічних простатолітів – проведення рентгенівської дифракції після термічної обробки при різних температурних режимах (200°C та 900°C), сканувальної електронної мікроскопії з рентгенівським мікроаналізом (SEM/EDX), просвічувальної електронної мікроскопії та інфрачервоної спектроскопії.

Межею поділу між макроскопічними та мікроскопічними ПК нами було визначено діаметр утворення 1000 мкм. Якщо простатоліт був більше 1000 мкм, по-перше його можна відносно легко помітити неозброєним оком, по-друге – такі конкременти повністю руйнувалися при гістологічній обробці тканини, в подальшому їхні фрагменти вимивалися з тканини під час забарвлення препарату. З іншого боку, простатоліти меншого розміру надзвичайно важко виявити неозброєним оком під час макроскопічному дослідженні, але вони краще зберігаються при забарвленні тканини і виготовленні мікропрепаратів. На відміну від макропростатолітів, мікроскопічні конкременти рівномірно виявлялися по всій тканині органа без переважання в певній локації.

Макроскопічно простатоліти були представлені твердими конкрементами, діаметром від 0,1 до 0,8 см. Середній розмір цих утворень становив $0,37 \pm 0,06$ см. Дані утворення мали переважно округлу форму, їхній колір варіював від темно-коричневого до світло-жовтого. Дрібні конкременти (діаметром до 0,3 см) мали полігональну форму (Рис. 4.1Б). В окремих випадках виявлялися поодинокі конкременти, які мали більший діаметр. Для конкрементів більших розмірів (більше 0,3 см діаметром) був

характерний більш світлий колір. Макроскопічні простатоліти частіше виявлялися у периферичних частинах передміхурової залози.

Окрім макроскопічних ПК у тканині РПЗ виявлялися мікроскопічні простатоліти. Виявлення мікроскопічних конкрементів проводилося під час дослідження нативних препаратів РПЗ у фазовому контрасті світлооптичного мікроскопа. Мікроскопічні ПК виявлялися у вигляді напівпрозорих округлих утворень які знаходилися у просвіті залоз та мали гомогенну структуру (рис. 6.1А). Крохмальні тільця демонстрували дещо нижчий показник заломлення, тому вони мали нижчу інтенсивність контрастування та шарувату структуру. Також ці утворення здебільшого повторювали форму залоз, де вони були виявлені. При застосуванні світла з довжиною хвилі 495 нм ПК демонстрували інтенсивний люмінісцентний сигнал, який перевищував фон від сполучної тканини (рис. 6.1Б).

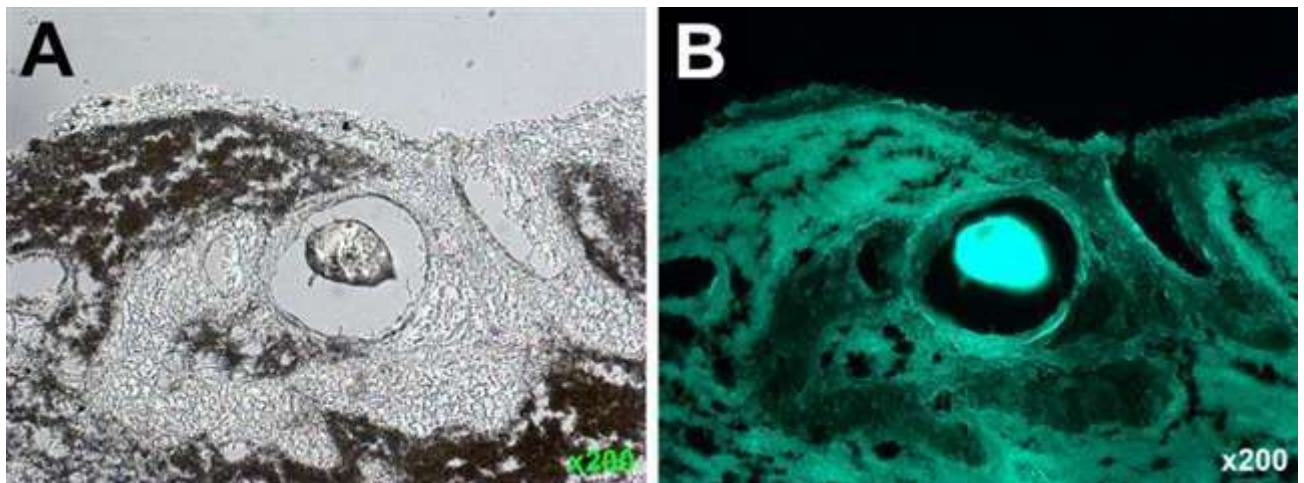


Рисунок 6.1 – Виявлення мікроскопічних простатолітів. А – РПЗ з ПК у фазовому контрасті; В – люмінісценція ПК в флуоресцентному світлі (495 нм). Збільшення вказане в правому нижньому куті зображення

6.1 Гістологічне та гістохімічне дослідження мікропростатолітів

Під час гістологічному дослідженні тканини РПЗ з мікропростатолітами було виявлено, що вони мали однорідну структуру, діаметр до 1000 мкм. Як правило, ці утворення знаходилися у просвітах

псевдозалозистих структур чи безпосередньо у пухлинній тканині. Середній розмір мікроскопічних ПК склав $258,98 \pm 41,5$ мкм.

Структура мікроскопічних ПК у значній кількості випадків була пошкодженою чи фрагментованою внаслідок виготовлення гістологічних препаратів (викришування під час зрізання ножем мікротому, вимивання під час забарвлення).

Під час забарвлення гістологічних препаратів I групи за допомогою алізаринового червоного (за МакГі-Расселом), було виявлено присутність яскраво-червоних ділянок без чітких меж. Їхня локалізація відповідала положенню ПК чи їхніх фрагментів (рис. 6.2). Присутність позитивного забарвлення свідчить про вміст солей кальцію у структурі ПК. Однак, за допомогою даного методу неможливо провести чітке диференціювання кальцій-вмісних сполук у структурі ПК. Це пов'язано з тим, що алізариновий червоний здатний з'єднуватися зі всіма кальцій-вмісними солями (окрім оксалатів кальцію). Одночасно з тим тканина РПЗ, що містила у своїй структурі СА, демонструвала негативну гістохімічну реакцію під час забарвлення гістологічних препаратів алізариновим червоним.

Для верифікації присутності фосфатних залишків у структурі ПК, було виконане гістохімічне забарвлення препаратів за методом фон Косса. Позитивні структури мали яскраво-чорне забарвлення (рис. 6.3). Їхня локалізація також співпадала із розміщення фрагментів ПК. СА та тканина, що їх оточує, не забарвлювалися за методом фон Косса. Таким чином було встановлено, що сполуки кальцію у структурі ПК були представлені у формі фосфату кальцію.

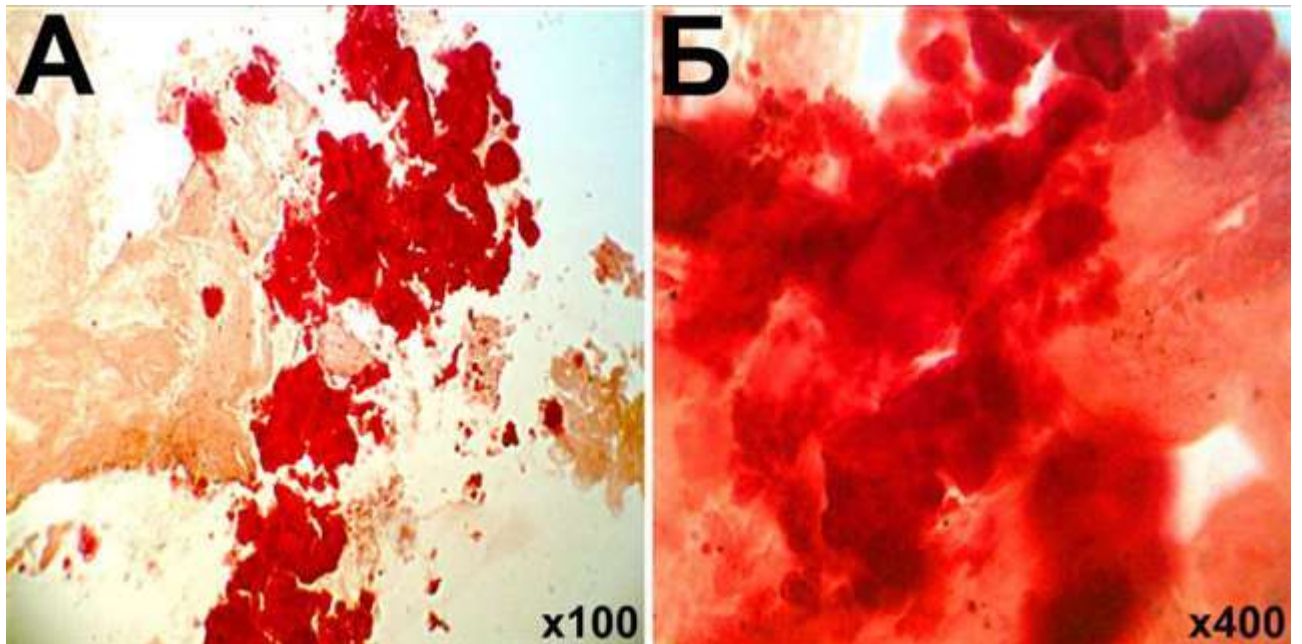


Рисунок 6.2 – Гістохімічне дослідження тканини РПЗ. Забарвлення алізариновим червоним. Збільшення вказане у правому куті кожного зображення.

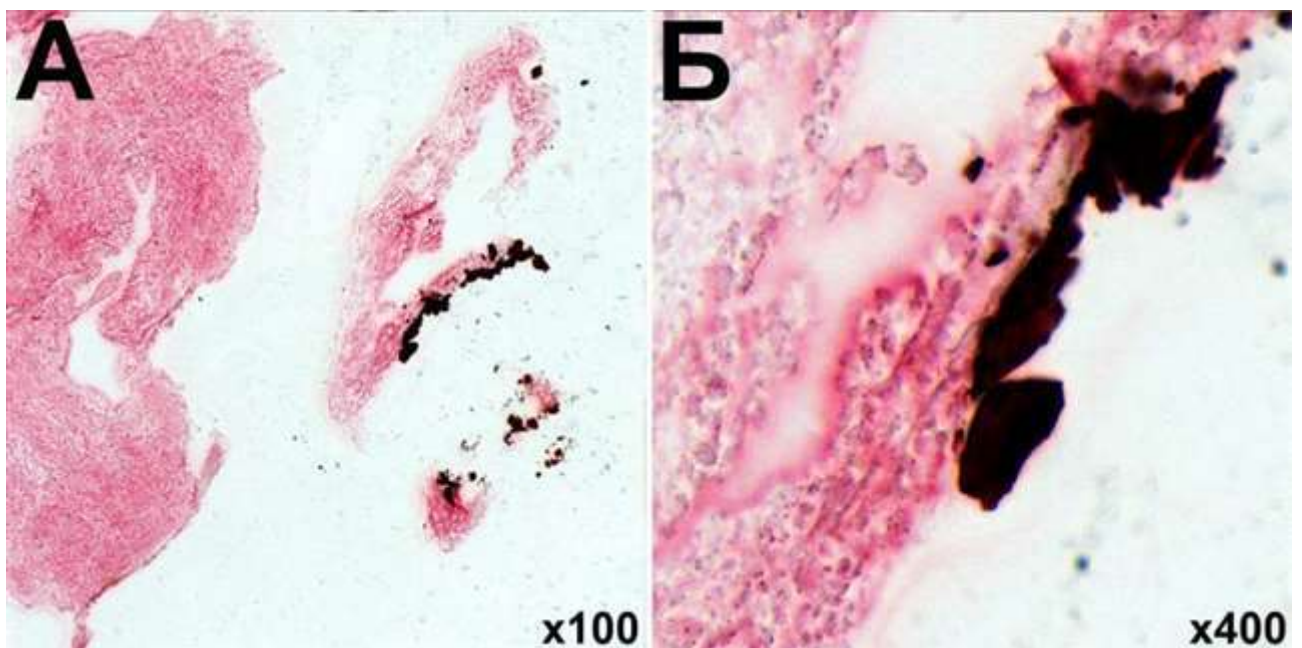


Рисунок 6.3 – Гістохімічне дослідження тканини РПЗ. Забарвлення за методом фон Косса. Контрастування ядер ядерним швидким червоним. Збільшення вказане у правому куті зображення

6.2 Сканувальна електронна мікроскопія

Пробопідготовка макроскопічних ПК для СЕМ проводилася шляхом виготовлення шліфів з простатолітів, залитих в епоксидну смолу. На відміну від біомінеральних утворень, які не утворюють форму каменів-конкрементів при біомінералізації інших локалізаціях (серцево-судинної система, щитоподібна залоза), макроскопічні камені ПЗ мають більшу твердість і краще зберігають форму під впливом фізичних сил, що дає можливість обробки шляхом шліфування.

СЕМ шліфів ПК показала шарувату будову цих утворень. Окрім концентричних кіл та пластин, структура конкрементів характеризувалася присутністю відносно рівних ділянок, ділянок з дрібнопористою поверхнею (рис. 6.4А). В окремих ділянках ПК, перпендикулярно до концентричних ліній, виявлялася хвилеподібна деформація мінеральних пластин (рис. 6.4Б). На поверхні окремих пластин виявлялися дрібні кристалічні утворення у вигляді голок та полігональних структур. Між концентрично розміщеними мінеральними пластинами знаходилися ділянки неструктурованої мінералізованої речовини. Необхідно відмітити ритмічність чергування структурованих (пластинчастих) і менш структурованих (решітчастих, аморфних) ділянок у структурі простатолітів (рис. 6.4А-Б).

У результаті проведення енергодисперсійного аналізу з поверхні підготованих препаратів було встановлено, що мінеральний компонент в основному складався з кальцію та фосфору (рис. 6.4В). Їхнє співвідношення загалом відповідало гідроксиапатиту ($\text{Ca/P}=1,67$), хоча розкид значень мав досить великий діапазон і залежав від вибору точки накопичення сигналу. Присутність майже у всіх досліджуваних випадках невеликої кількості калію, магнію, цинку є дуже цікавою. З одного боку це може свідчити про можливість ізоморфних заміщень у структурі апатиту та співіснування мінорних кристалічних фаз (магній-вмісний фосфат кальцію (β -три-кальцій-магній фосфат, $(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$), з іншого боку – ці хімічні елементи можуть

не входить до складу апатиту і знаходиться в гідратній оболонці поза кристалічною ґраткою.

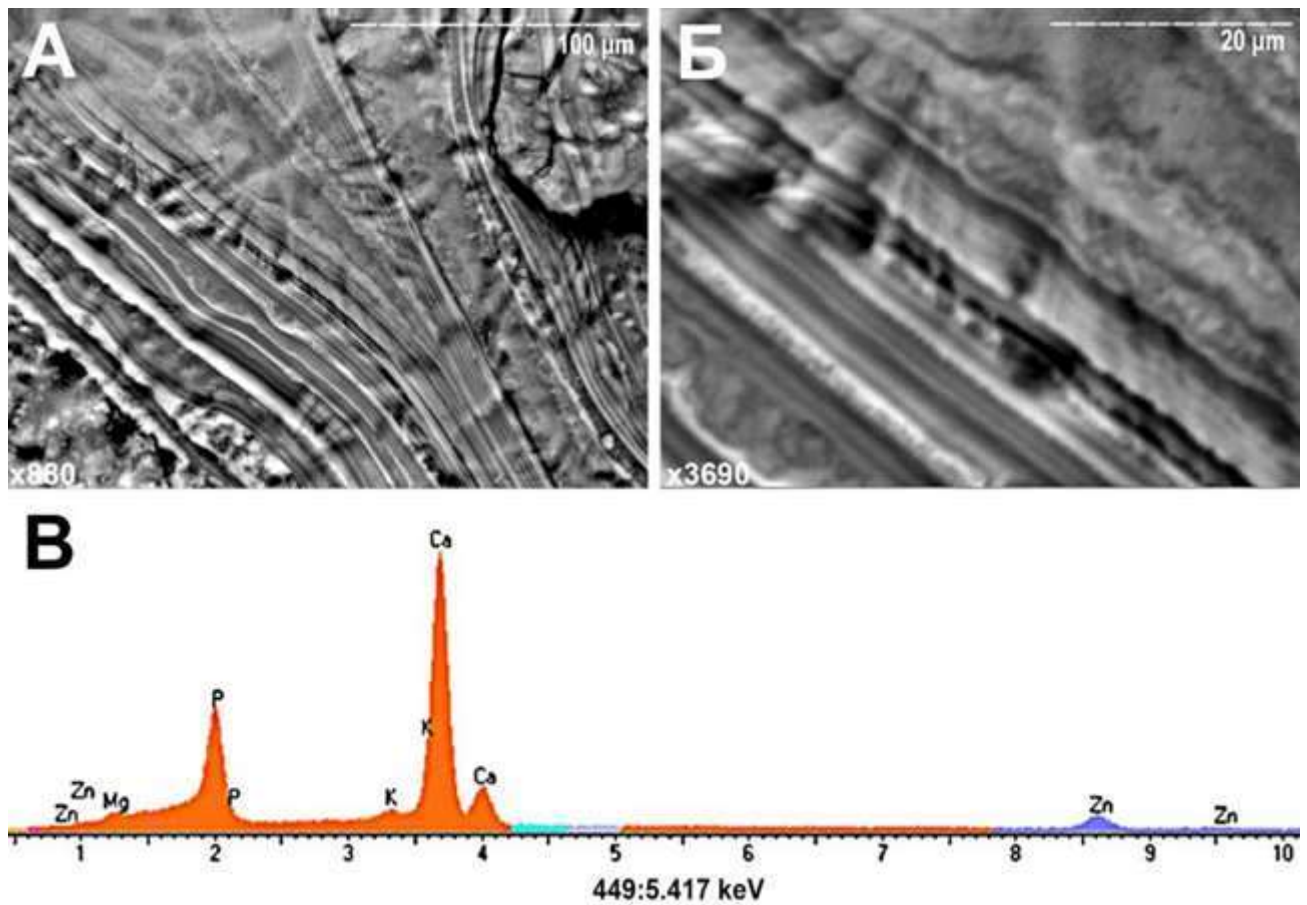


Рисунок 6.4 – Дослідження мінеральної складової макроскопічного ПК. А-Б – сканограма поверхні шліфа ПК, збільшення x880 та x3690 відповідно, В – енергодисперсійна спектроскопія з поверхні простатоліта

SEM/EDS також була проведена в іншій модифікації з використанням гістологічних зрізів (за методикою Москаленка Р.А. та ін.) [215]. У досліджених зразках ПК виявлялися як округлі чи фрагментовані інтралюмінальні утворення, що мали підвищений електронний опір (рис. 6.5А-Б). Проведене EDS-дослідження підтвердило присутність значної кількості кальцію та фосфору у біомінералізованих ІЛВ зі співвідношенням $\text{Ca/P}=1,67$, що також вказує на їхню гідроксиапатитну природу (рис. 6.5В)

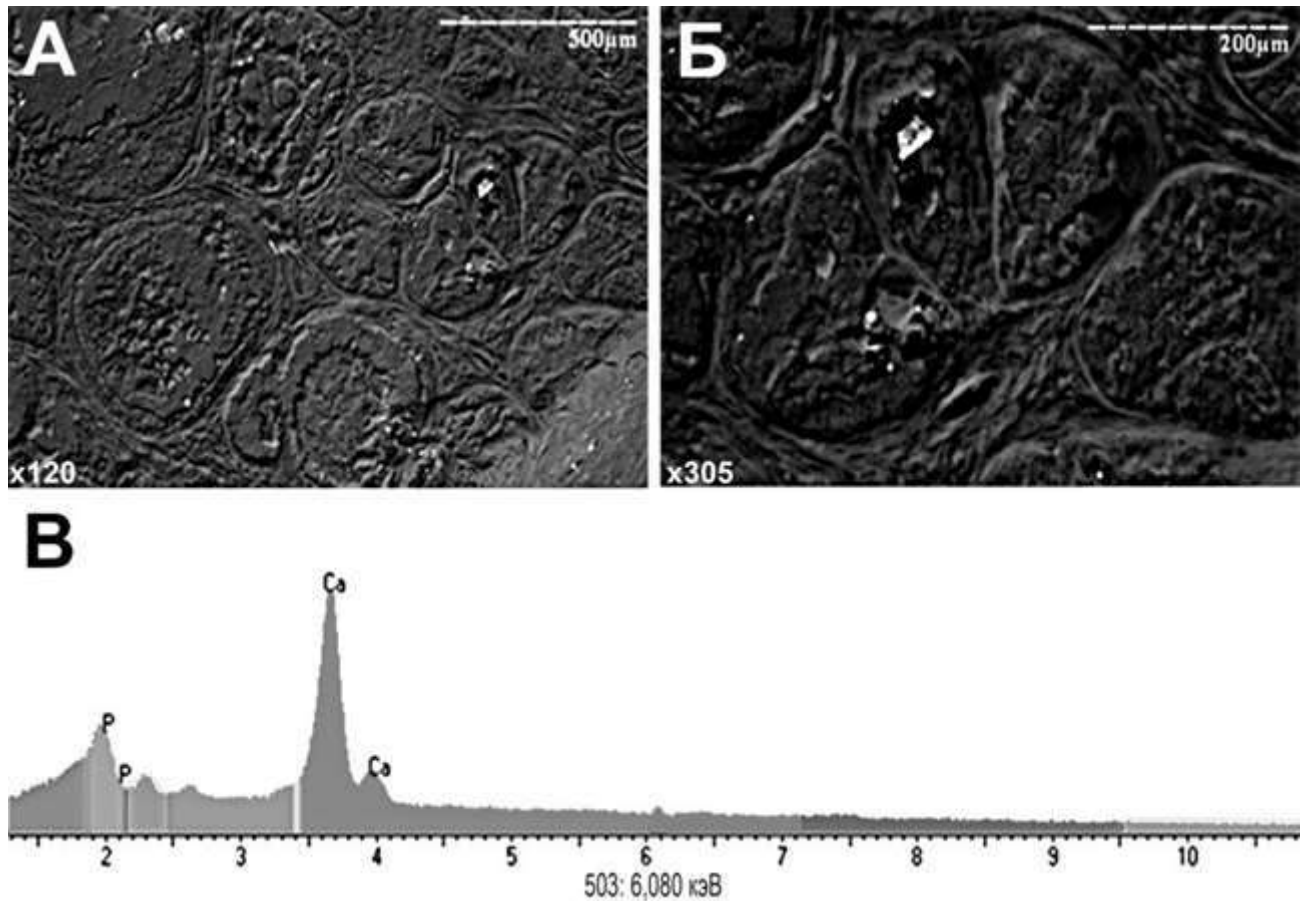


Рисунок 6.5 – Дослідження мінеральної складової мікроскопічного ПК. А-В – сканограма поверхні гістологічного зрізу тканини, збільшення x120 та x305 відповідно, С – енергодисперсійна рентгенівська спектроскопія з поверхні простатоліта

6.3 Рентгенодифракційне дослідження макроскопічних простатолітів

У зв'язку з особливостями цього методу дослідження і проведення пробопідготовки – необхідність значної кількості біомінерального матеріалу (0,1-1,0 г), рентгенодифракційне дослідження можливе лише для макроскопічних простатолітів. Фазовий склад мінераліних депозитів РПЗ досліджувався за умов двох температурних режимів підготовки зразків – після відпалювання конкрементів при 200 °С та 900 °С.

Рентгенівські дифрактограми простатолітів (рис. 6.6) характеризуються розмитими лініями, які часто перекриваються. Також відмічається уширення

окремих відрізків дифрактограми. Аналіз фазового складу зразків показав наявність апатиту з різним ступенем кристалічності для всіх простатолітів. Для більшості зразків оцінка розмірів кристалітів за Шеррером в напрямку нормалі до площини (002) дає розкид значень від 14 до 30 нм. Зазначені особливості показують подібність структури кристалітів патологічних біомінералів РПЗ до фізіологічної будови кристалітів кісткової тканини.

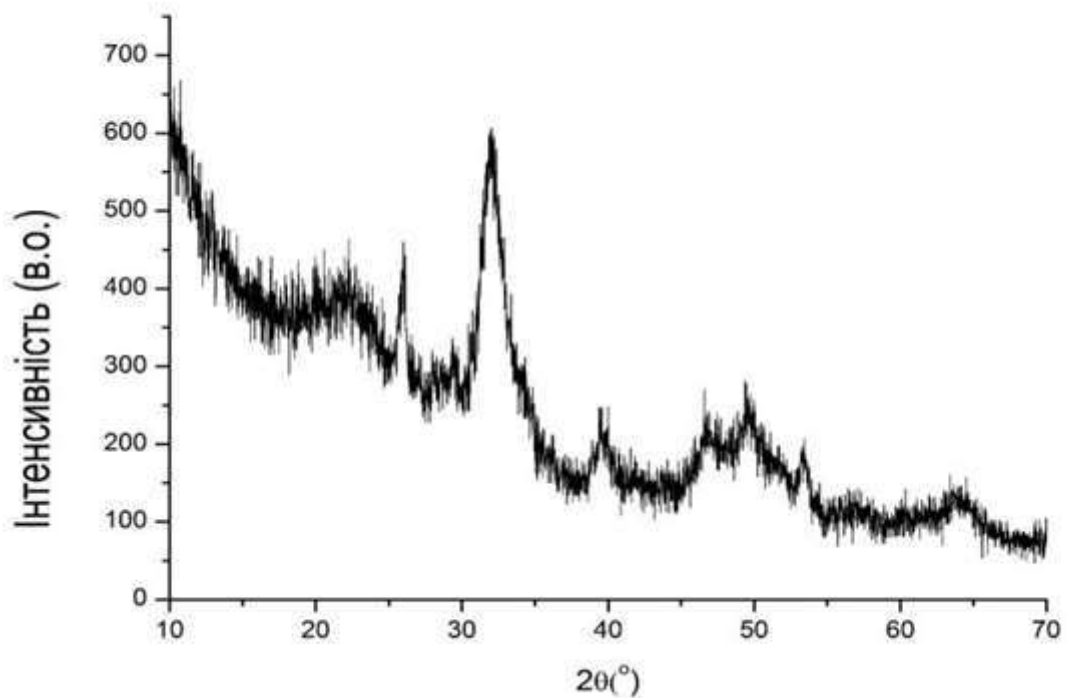


Рисунок 6.6 – Типова дифрактограма макроскопічних простатолітів після термообробки при 200 °С, індексами hkl (002) відмічена лінія апатиту, з-за розширення якої оцінювалися розміри кристалітів)

Дослідження біомінерального компоненту простатолітів після термообробки при 900 °С дозволяє повністю видалити органічні домішки і розкласти біомінерал на основні фази. За результатами проведеного дослідження у простатолітах РПЗ окрім основної фази гідроксиапатиту, було виявлено оксид цинку та залізовмісний кальцію фосфат (рис. 6.7). Зазначені хімічні елементи входять до складу основних ферментів тканини ПЗ (цинк) та є складовою частиною гемоглобіну (залізо).

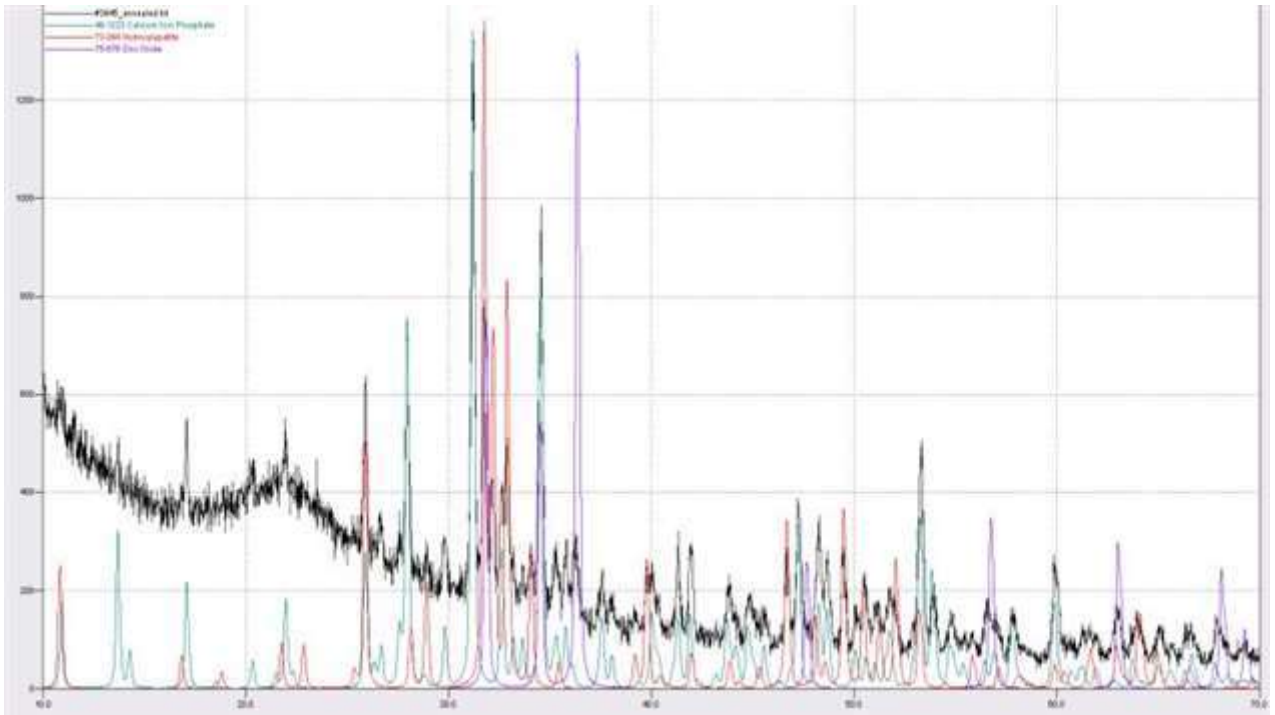


Рисунок 6.7 – Типова дифрактограма макроскопічних простатолітів після термообробки при 900 °С. Кольоровими лініями відмічені ZnO (фіолетова), залізовмісний кальцію фосфат (зелена) та гідроксиапатит (червона)

Для отримання повнішого уявлення про зародження та дозрівання патологічних біомінералів при РПЗ необхідне проведення більш поглибленого дослідження розмірів і форми кристалів за допомогою просвічувальної електронної мікроскопії з електронною дифракцією.

6.4 Просвічувальна електронна мікроскопія

ПЕМ була проведена для макроскопічних простатолітів (рис. 6.8А). Було виявлено, що кристали мінеральних депозитів простати мають округлу форму, їх діаметр становить від 20 нм до 50 нм. Структури більшого розміру (більше за 70-80 нм), очевидно є агломератами кристалів меншого розміру. Можна відмітити мономорфність кристалічних структур. Невеликий розмір кристалів вказує на високе співвідношення поверхня/об'єм.

При дослідженні електронної дифракції виявляються точковий вид дифракційних кілець, зумовлений тим, що дифракційна картина утворюється окремими монокристалами апатиту хаотичної орієнтації, які потрапили в зону опромінення первинним електронним пучком (рис. 6.8Б). Це вказує на апатитну природу нанокристалів простатолітів.

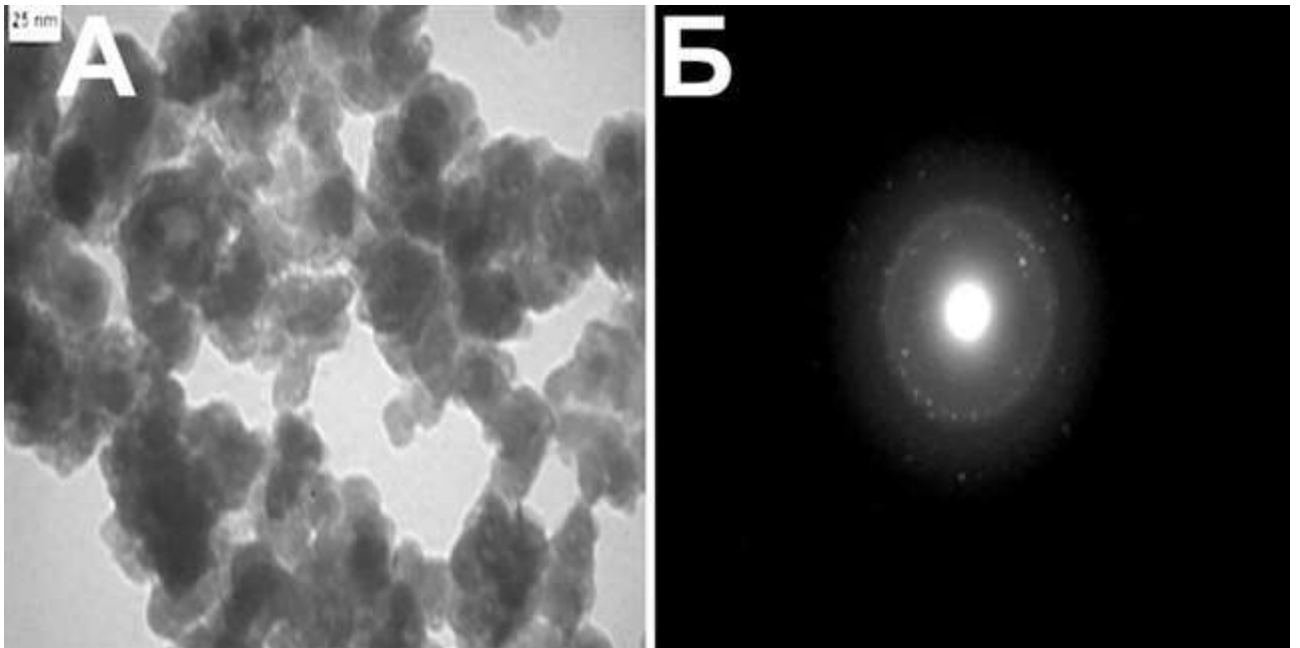


Рисунок 6.8 – Дослідження макроскопічних ПК за допомогою ПЕМ та електронної дифракції. А. Електронномікроскопічні зображення кристалічних частинок простатоліту. Збільшення $\times 54000$; Б. Типова картина електронної дифракції на кристалах кальцифікату простати

6.5 Інфрачервона спектроскопія

Результати інфрачервоної спектроскопії простатолітів (рис. 6.9) додатково підтверджують, що досліджені зразки біомінералів відносяться до апатитів. Також є підстави стверджувати про присутність у структурі апатиту карбонатних заміщень фосфатної групи ($\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$) та заміщень карбонат-іоном гідроксильної групи ($\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{OH}$).

Таким чином, апатит патологічних біомінеральних депозитів простати можна віднести до карбонатних апатитів (переважно В-типу, де іони CO_3^{2-}

заміщують групи PO_4^{3-}), що вказує на його кристалохімічну спорідненість з біоapatитом кісткової тканини.

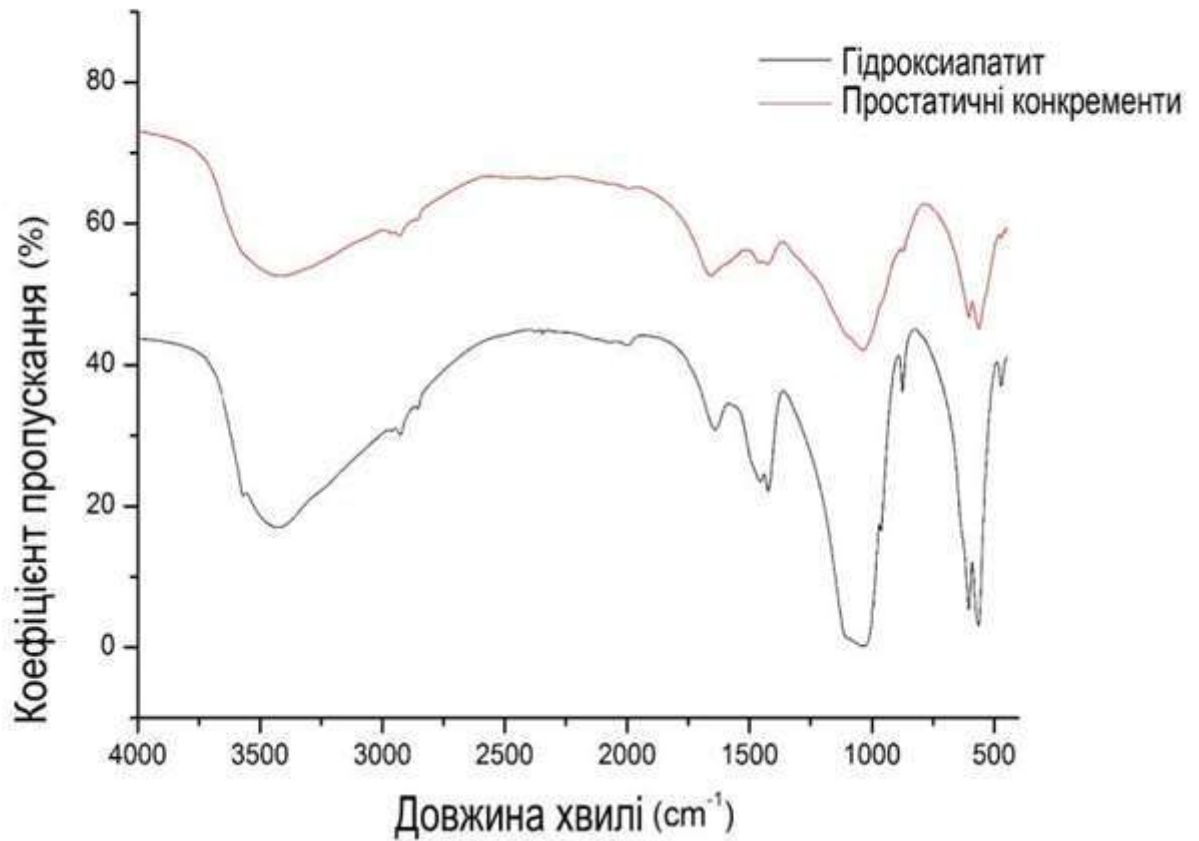


Рисунок 6.9 – Типовий інфрачервоний спектр макроскопічного простатоліта

На відміну від рентгенодифракційного дослідження, ПЕМ та електронно-дифракційне дослідження не мають обмежень щодо мінімального об'єму матеріалу, тому можуть бути використані для аналізу дрібних конкрементів чи їх фрагментів та залишків. Також результати дослідження дали можливість зрозуміти структурні та морфологічні особливості біомінералів у зв'язку з їхнім місцем локалізації в патологічному утворенні або ПЗ в цілому.

Таким чином, проведене гістохімічне дослідження показало, що біомінералізовані ІЛВ мають калцій-фосфатну природу, що підтверджується позитивними гістохімічними реакціями фон Косса та забарвленням

алізариним червоним. Було продемонстровано, що для виявлення мікроскопічних біомінералів може бути використана флуоресцентна мікроскопія нативних мікропрепаратів РПЗ з довжиною хвилі збудження 495 нм. СЕМ/ ЕДС показала присутність кальцію та фосфору у структурі біомінералізованих ІлВ у співвідношенні 1,67, що є характерним для гідроксиапатиту кальцію. Рентгенодифракційне дослідження мінерального компоненту ІлВ виявило його подібність до структур фізіологічної кісткової тканини. Результати проведеної ПЕМ вказали на апатитну природу ІлВ. За результатами інфрачервоної спектроскопії досліджені нами зразки були віднесені до апатитів із карбонатними заміщеннями у їхній структурі.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[253, 259]

РОЗДІЛ 7

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ІГХ ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ РПЗ ЗА УМОВ НАЯВНОСТІ ТА ВІДСУТНОСТІ ІЛВ

Статистичний аналіз отриманих результатів був проведений з використанням пакету програм Microsoft Excel 2010 з додатком AtteStat 12.0.5. Візуалізація розрахунків та даних проводилася за допомогою GraphPad Prism 8.0.

Усі дані були проаналізовані на тип розподілу за критерієм Шапіро-Уїлка. У випадку ненормального розподілу для оцінки статистичного критерію значущості використовували непараметричний критерій Манна-Уїтні, за нормального розподілу був використаний параметричний t- критерій Стьюдента (за умови підтвердження розбіжності за критерієм Фішера ($F_{\text{крит}} > F_{\text{експ}}$)).

Наша увага у ході ІГХ дослідження тканини РПЗ зосередилася на дослідженні гормональної чутливості до рецепторів андрогену (АР), присутності клітинних елементів запалення (CD68 та MPO), експресії білків апоптозу (p53, Вах та Casp3), інтенсивності неоваскулогенезу (VEGF), тканинного стресу (білки теплового шоку Hsp90 та Hsp70), інвазивного потенціалу (MMP1) та остеогенних білків (ОСН та Col I).

ІГХ дослідження експресії андрогенів у тканині РПЗ виконано з метою демонстрації збереження функціональної активності пухлинних клітин зразків обох груп. Під час ІГХ дослідженні АР у пухлинних клітинах та клітинних елементах пухлинної строми мали ядерну локалізацію забарвлення. Оцінка рівнів експресії АР не виявила статистично значимої різниці показників між РПЗ з простатолітами та у порівнянні з контролем ($p > 0,05$): у I групі було виявлено в середньому $378,85 \pm 22,42$ АР-позитвних клітин, показник групи РПЗ без ІлВ складав $421,02 \pm 32,82$ у одиниці полі зору (рис. 7.1).

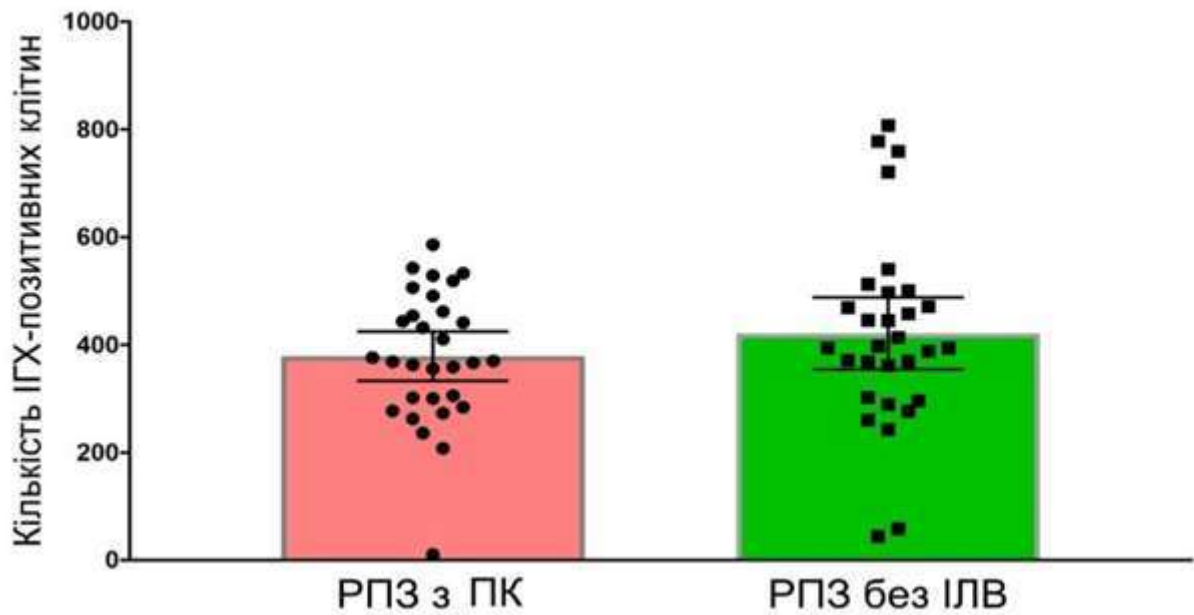


Рисунок 7.1 – ІГХ дослідження експресії АР у тканині РПЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності

Таким чином, не було виявлено достовірної різниці між показниками експресії АР обох досліджуваних груп.

Апоптичний потенціал пухлинної тканини РПЗ був досліджений за допомогою рівнів експресії пов'язаних протеїнів: p53, Вах та Casp3. Важливим компонентом p-53-опосередкованого апоптозу є родина білків bcl-2, які мають широкий спектр активності. Оцінку рівня елімінації клітин у патологічному осередку здійснювалося за допомогою маркера Casp3. Перевагою застосування Casp3 є те, що цей маркер прямо вказує на незворотні апоптотичні зміни клітин, що має перевагу над іншими маркерами (наприклад, Вах). Таким чином, ми можемо визначити превалюючий тип апоптозу у тканині РПЗ з простатолітазом.

Для встановлення апоптотичного потенціалу пухлинної тканини проводилося визначення присутності білка p53. Обидві групи мали порівняно низький рівень присутності цього протеїну. Порівняльний аналіз

не виявив достовірної різниці рівнів присутності p53 між групою РПЗ з простатолітами та РПЗ без ІлВ ($p > 0,05$) (рис. 7.2).

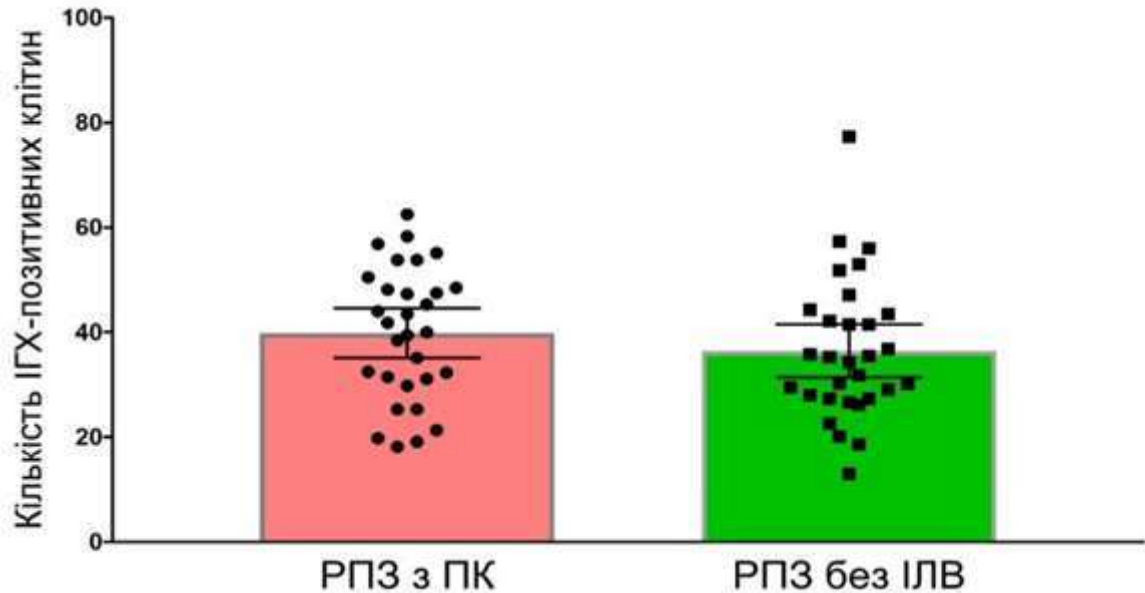


Рисунок 7.2 – ІГХ дослідження експресії білка p53 у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стовпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності

У тканині РПЗ з патологічними біомінеральними включеннями було виявлено достовірно вищий рівень експресії Вах. Так, у тканині РПЗ з простатолітами в середньому було виявлено $61,62 \pm 2,36$ Вах-позитивних клітин, у зразках РПЗ II групи $44,62 \pm 2,94$ клітин (рис. 7.3). Таким чином, експресія Вах залежить від наявності у тканині РПЗ інтралюмінальних включень ($p < 0,001$).

Подібна тенденція була виявлена і для іншого проапоптотичного маркера – Casp3. Так, у цій групі в середньому було виявлено $50,90 \pm 2,36$ Casp3-позитивних клітин, у зразках РПЗ без ІлВ $31,88 \pm 1,79$ (рис. 7.4). Таким чином, встановлено, що рівень експресії Casp3 в РПЗ залежить від присутності ІлВ ($p < 0,001$).

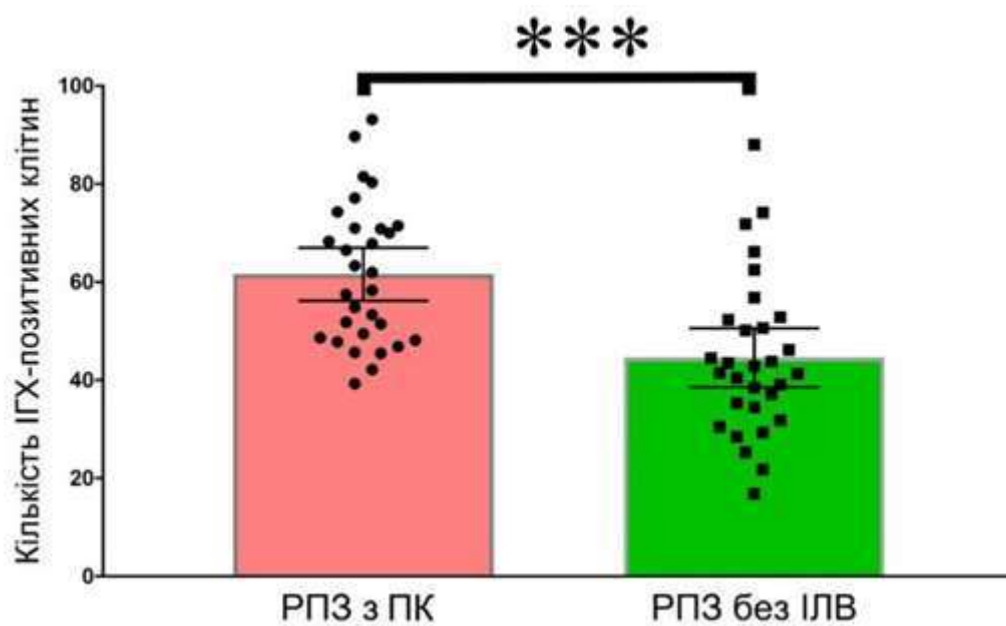


Рисунок 7.3 – ІГХ дослідження експресії Вах у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стопчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, *** – $p < 0,001$

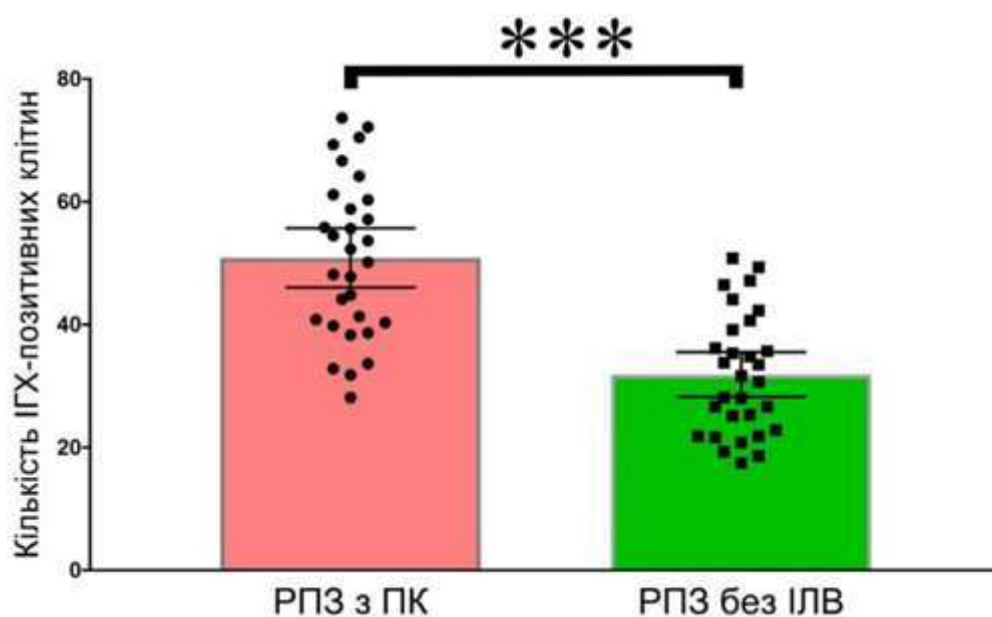


Рисунок 7.4 – ІГХ дослідження експресії Casp3 у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стопчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, *** – $p < 0,001$

Виходячи з результатів ІГХ дослідження маркерів апоптозу в тканині РПЗ з присутністю простатолітів, можна зробити висновок про переважання Casp3-залежного шляху загибелі клітин за умов даної патології.

Статистичний аналіз результатів не виявив достовірної різниці показників експресії MMP 1 між РПЗ з біомінералізованими включеннями та РПЗ без ІЛВ ($p > 0,05$). Однак було встановлено, що інтенсивність ІГХ реакції на MMP1 є порівняно вищою у неопластичних клітинах, які розташовані у безпосередній близькості до запальних інфільтратів та простатолітів. У I-й групі було виявлено $38,21 \pm 1,59$ MMP1-позитивних клітин, у II групі – $36,84 \pm 1,88$ імунопозитивних клітин (рис. 7.5).

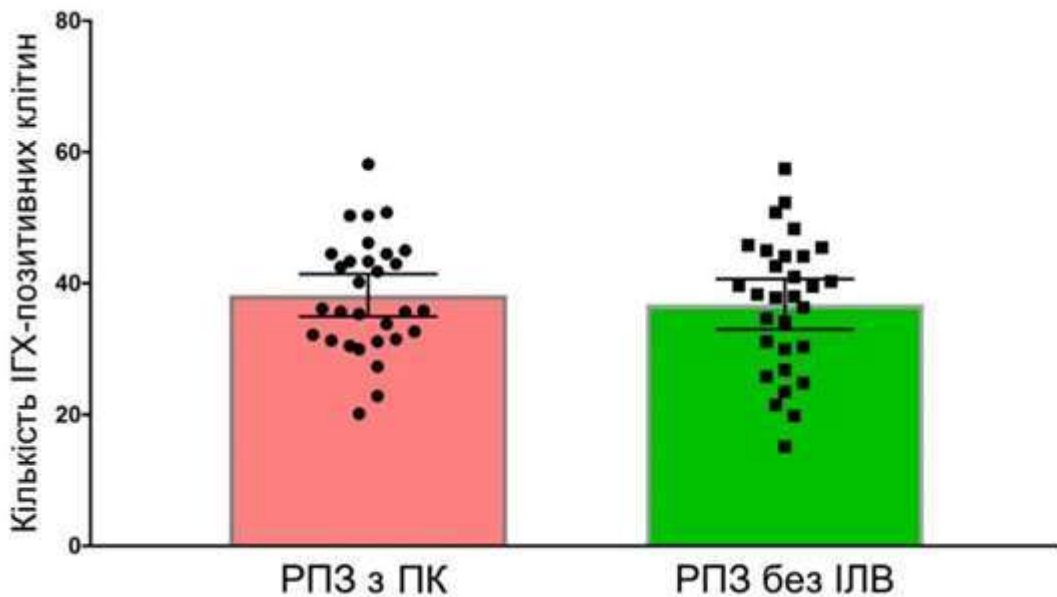


Рисунок 7.5 – ІГХ дослідження експресії MMP1 у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стовпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності

Інтенсивність процесів ангиогенезу у тканині РПЗ була визначена за допомогою оцінки кількості VEGF-позитивних пухлинних клітин. У групі РПЗ з простатолітами було виявлено $50,81 \pm 2,36$ VEGF-позитивних клітин, у групі зразків РПЗ без ІЛВ – $61,46 \pm 2,92$ клітин у полі зору (рис. 7.6).

Проведений статистичний аналіз отриманих результатів вказав на те, що присутність простатолітів у тканині РПЗ супроводжується достовірним зниженням експресії VEGF ($p < 0,05$).

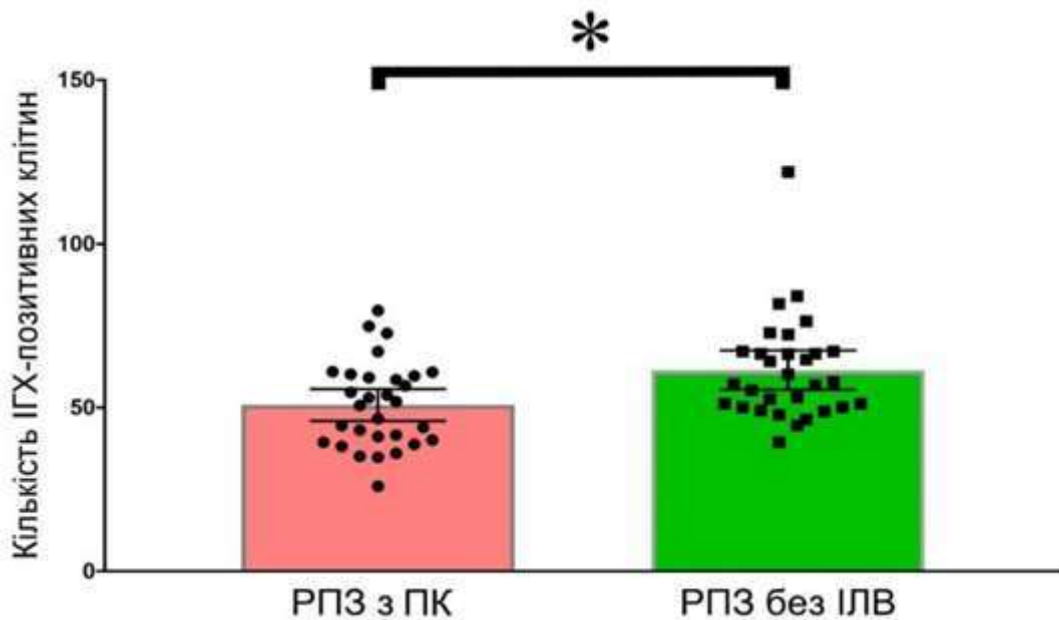


Рисунок 7.6 – ІХ дослідження експресії VEGF у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стовпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, * – $p < 0,05$

Оцінка інтенсивності та вивчення клітинного складу запального інфільтрату проводилися шляхом детекції та підрахунку кількості макрофагів (CD68-позитивні клітини) та нейтрофілів (MPO-позитивні клітини). CD68-позитивні клітини розміщувалися дифузно як у пухлинній тканині, так і в пухлинній стромі. У безпосередній близькості до ІлВ виявлялися макрофаги, що мали згрупований характер розташування. Так, у I-й групі було виявлено $137,48 \pm 3,39$ CD68-позитивних клітин, у II групі – $92,14 \pm 4,12$ клітин ($p < 0,001$) (рис. 7.7). Присутність значної кількості клітин системи мононуклеарних фагоцитів свідчить про виразність явищ хронічного запалення за умов присутності біомінеральних ІлВ, що підтверджується

достовірно вищою кількістю виявлених макрофагів у тканині РПЗ з простатолітами у порівнянні з контролем.

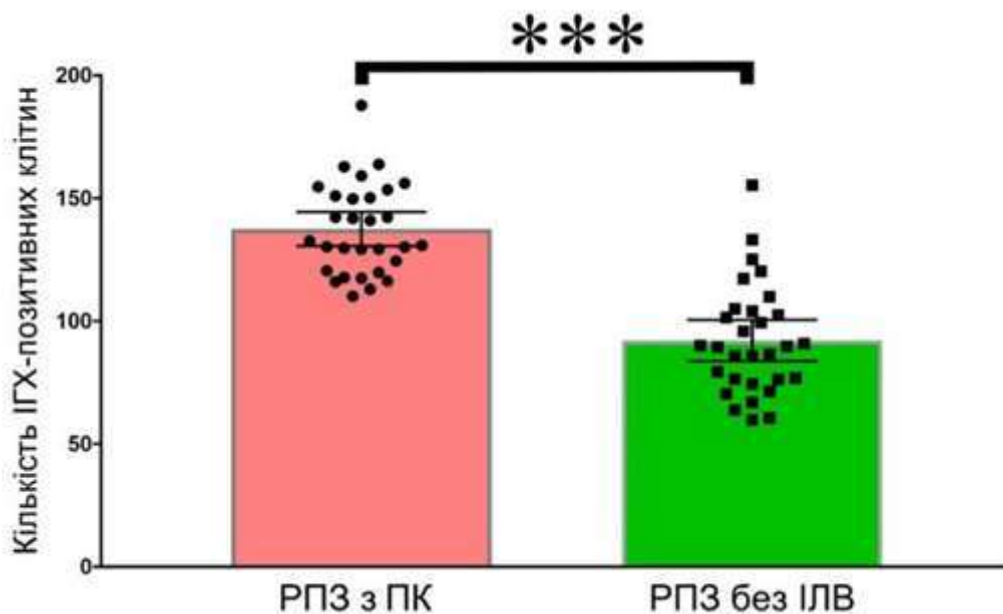


Рисунок 7.7 – ІГХ дослідження експресії маркера CD68 у тканині РПЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, *** – $p < 0,001$

МРО мала виражений цитоплазматичний патерн експресії та високу інтенсивність сигналу. МРО-позитивні клітини розміщувалися як поодинокі, так і у вигляді груп. Їхня локалізація переважно відповідала вогнищам запалення та некрозів. У тканині зразків І-ї групи було виявлено $31,50 \pm 1,71$ МРО-позитивних клітин в одиниці площі, у групі контролю – $13,89 \pm 1,26$ клітин (рис. 7.8). Таким чином, як і для CD68-позитивних клітин, кількість нейтрофілів у тканині РПЗ також залежить від присутності ІлВ ($p < 0,001$).

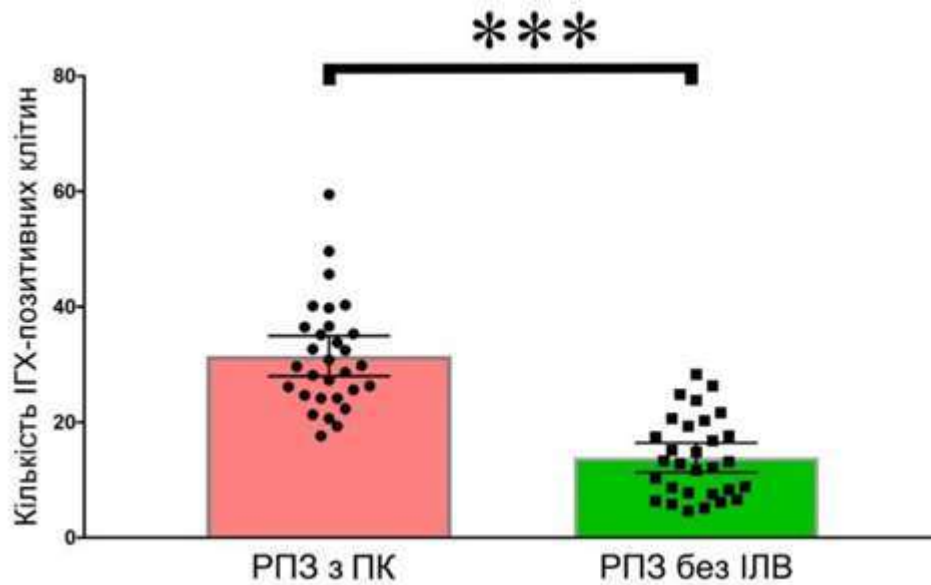


Рисунок 7.8 – ІГХ дослідження експресії маркера МРО у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стовпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, *** – $p < 0,001$

Hsp70 мав цитоплазматичний характер та помірну інтенсивність експресії у всіх групах зразків РПЗ. У I-й групі було виявлено $312,06 \pm 13,39$ позитивно забарвлених клітин, у II-й групі – $267,73 \pm 18,32$ Hsp70-позитивних клітин в одиниці площі виміру. У ході дослідження експресії Hsp70 не виявлено достовірної різниці між даними показниками. Це дозволяє припустити, що наявність простатолітів не впливає на експресію Hsp70 (рис. 7.9).

У нашому дослідженні було виявлено статистично достовірну різницю між показниками експресії Hsp90 у зразках тканини РПЗ з ІЛВ та без них (рис. 7.10). При чому Hsp90 має достовірно нижчий рівень експресії у тканині РПЗ з біомінеральними включеннями, що може бути обумовлене його депонуванням у їхній структурі. Враховуючи участь протеїну Hsp90 у стабілізації просторової структури макромолекул, знижена його присутність у тканині РПЗ із інтралюмінальними включеннями може призводити до конформаційних змін білків. Це в свою чергу може мати вплив на процеси апоптозу, що було показано вище.

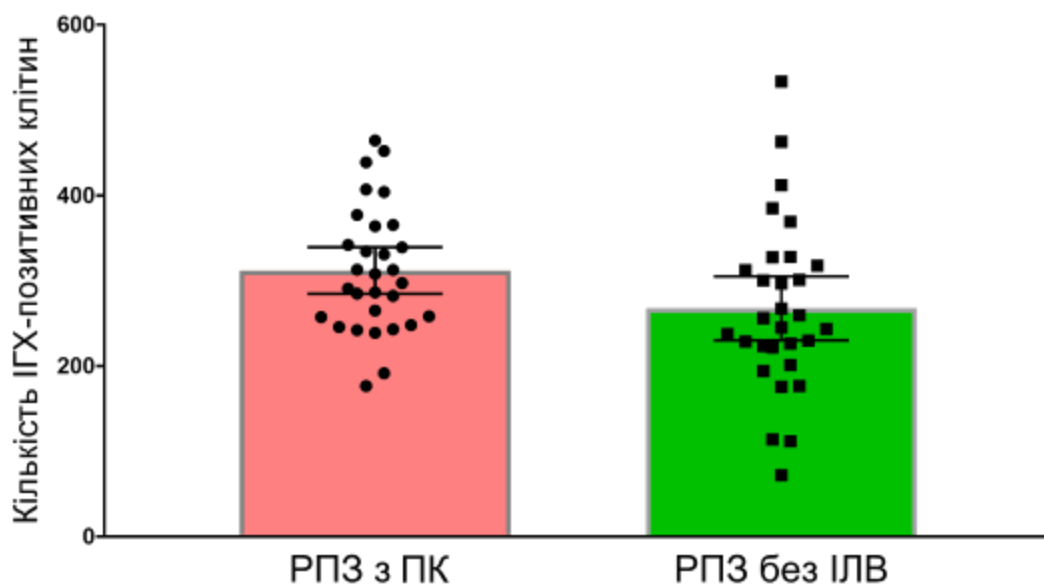


Рисунок 7.9 – ІГХ дослідження експресії маркера Hsp70 у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стовпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності

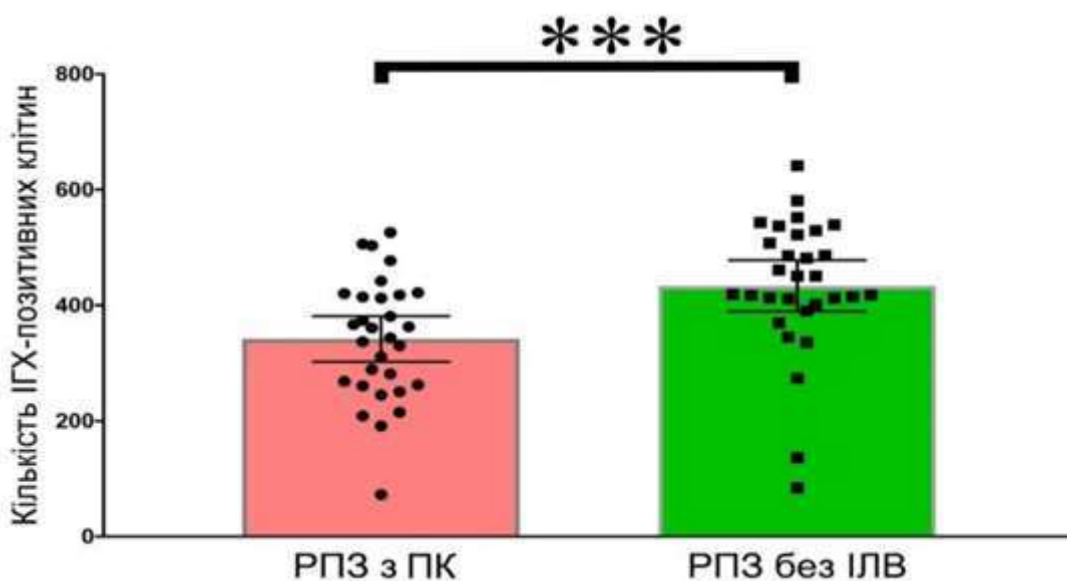


Рисунок 7.10 – ІГХ дослідження експресії маркера Hsp90 у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стовпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, *** – $p < 0,001$

Нами було виявлено достовірно вищий рівень експресії ОСН у зразках І-ої групи ($p < 0,001$) (рис. 7.11). Це може бути обумовлено його участю у процесах утворення та росту простатолітів. ОСН виявлявся і у структурі ІЛВ та у пухлинній тканині, що безпосередньо межувала з ними. Також звертає

не себе увагу порівняно вищий рівень інтенсивності сигналу ІГХ детекції ОСН у тканині РПЗ з ІЛВ.

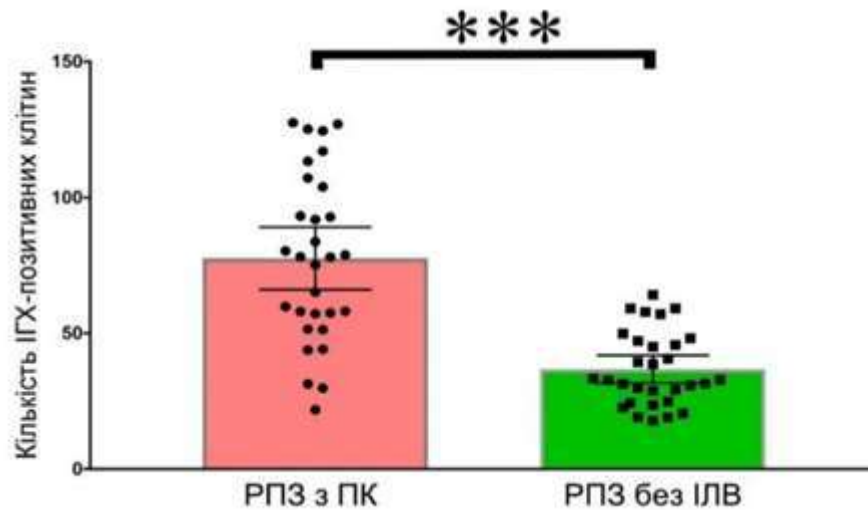


Рисунок 7.11 – ІГХ дослідження експресії маркера ОСН у тканині РПЗ досліджуваних груп. Стовпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, *** – $p < 0,001$

Ми вважаємо, що простатоліти зумовлюють розвиток хронічних запальних інфільтратів за рахунок травмування неопластичної тканини. Ремоделювання стромального компоненту РПЗ під впливом біомінералів супроводжувалася наступними змінами: перебудова тканини з кістозним розширенням залоз, накопиченням та застоєм секрету, формуванням запальних інфільтратів навколо залоз, розвитком перигландулярного запалення та склерозу. Слід також акцентувати увагу на процесах травмування епітеліального компоненту неопластичних залоз, яке також приймає участь у розвитку хронічного запалення. У оточуючій тканині навколо залоз спостерігалися розростання фіброзних волокон, поодинокі крововиливи та помірний набряк.

Неопластична тканина зразків РПЗ без присутності ІЛВ характеризувалася їхньою відсутністю в залозах, що зумовлювало зменшення застійних явищ у залозах та протоках ПЗ, зниження травматизації

залозистого епітелію. Зазначені зміни призводили до низької інтенсивності запальної реакції у тканині РПЗ цієї групи.

Порівняльні результати проведеного ІГХ дослідження приведені на рис. 7.12.

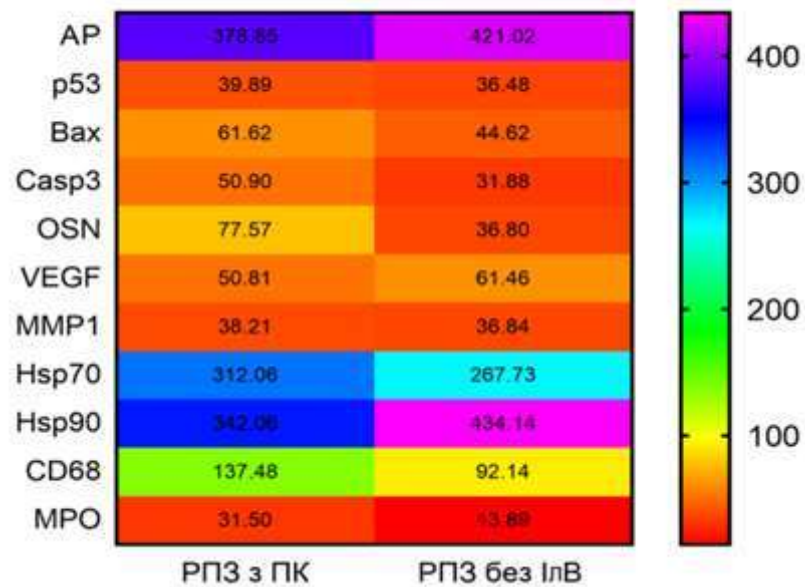


Рисунок 7.12 – Середні рівні експресії AP, p53, VEGF, ОСН (OSN), Hsp90, Hsp70, MMP1, CD68 та Вах у тканині РПЗ обох досліджуваних груп

Іншим важливим фактором, який може впливати на процеси розвитку кісткових метастазів є присутність остеогенних факторів, зокрема колагенів. Для оцінки рівнів їхньої експресії був використаний показник відсоткового відношення площі препарату із позитивною ІГХ реакцією до загальної площі препарату. Наше дослідження вказує на виразну експресію колагену І типу у тканині РПЗ з ПК. Так, у зразках цієї групи в середньому $36,22 \pm 1,53$ % від площі препарату мало позитивне ІГХ забарвлення, тоді у тканині РПЗ без ІлВ в середньому $28,19 \pm 1,17$ % площі тканини були Col I-позитивними ($p < 0,001$) (рис. 7.13А). Експресія Col II, який використовувався у якості негативного контролю, мала низьку інтенсивність та достовірно не відрізнялася між досліджуваними групами. У зразках РПЗ І групи в середньому $9,88 \pm 0,58$ % від площі препаратів були Col II-позитивними, тоді

як для зразків II групи даний показник склав $10,69 \pm 0,56 \%$ ($p > 0,05$) (рис. 7.13Б).

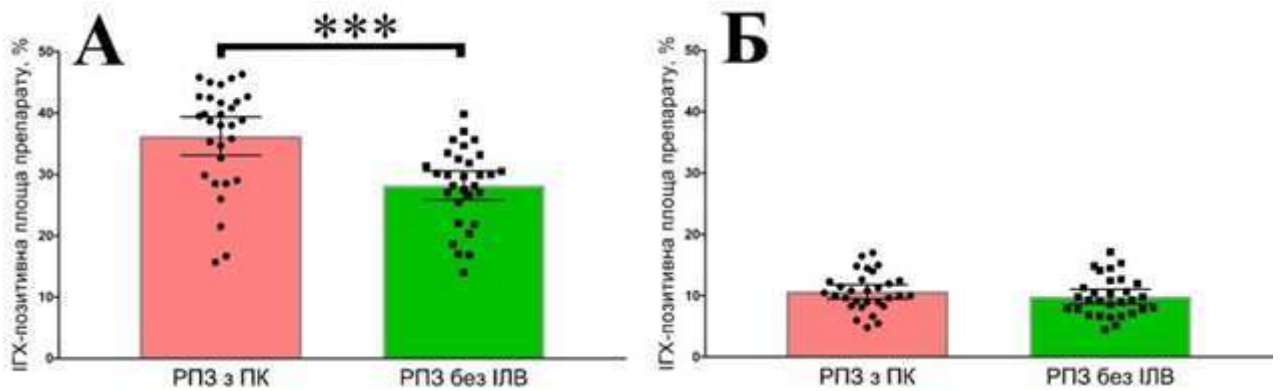


Рисунок 7.13 – ІГХ дослідження експресії маркерів Col I та Col II у тканині досліджуваних груп. А – рівні експресії Col I; Б – показники експресії Col II пухлинною тканиною. РПЗ Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, *** – $p < 0,001$

Таким чином, було продемонстровано статистично достовірну вищу експресію маркерів апоптозу Вах та Casp3 ($p < 0,001$ та $p < 0,001$ відповідно), остеобластичних маркерів ОСН та Col I ($p < 0,001$ та $p < 0,001$ відповідно) та підвищену присутність клітинних елементів запалення: МРО та CD68–позитивних клітин ($p < 0,001$ та $p < 0,001$ відповідно) у тканині РПЗ з ІЛВ. В той же час, дана неопластична тканина характеризувалася достовірно нижчою експресією VEGF ($p < 0,05$).

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[234, 237, 241, 243, 248, 259, 260, 266]

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

РПЗ є провідною причиною смертності чоловічого населення по всьому світу. Щорічно у світі діагностується понад 1,6 мільйонів нових випадків РПЗ [4]. Хоча 5-річна відносна виживаність пацієнтів з РПЗ має тенденцію до зростання, однак РПЗ займає друге місце у структурі смертності чоловіків від неоплазій, що обумовлює його високу соціальну значущість.

РПЗ найчастіше виникає у мешканців розвинутих країн, серед яких лідерами є Норвегія (193,20 випадків на 100 тис. населення) та Німеччина (187,50 випадків на 100 тис. населення) [25]. Це пов'язано з малорухливим способом життя та високим рівнем прижиттєвої діагностики даної патології. Натомість, найнижчі показники захворюваності на РПЗ серед країн Європи спостерігається в її східних регіонах, тобто в країнах, що розвиваються: Албанії (24,80 випадків на 100 тис. населення) та Боснії і Герцоговині (32,7 на 100 тис. населення) [25].

Розглядаючи структуру онкологічної захворюваності за період з 2011 по 2017 роки, середній показник загальної захворюваності на злоякісні новоутворення в Україні складав $332,64 \pm 8,24$ випадки на 100 тис. населення, тоді як у 2005 р. відповідний показник мав значення 348,0 випадків на 100 тис. населення [216]. За період спостереження РПЗ мав показник захворюваності, який складав $37,47 \pm 1,39$ випадки на 100 тис. населення, що відповідало 11,26 % від усієї онкологічної захворюваності (табл. 8.1).

За 2010-2017 роки спостереження середній показник захворюваності на РПЗ для населення України складав $37,47 \pm 1,39$ випадки на 100 тис. населення. Найнижчі показники захворюваності на РПЗ були зареєстровані у Рівненській ($23,14 \pm 1,29$), Закарпатській ($25,56 \pm 2,17$), Луганській ($27,66 \pm 4,28$), Донецькій ($28,84 \pm 1,21$) та Чернівецькій ($28,88 \pm 1,02$) областях (рис. 8.1) (табл. 8.2).

Таблиця 8.1 – Загальна захворюваність на злокісні новоутворення та РПЗ в Україні у період 2011-2017 рр. (на 100 тис. населення). X_c – середній показник захворюваності, σ – стандартне відхилення, m – середня похибка середнього арифметичного

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	X_c	σ	m
Загальна онкологічна захворюваність	348,8	357,6	360,3	313,5	313,6	315,4	319,3	332,64	21,81	8,24
РПЗ	33,5	35,8	37,1	36,5	36,9	37,2	45,3	37,47	3,68	1,39

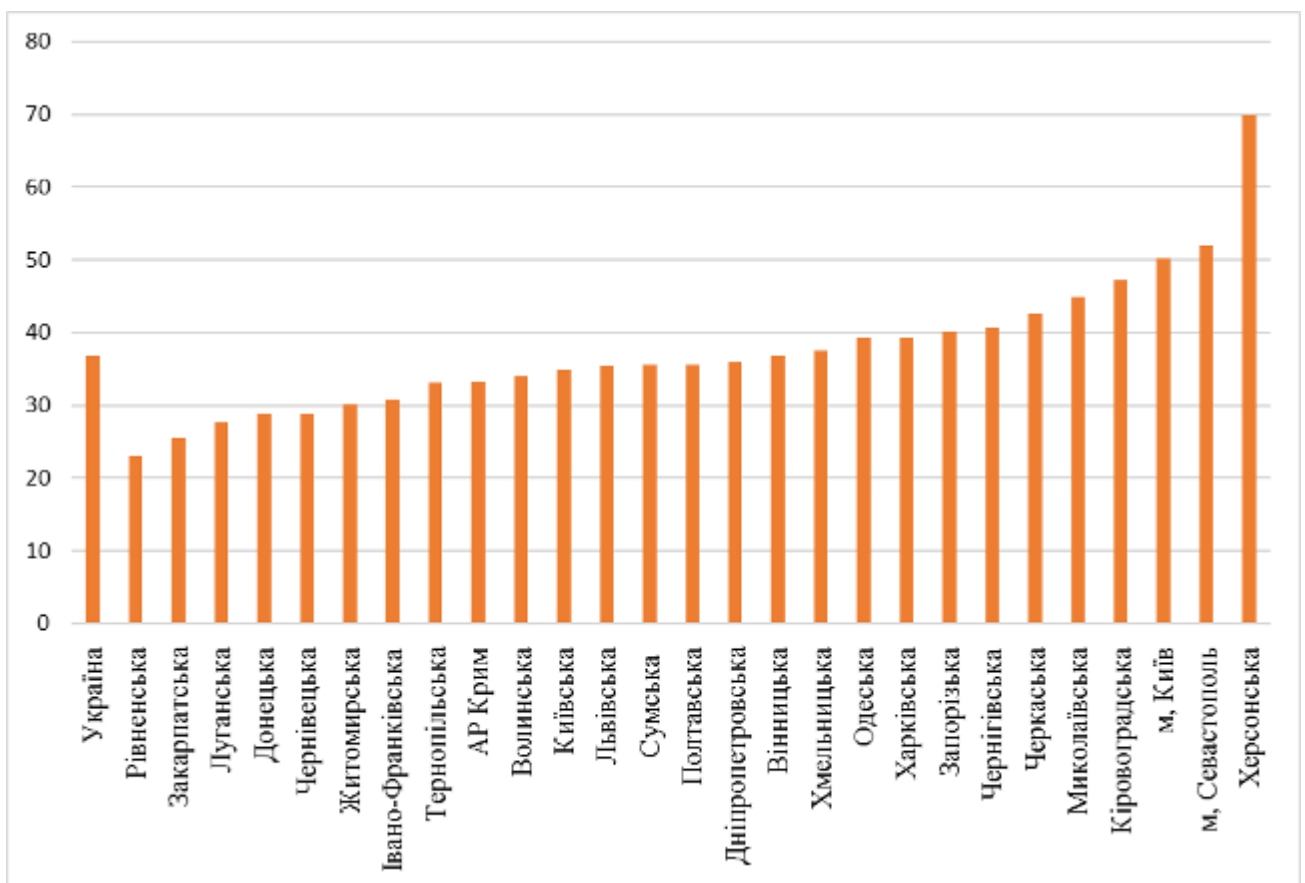


Рисунок 8.1 – Середні показники захворюваності на РПЗ за областями впродовж 2010-2017 рр. (на 100 тис.населення). Дані представлені за зростанням; показники по АР Крим надаються за період 2010-2014 рр., м. Севастополь – 2010-2013

Таблиця 8.2 – Захворюваність на РПЗ в регіонах України впродовж 2010-2017 років на 100 тис. населення X_c – середній показник захворюваності, σ – стандартне відхилення, m – середня похибка середнього арифметичного, - – відсутня інформація

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	X_c	σ	m
Україна	31,99	33,5	35,8	37,1	36,5	36,90	37,2	45,3	36,79	3,92	1,39
АР Крим	31,51	30,7	29,3	38,6	36,3	-	-	-	33,28	3,97	1,78
Вінницька	36,94	32,4	34,6	31,9	36,2	34,50	33,5	54,0	36,76	7,18	2,54
Волинська	33,18	34,8	33,9	39,9	31,3	30,00	30,4	39,0	34,06	3,73	1,32
Дніпропетровська	29,8	30	33,7	37,6	35,7	38,50	33,7	48,2	35,90	5,89	2,08
Донецька	29,45	30,9	31,2	33,1	27,5	22,5	25,8	30,3	28,84	3,42	1,21
Житомирська	22,35	19,9	29,8	33,1	30,5	32,20	27,6	45,3	30,09	7,70	2,72
Закарпатська	19,84	37	30,3	25,8	23,9	21,60	18,2	27,8	25,56	6,14	2,17
Запорізька	35,5	37	39	36,1	41,4	40,50	43,3	48,7	40,19	4,37	1,55
Івано-Франківська	27,73	25,3	29,3	27,8	28,1	28,40	35,7	44,7	30,88	6,34	2,24
Київська	30,1	26,2	29,2	42,2	36,2	34,00	36	45,0	34,86	6,44	2,28
Кіровоградська	31,8	39,7	41,2	42,8	50	47,10	48,6	76,3	47,19	13,12	4,64
Луганська	25,25	26,4	29,4	31,4	6,6	18,7	35,4	48,1	27,66	12,11	4,28
Львівська	29,43	29,7	31,6	30,5	35,6	38,00	36,7	52,2	35,47	7,53	2,66
Миколаївська	37,38	42,2	49	48	40,2	41,10	46,9	54,4	44,90	5,62	1,99
Одеська	38,43	39,3	40,9	44,3	41,6	32,40	33,5	43,2	39,20	4,31	1,52
Полтавська	28,13	30,8	34,4	34,8	37,5	32,90	38,1	47,9	35,57	5,97	2,11
Рівненська	20,22	24,6	23,1	19	22	21,10	24,3	30,8	23,14	3,65	1,29
Сумська	26,25	25,5	30,1	31,5	33,1	40,80	40,9	56,1	35,53	10,13	3,58
Тернопільська	25,79	30,3	29,9	39,2	27,1	34,60	31,2	47,3	33,17	7,09	2,51
Харківська	33,63	33,5	38,6	34,6	37,5	40,30	36,5	59,0	39,20	8,35	2,95
Херсонська	76,2	67,6	73,9	74,4	69,7	57,70	55,3	84,5	69,91	9,68	3,42
Хмельницька	35,16	38,3	32,4	37,1	37,3	39,10	34,9	45,3	37,45	3,83	1,35
Черкаська	31,45	35,6	39,4	43,8	39,7	39,90	49,2	61,4	42,56	9,24	3,27
Чернівецька	28,92	29,9	28,6	30,6	27,3	24,20	27,4	34,1	28,88	2,88	1,02
Чернігівська	32,16	34,5	39,9	37,8	42,5	41,00	43,4	54,0	40,66	6,63	2,34
м, Київ	38,82	52	50,4	52,3	49,5	47,20	49	62,5	50,22	6,54	2,31
м, Севастополь	37,12	51	56,7	62,7	-	-	-	-	51,88	10,94	5,47

Беручи до уваги географічне розташування регіонів можна зробити висновок про те, що найнижчі показники захворюваності мають західні регіони України. Відсутність даних з тимчасово окупованих територій та переміщення значної частини населення з Донецької та Луганської областей

могло слугувати причиною зниження показників захворюваності у зазначених регіонах.

Найвищі ж показники захворюваності були характерні для південно-центральных регіонів України, а саме Херсонської ($69,91 \pm 3,42$), Кіровоградської ($47,19 \pm 4,64$), Миколаївської ($44,9 \pm 1,99$) та Черкаської ($42,56 \pm 3,27$) областей України, а також для м. Севастополь ($51,88 \pm 5,47$) та м. Київ ($50,22 \pm 2,31$) (табл. 8.2). Саме ці регіони мають високу щільність населення та значне антропогенне забруднення оточуючого середовища внаслідок розвиненої промислової інфраструктури.

Сумський регіон характеризується високими показниками захворюваності населення на РПЗ. Звертає на себе увагу значне географічне зонування та щорічні коливання цих індикаторів. За останні роки рівень захворюваності на РПЗ в Сумській області має тенденцію до зростання, хоча і залишається на середньому рівні за загальнодержавними епідеміологічними показниками. При аналізі захворюваності РПЗ в Україні помітно, що її високий рівень виявляється у південно-східних регіонах. Це пояснюється несприятливою економічною ситуацією в зазначених регіонах, у яких розміщено велику кількість промислових об'єктів, географічно-кліматичними та соціально-економічними факторами, а також їх комбінацією [217-221]. З іншого боку, при аналізі захворюваності на РПЗ у Сумській області виявляються інші особливості. Незважаючи на те, що за останні роки рівень захворюваності на РПЗ в Сумській області має тенденцію до зростання, помітна його неоднорідність серед різних районів. Цікаво, що райони, які були віднесені до забруднених територій (IV зона радіаційного контролю) після аварії на ЧАЕС (Шосткинський, Ямпільський та Середино-Будський) та мають підвищений рівень забруднення солями важких металів, демонструють середні для Сумської області показники захворюваності на РПЗ [222-223].

До чинників підвищення показників захворюваності на РПЗ в Сумському регіоні також належить і покращення загального соціально-

економічного стану населення, запровадження скринінгових програм та новітніх діагностичних методик. За останні роки значно покращилася матеріально-технічна база лікувально-профілактичних установ, збільшилася кількість апаратів ультразвукової діагностики, апаратів комп'ютерної рентгенівської та магнітнорезонансної томографії. Також ряд лікувально-профілактичних закладів Сумської області впровадив методики виявлення ПСА у чоловіків з підозрою на РПЗ та трансректальну трепанобіопсію ПЗ під контролем УЗД. Впровадження ІГХ методів дослідження дало змогу покращити діагностику злоякісних неоплазій ПЗ та визначати їхню чутливість до стероїдних гормонів, діагностувати злоякісні новоутворення ПЗ на початкових стадіях їхнього розвитку. Слід також відмітити позитивний ефект який полягає у впровадженні рутинного біопсійного дослідження РПЗ, що дає змогу морфологічно підтвердити захворювання та обрати оптимальну тактику лікування. Зазначені заходи мають позитивний соціально-економічний ефект, що полягає у підвищенні якості та очікуваної тривалості життя пацієнтів [27, 223].

З іншого боку, у частині районних центрів Сумської області спостерігається тривалий час дефіцит спеціалістів (урологів та онкологів), а також дефіцит забезпечення матеріально-технічної бази лікувально-профілактичних установ. Вказані фактори мають негативний вплив на показники захворюваності на РПЗ, хоча не впливає на фактичну кількість пацієнтів з цією неоплазією.

Таким чином, незважаючи на те, що для Сумської області є характерним середній рівень захворюваності на РПЗ, відмічається тенденція до збільшення цього індикатора. У 2010-2017 роках найбільша кількість випадків РПЗ була встановлена в Буринському, Великописарівському районах та м. Суми, а найнижчий – в Конотопському, Роменському та Ямпільському районах Сумської області.

Суттєвою особливістю РПЗ є висока частота метастазування до кісток [224-226]. Так, РПЗ у 80 % випадків ускладнюється розвитком кісткових метастазів [92, 227].

Механізм формування кісткових метастазів при РПЗ, а також утворення простатичних камінців є достеменно невідомим [83]. РПЗ має здатність синтезувати речовини з вираженим остеостимулювальним ефектом, зокрема ПСА, ендотелін-1, інсуліноподібний фактор росту 1 та ін. Ці сполуки мають безпосередній ефект на процеси остеогенезу у метастичних вогнищах РПЗ, та, можливо, літогенезу у тканині РПЗ [228-229]. Подібні речовини, окрім ПСА, також виявляються у значній кількості і у кістковій тканині [230-231]. Таким чином, проявляється феномен остеомімікрії, або розвитку «остеобластичного фенотипу» пухлинних клітин як пристосувального механізму [232].

Існує тісний зв'язок між запаленням та канцерогенезом у ПЗ. Найбільш частими факторами, які підтримують запалення, травмування епітелію та порушення відтоку секрету, є ІЛВ, зокрема ПК та СА [42]. Є повідомлення, що наявність ПК у периферійній зоні передміхурової залози позитивно корелює з РПЗ [9].

Однак дослідження щодо оцінки можливості розвитку остеобластичного фенотипу неопластичних клітин ще у первинному вогнищі пухлини до початку процесів метастазування відсутні.

Для дослідження можливого зв'язку між наявністю таких проявів патологічної біомінералізації у ПЗ як простатоліти і змінами імуногістохімічного фенотипу клітин РПЗ було відібрано дві групи зразків ацинарної аденокарциноми ПЗ. Кожна група містила по 30 зразків РПЗ: I-ша група з наявністю мікро- та макропростатолітів, II-га група зразків РПЗ не містила мікро- і макроПК, а також СА. Середній вік пацієнтів з РПЗ, які належали до I-ої групи, складав на момент дослідження $70,23 \pm 1,71$ років. В той же час для пацієнтів II групи цей показник відповідав $68,27 \pm 1,27$ рокам ($p > 0,05$).

Аналіз клінічних даних пацієнтів свідчить про більш агресивний перебіг захворювання у пацієнтів, хворих на РПЗ з ІлВ. Так для зразків І групи у порівнянні з ІІ групою був характерний більш розповсюджений ріст з інвазією капсули органа ($p < 0,02$), більш висока частота метастазування до регіонарних лімфатичних вузлів ($p < 0,02$) та тенденція до більш високої частоти метастазування. Таким чином простежується виражена тенденція до розвитку місцевих та загальних ускладнень РПЗ за присутності у його структурі ІлВ.

У дослідженні були використані макроскопічні, гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, морфометричні, електронно-мікроскопічні та статистичні методи, а також такі методи фізико-хімічного дослідження як рентгенодифраційне дослідження та інфрачервона спектроскопія мінералізованого матеріалу.

Система альвеолярних залоз і протоків ПЗ ефективно працює для утворення, концентрації та виведення екзокринного секрету ПЗ. У випадку створення перешкод на шляху відтоку простатичного секрету виникає цілий каскад функціональних та морфологічних змін. ІлВ ПЗ, які виникають за умов її патології, є провідною причиною порушення дренажної функції цього органа. Так, у тканині РПЗ з біомінералізованими ІлВ відмічалися явища її ремоделювання та кістозної трансформації залоз, розвиток фіброзу та формування запальних імунних інфільтратів навколо залоз, що супроводжувалося порушенням дренажної функції та накопиченням секрету в їхньому просвіті. [233]. Внаслідок довготривалого впливу простатолітів на неопластичну тканину також виникає порушення цілісності епітеліального компоненту залоз, зміна їхньої форми, що також впливає на розвиток хронічного запалення [234]. Це також підтверджують Zhao W.P. та ін., які показали, що пацієнти із ІлВ мають нижчі показники ефективності антибактеріальної терапії та, відповідно, мають більш виражену клінічну симптоматику [13].

Таким чином, наявність біомінеральних ІлВ у тканині РПЗ сприяє ремоделюванню тканини з порушенням секреторного циклу залоз та дренажної функції що призводить до механічного травмування, розвитку хронічного запалення, фіброзу [234].

Важливу інформації у дослідженні процесів взаємодії патологічних біомінеральних утворень та тканини РПЗ надає ІГХ дослідження. У центрі уваги ІГХ досліджень стали білки, які пов'язані з канцерогенезом, функціонуванням та метаболізмом пухлинних клітин, біомінералоутворенням та відповіддю організму на патологічний процес.

Клітинний склад запальних інфільтратів був проаналізований шляхом виявлення та підрахунку CD68- та MPO-позитивних клітин. Нами було встановлено достовірно вищу присутність клітин макрофагального ряду та нейтрофілів у тканині РПЗ із формуванням ІлВ ($p < 0,001$ та $p < 0,001$ відповідно). K. Stamatou та ін. показали можливість розвитку та підтримання затяжного та хронічного запалення за присутності ІлВ у зв'язку з формуванням «біологічних плівок» на їхній поверхні [235]. На нашу думку, взаємозв'язок між присутністю ІлВ та запаленням також залучає процеси механічного травмування епітеліального компоненту пухлини поверхнею простатолітів, а також персистуванням мікроорганізмів на мікропористій поверхні біомінералів. Таким чином, мікроорганізми та білкові ефекторні молекули запалення можуть стати складовими частинами ПК. Подібні механізми були описані Schwaderer A.L. та ін. для конкрементів інших локалізацій, зокрема при сечокам'яній хворобі [236]. K. Sfanos та ін. також продемонстрували присутність білків гострого запалення у структурі ПК та СА, зокрема лактоферину, MPO та інших, таким чином вказуючи на участь даних протеїнів у процесах формування ІлВ [83]. Нами також було встановлено, що локалізація даних клітинних елементів тісно пов'язана та відповідає місцям розміщення ІлВ у тканині неоплазії, що також підтверджує участь імунокомпетентних клітин у розвитку біомінералізації у РПЗ [237].

Проапоптотичний потенціал тканини РПЗ був проаналізований за допомогою виявлення білків p53, Вах та Casp3. Ці протеїни пов'язані між собою у p53-Вах-Casp3 залежний апоптотичний шлях, у якому білок p53 має роль центрального регулятора апоптотичного процесу, Вах є посередником-медіатором, а Casp3 є безпосередньою ефекторною молекулою апоптотичної загибелі клітин [238].

Нами було встановлено дещо вищі показники присутності p53 у тканині РПЗ із ПК, однак вони не мали статистичної достовірності ($p > 0,05$). Його наявність у тканині раку передміхурової залози була раніше продемонстрована у дослідженнях W. H. Chappell та ін. [239].

Виявлена нами вища експресія Вах тканиною РПЗ із формуванням ПК ($p < 0,001$) свідчить про стимулювальний вплив біомінералізованих ІлВ на апоптотичні процеси в неопластичній тканині. Цей факт також підтверджується вищим рівнем присутності активованої форми проапоптотичного протеїну Casp3 ($p < 0,001$), який є безпосереднім ефектором апоптозу та може бути активований Вах-протеїном. Rong Luo та ін. продемонстрували, що Casp3 може бути також активована медіаторами запалення [240]. Цей факт підтверджується виявленою нами підвищеною присутністю клітинних елементів запалення у тканині РПЗ із ІлВ [241].

Окрім апоптозу, синтез БТШ є типовою клітинною реакцією на дію зовнішніх чи внутрішніх подразників [242]. Під час виконання дослідження нами було проведено кількісне визначення Hsp70-позитивних та Hsp90-позитивних клітин у тканині РПЗ та було встановлено, що присутність ІлВ у неопластичній тканині супроводжується достовірно нижчою експресією високомолекулярного Hsp90 ($p < 0,001$), однак не впливає на рівень Hsp70 ($p > 0,05$). Дані протеїни були виявлені також і у структурі ІлВ, що вказує на участь цих білків у їхньому формуванні [243]. Високомолекулярні БТШ приймають участь у стабілізації просторової структури білкових молекул, зокрема AP [244]. Окрім того, попередньо була доведена участь роль Hsp70 та Hsp90 у процесах пригнічення апоптозу шляхом блокування активності

проапоптотичних протеїнів, зокрема каспаз [245]. Таким чином, визначене нами зниження експресії Hsp90 у тканині РПЗ із ІлВ може сприяти розвитку кастраційно-резистентного РПЗ як більш злоякісної форми неоплазії.

Під час проведення дослідження був визначений рівень експресії VEGF як показника активності неоангіогенезу у пухлинній тканині. Нами було встановлено, що присутність ІлВ у тканині РПЗ супроводжується зниженням рівня експресії даного маркера ($p < 0,05$), що вказує на негативний вплив ІлВ на процеси васкуляризації. Результати, отримані Seipelt R.G. та ін. свідчать про те, що VEGF бере участь у відновленні структури стінки кальцифікованих судин та загалом має ефект, спрямований на пригнічення кальцифікації [246]. З іншого боку, гіпоксія та пошкодження тканини призводить до підвищення використання VEGF та потенційно може супроводжуватися зниженням його рівня у пухлинній тканині [247]. Таким чином, виявлена нами достовірна нижча його присутність у тканині РПЗ із ІлВ свідчить про відсутність впливу ІлВ на процеси неоангіогенезу у пухлинній тканині. Нижчий показник експресії VEGF у тканині І групи може бути пов'язаний із інтенсивним його використанням неопластичною тканиною за присутності ІлВ, що може опосередковано вказувати на високу активність процесів неоангіогенезу.

Результати нашого дослідження вказують на те, що експресія рецепторів до стероїдних гормонів у тканині РПЗ, зокрема AR, не має статистично достовірної різниці між досліджуваними групами ($p > 0,05$), однак простежується досить чіткий тренд до зниження цього показника у групі РПЗ із ІлВ (рис. 8.2). Відомо, що стероїдні гормони – андрогени, мають вплив на процеси клітинного поділу, їх міграцію та запрограмовану загибель, а також на їх злоякісний потенціал шляхом регуляції активності відповідних промоторних ділянок [248-249]. Незважаючи на раніше продемонстрований вплив запальної інфільтрації із переважання В-лімфоцитів на розвиток кастраційно-резистентного РПЗ, наші дослідження не виявили ні впливу ІлВ на рівень експресії AR, ні його зв'язку із рівнем запальної інфільтрації [250].

Таким чином, рівень експресії AP є окремим, не пов'язаним із ІлВ, прогностичним маркером оцінки перебігу РПЗ та розвитку його ускладнень.

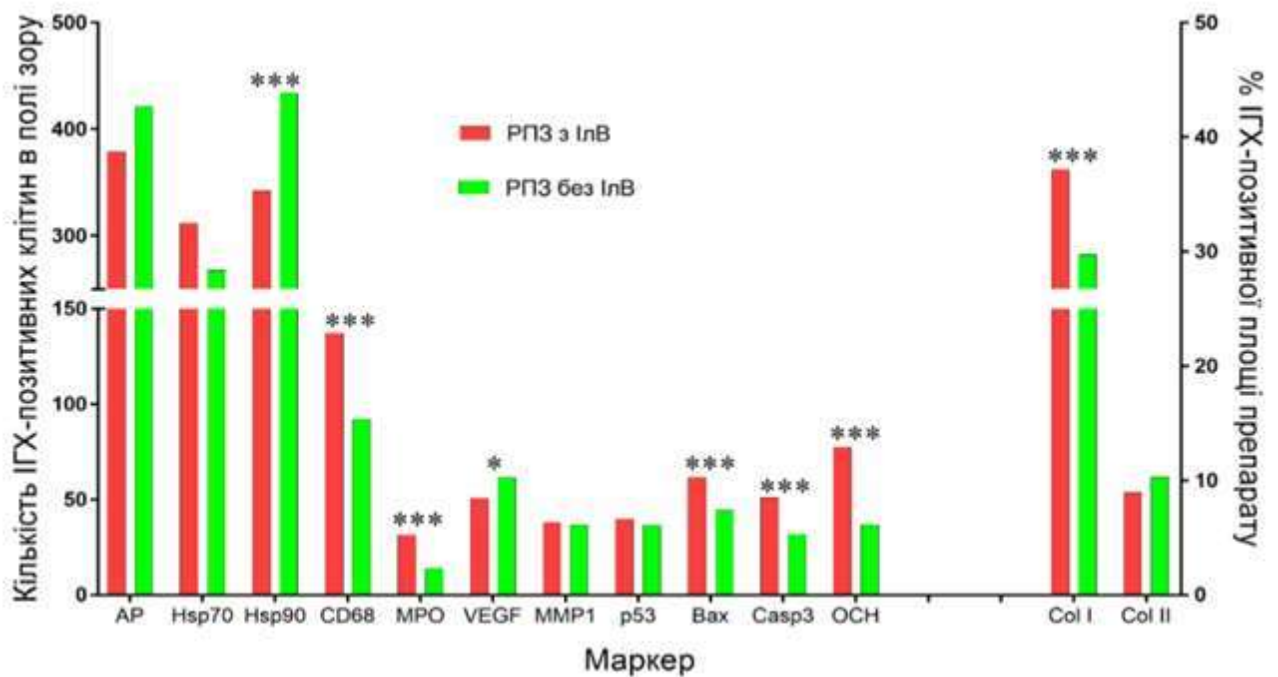


Рисунок 8.2 – Результати ІГХ-дослідження тканини РПЗ та статистичного аналізу отриманих результатів. *** – $p < 0,001$, * – $p < 0,05$)

У нашому дослідженні не було виявлено статистично достовірної різниці у кількості MMP1-позитивних клітин у зразках тканин досліджуваних груп ($p > 0,05$) (рис. 8.2). Вважається, що MMP1 є одним із основних ефекторних протеїнів, відповідальних за клітинну інвазію за рахунок вираженої колагеназної активності та розцінюється як один із основних предикторів несприятливого перебігу РПЗ [251-252]. Однак, Ozden F. та ін. відмічають відсутність будь-яких закономірностей у експресії MMP1 та інших металопротеїназ у тканині РПЗ [161]. Наше дослідження продемонструвало, що MMP1-позитивні клітини у зразках РПЗ із ІлВ мали порівняно більшу інтенсивність ІГХ-сигналу та розміщувалися переважно у безпосередній близькості до ІлВ, однак статистично достовірних закономірностей нами встановлено не було [253].

Повідомлення останніх років свідчать про те, що інвазивний ріст та поширення РПЗ відбувається, в тому числі, за рахунок феномена епітеліально-мезенхімальної трансформації під час якого епітеліальні неопластичні клітини зазнають процесів морфологічно-генетичних перетворень та набувають характеристик, подібних до мезенхімальних клітин [254-255]. Вказаний процес не пов'язаний із експресією MMP1. Тому ми вважаємо, що присутність ІлВ у тканині РПЗ може мати стимулювальний вплив на процеси епітеліо-мезенхімальної трансформації пухлинних клітин та зумовлювати більш агресивний перебіг неоплазії та розвиток віддалених метастазів.

У процесі розвитку РПЗ тісно переплетені процеси запалення, відмирання клітин (некрозу, апоптозу, десквамації), амілоїдогенезу, фізико-хімічні закономірності утворення кристалів, імунні механізми, метаболічні та молекулярно-генетичні аспекти (рис. 8.3).

Від балансу сил у мікросередовищі просвіту залоз ПЗ буде залежати напрям розвитку біохімічних реакції і її кінцевий продукт. Нашу увагу привернув феномен утворення і персистенції біомінеральних інтралюмінальних включень у тканинах ДГПЗ [256].

Застосування мультидисциплінарного підходу до вивчення цієї проблеми з використанням гістологічних, гістохімічних та фізико-хімічних методик дало можливість встановити, що ПК та СА утворюються за різними механізмами. Незважаючи на те, що утворення обох типів ІлВ (мінеральних та білкових відповідно) у ДГПЗ та РПЗ пов'язане з явищами застою секрету та запалення перигландулярної тканини, ці включення мають принципово різні механізми розвитку [257]. ПК утворюються за механізмом прямої преципітації з перенасиченого розчину вмісту простатичних залоз [256]. З іншого боку, для пояснення генезису амілоїдних включень постулюється механізм матрично-спрямованого росту на інтралюмінальному детриті з десквамованого епітелію, залишках мікроорганізмів, тощо [80]. Два основні

гіпотетичні механізми генезису амілоїдних тілець та простатолітів представлені на рис. 8.4.

Аналіз причинно-наслідкових зв'язків між присутністю остеотропних білків та утворенням кальцифікатів у РПЗ може свідчити про первинність процесів кальцифікації у системі «простатоліт-РПЗ», так як частіше простатичні камінці зустрічаються при доброякісній гіперплазії. Дане дослідження демонструє, що у 27,27 % випадків РПЗ супроводжується проявами патологічної біомінералізації. Попередньо нами було встановлено, що у 27,60 % ДГПЗ виявляються ПК ($p > 0,05$) [256].



Рисунок 8.3 – Схема впливу ІлВ на зміну імунофенотипу клітин РПЗ

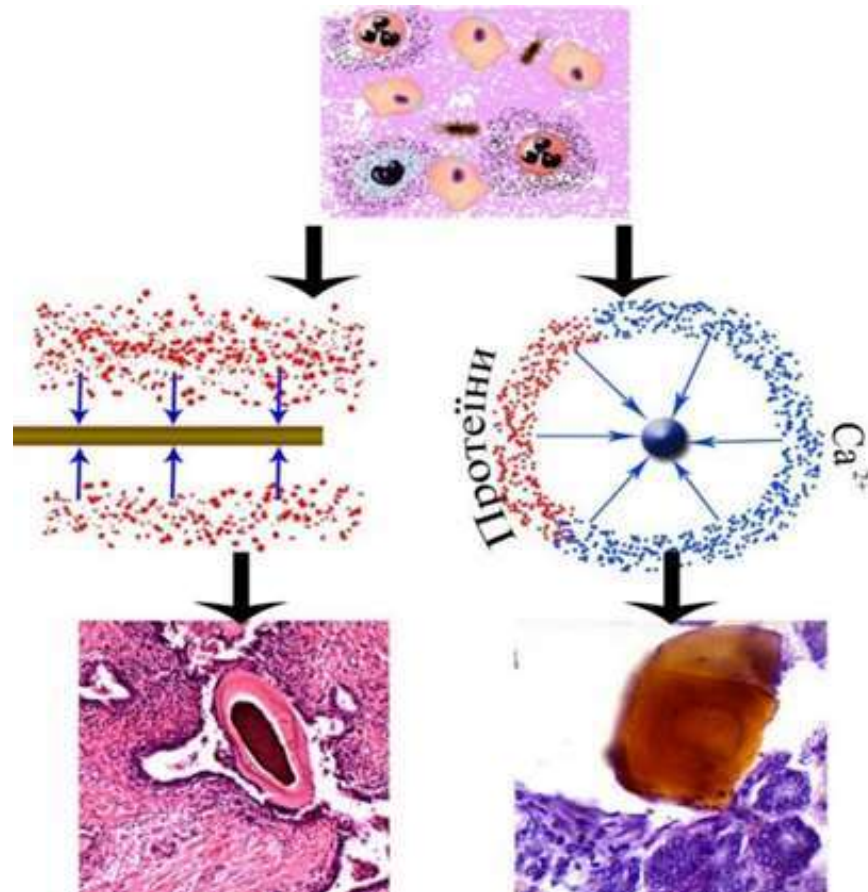


Рисунок 8.4 – Схема головних механізмів утворення білкових та мінеральних ІлВ простати

Для верифікації природи ІлВ препарати РПЗ були забарвлені за допомогою алізарінового червоного, конго червоним та за методом фон Косса. У структурі простатолітів виявлялись солі кальцію (позитивне забарвлення алізаріновим червоним) у формі фосфатів кальцію (позитивне забарвлення за фон Коссом) (рис. 8.5А-Б). У структурі СА за допомогою обох зазначених методів сполук кальцію виявлено не було. З іншого боку, усі досліджені нами СА мали позитивне забарвлення конго червоним, а під час дослідження зразків у циркулярному поляризаційному світлі виявлявся феномен дифракції у вигляді «мальтійського хреста» та світіння «зеленого яблука». Таким чином було встановлено, що усі досліджені нами СА мали у своєму складі значний вміст білку-амілоїду, що також підтверджують дослідження С. Röcken [258]. Нами також не було виявлено проміжних форм між СА та ПК.

Вивчення структури та хімічного складу простатолітів проводилося за допомогою SEM/EDS. Для дослідження були використані макроскопічні конкременти (діаметром більше за 1 мм). Отримані дані свідчать про те, структура даних ІЛВ є неоднорідною з наявністю хвилястих нашарувань. Між цими нашаруваннями присутня безструктурна речовина. Подібна ритмічність структури конкрементів може свідчити про циклічність процесів літогенезу у ПЗ (рис. 8.5В). Результати проведеного енергодисперсійного спектроскопічного дослідження вказують на значний вміст кальцію та фосфору у складі простатолітів у співвідношенні 1,67, що є характерним для гідроксиапатиту. Також було виявлено незначні домішки сторонніх елементів (калій та цинк) у мінеральному компоненті простатичних конкрементів (рис. 8.5Г).

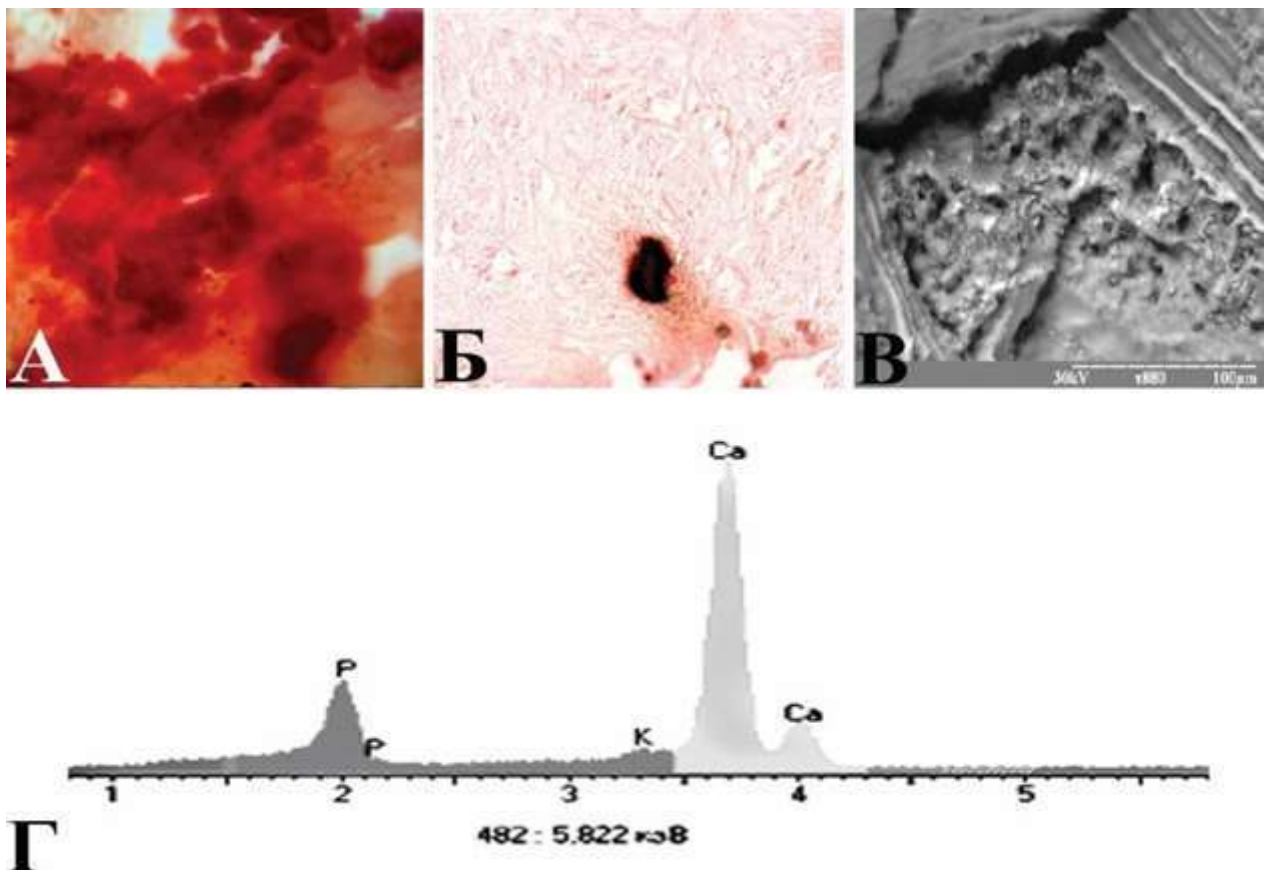


Рисунок 8.5 – Дослідження тканини РПЗ з простатолітами. А – забарвлення алізариновим червоним; Б – забарвлення за методом за фон Косса; В – СЕМ; Г – результати енергодисперсійної спектроскопії.

Комбіноване використання вказаних методів забарвлення дає можливість верифікувати присутність кальцію фосфату у гістологічних препаратів. Однак, у практичній діяльності використання забарвлення алізариновим червоним має ряд складностей, які полягають, зокрема, у використанні прекурсорів (ацетон), низькій специфічності та високому рівні фонового забарвлення, потребі у високоточному обладнанні для вимірювання рівня рН. Саме тому, на нашу думку, оптимальним методом для виявлення фосфату кальцію ПК у гістологічних препаратах у рутинній практичній діяльності є проведення реакції за фон Коссом. З іншого боку, вказана методика також може бути використана для диференційної діагностики між СА та ПК у тяжких діагностичних випадках. Інший метод визначення присутності у ПК, а саме флуоресцентна мікроскопія нативних препаратів, хоча й має високу чутливість та специфічність, однак потребує наявності флуоресцентного мікроскопа та не може бути використана у рутинній діагностиці. Запропонована схема-алгоритм дослідження гістологічних препаратів РПЗ наведена на рис. 8.6.

На сьогодні виникнення кісткових метастазів РПЗ пояснюється теорією «seed and soil» за якою ракові клітини як насіння потребують відповідного мікрооточення (грунту) для виживання і росту [238]. Численні пухлинні клітини розповсюджуються випадковим чином по всіх тканинах, але успішно розвиваються лише у сприятливому середовищі. Саме кісткова тканина є сприятливим середовищем для клітин РПЗ [225].

За даними рентгенівського мікроаналізу конкрементів простати було встановлено, що мінеральну основу досліджених ПК складає фосфат кальцію у формі апатиту з високою вірогідністю включень сторонніх хімічних елементів, що також характерно і для біологічного апатиту тканин скелету. Подібні результати було отримані у дослідженнях Sfanos K. et al. [83].



Рисунок 8.6 – Схема діагностичного алгоритму для виявлення ПК у гістологічних препаратах

Кристалічна структура ПК містить в собі риси подібності до мінерального компоненту кісткової тканини, що проявляється у їхніх спільних кристало-хімічних особливостях. Присутність карбонатів у структурі апатиту ПК (переважно В-типу, де іони CO_3^{2-} заміщують групи PO_4^{3-}), та специфічність форми їхніх кристалів з типовими розмірами у декілька десятків нанометрів вказують на хімічну і морфологічну спорідненість ектопічного апатиту ПК та фізіологічного апатиту кісткової тканини. В обох випадках малі розміри кристалів обумовлюють досить високе співвідношення поверхня/об'єм, що є свідченням великої площі

взаємодії з органічними компонентами чи біологічними рідинами, які мають містити специфічні інгібітори чи регулятори росту і форми кристалів.

Процеси мінералізації потребують присутності специфічних компонентів органічної (колагенові та неколагенові білки, ензими) та неорганічної (іони кальцію, сполуки фосфору) природи. Ймовірним постачальником специфічних «будівельних» компонентів для ПК є хронічний запальний процес у тканині ПЗ. Так, у нашому дослідженні, зразки РПЗ з ПК демонстрували наявність інтенсивної запальної інфільтрації у порівнянні з контролем. Це підтверджується присутністю значної кількості MPO та CD68-позитивних клітин у тканині РПЗ з ПК ($p < 0,001$ та $p < 0,001$ відповідно). На тлі інтенсивного запалення тканина РПЗ з простатолітами демонструвала високу експресію проапоптотичних маркерів Bax та Casp3. Поєднання виражених процесів запалення, апоптозу, присутність клітинного детриту та оголення сполучнотканинного матриксу створюють умови для розвитку патологічної біомінералізації у тканині РПЗ. В той же час, наявність ПК підтримує хронічне запалення [8]. Таким чином, відбувається виникнення «хибного кола», яке це схематично підсумоване на рис. 8.7 [259].

Дослідження карбогідратного профілю неопластичної тканини проводилося за допомогою PAS-реакції та забарвлення альціановим синім. Аналіз отриманих зображень вказує на підвищення вмісту глікозильованих структур у тканині РПЗ з ПК [260]. Також відмічається тенденція до зміни хімічного складу гліканів. Mathur S. K. та ін. встановили, що РПЗ, на відміну від ДГПЗ, характеризується підвищеним вмістом кислих глікозаміногліканів, виявлених за допомогою фарбування альціановим синім [261]. Durgaprasad N Agrawal та ін. також вказують на можливість використання даної методики забарвлення у якості диференційно-діагностичного методу дослідження між ДГПЗ та високодиференційованою аденокарциномою ПЗ [262]. Проведене нами диференційне забарвлення за допомогою альціанового синього показало підвищену присутність саме кислих та сульфатованих глікозаміногліканів у тканині РПЗ з ПК у порівнянні зі зразками РПЗ без ІЛВ.

Присутність зазначених сполук як у секреті неопластичних залоз, так і у структурі немінералізованих ІЛВ свідчить про їхню участь у процесах розвитку СА та біомінералізації. Bastola S. та ін. вказують на те, що даний метод забарвлення гістологічних препаратів може бути використаний і для встановлення ступеню диференціювання злоякісних неоплазій ПЗ. Результати їхнього досліджень вказують на кореляцію між рівнем ПСА, інтенсивністю забарвлення альціановим синім та ступенем злоякісності РПЗ, тобто оцінкою за шкалою Глісона [263].

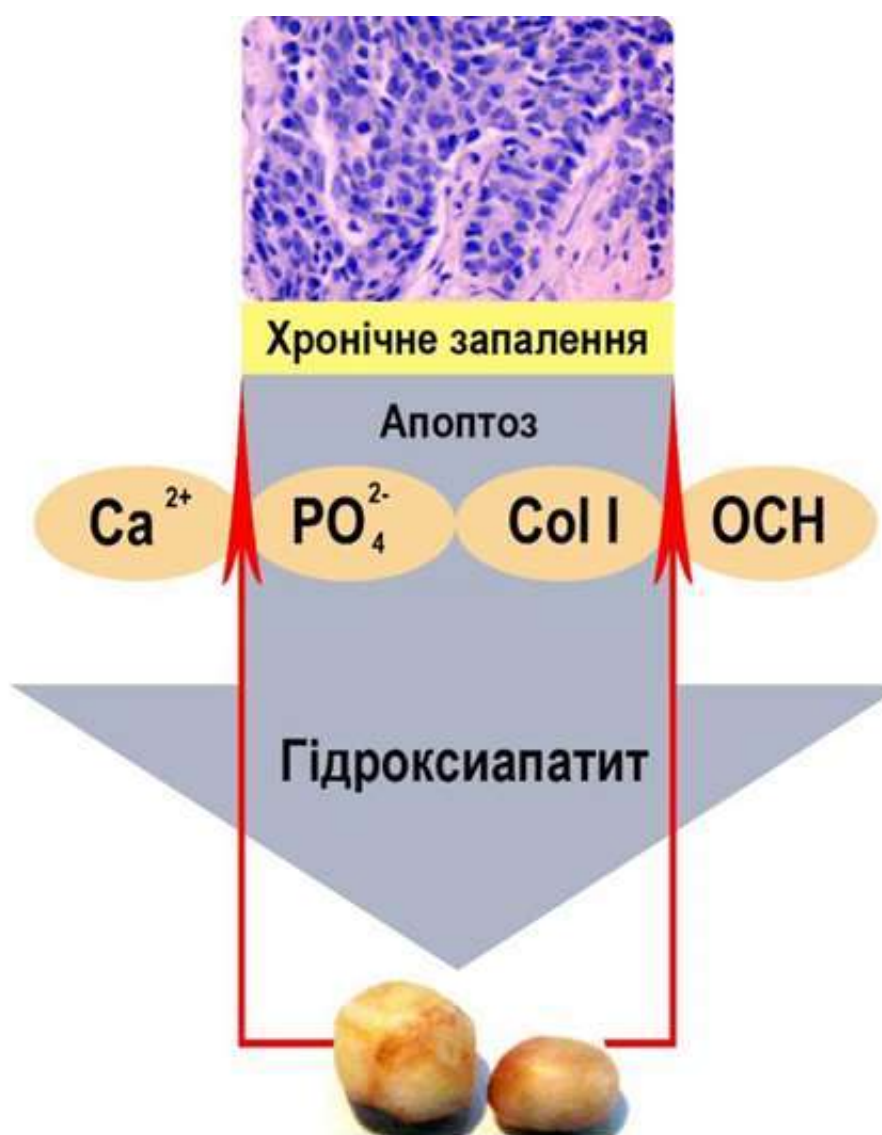


Рисунок 8.7 – Схематичне представлення формування ПК і підтримання ними хронічного запалення

Таким чином, зазначена особливість патернів глікозиляції гістологічних структур РПЗ та ДГПЗ може бути використана для диференційної діагностики цих патологій. Більше того, використання забарвлення альціановим синім може слугувати додатковим прогностичним критерієм оцінки перебігу та вірогідності розвитку ускладнень РПЗ. Однак даний метод дослідження має кілька обмежень, що полягають у низькій специфічності даних реакцій та труднощах інтерпретації результатів.

Дослідження компонентів стромального компоненту пухлин проводилося за допомогою виявлення експресії Col I та Col II. У зв'язку з варіабельністю вмісту стромального компоненту пухлин, значною відмінністю у інтенсивності ІГХ-забарвлення та відсутністю чітко диференційованих патернів експресії, для оцінки рівнів експресії цих маркерів було використане відношення позитивно забарвленої строми у полі зору до загальної його площі.

Нами було встановлено, що у стромальному компоненті РПЗ за присутності ІлВ спостерігається достовірно вища експресія Col I ($p < 0,001$). Цей протеїн є основним матриксним білком, що входить до складу різних тканин мезенхімального походження, в тому числі кісткової. N. Burns-Cox та ін. у своєму дослідженні показали, що РПЗ у порівнянні із ДГПЗ характеризується порівняно вищим вмістом Col I та супроводжується підсиленою його деградацією [264]. Інші дослідники, зокрема Christopher L Hall та ін. вказують на те, що активація рецепторів $\alpha 2\beta 1$ до Col I призводить до активації RhoC-гуанозин трифосфатази та супроводжується розвитком кісткових метастазів РПЗ [265]. Виявлені нами результати доповнюють та підтверджують вказані дослідження. Ми вважаємо, що надлишок Col I у пухлинному мікрооточенні сприяє розвитку специфічного остеобластичного рецепторного статусу пухлинних клітин та сприяє розвитку остеобластичного імунофенотипу неоплазії [266].

Іншим важливим остеобластичним маркером, який був у фокусі нашого дослідження був ОСН – глікопротеїн, який бере участь у процесах

фіксації Col I та є критично важливим у процесах остеогенезу [267]. Нами було встановлено, що тканина РПЗ із ІлВ характеризувалася достовірно вищою присутністю ОСН-позитивних клітин ($p < 0,001$). Раніше було встановлено, що експресія ОСН клітинами раку шлунку є прогностично несприятливою ознакою та є асоційованою із прогресуванням інвазивного росту пухлини [268]. Ми вважаємо, що експресія ОСН у неопластичними клітинами РПЗ за присутності ІлВ супроводжується посиленням процесів пухлинної інвазії та сприяє розвитку метастазів. На це вказують клінічні дані, що демонструють більш агресивну клінічну поведінку та перебіг неоплазії, що проявлялося вираженою тенденцією до поширення пухлини за межі капсули (переважання T_3 над T_2 у пацієнтів I групи) ($p < 0,02$) та локальним чи віддаленим метастазуванням, зокрема до кісток (переважання кількості пацієнтів I групи із клінічними стадіями N_1 та M_1 над N_0 та M_0 відповідно) ($p < 0,02$). Дану гіпотез підтверджують результати, отримані К. Jacob та ін., за якими остеонектин здатний специфічно потенціювати дію металопротеїназ та сприяти міграції клітин РПЗ та розвитку метастазів до кісткової тканини [269]. Regi Thomas та ін. виявили кореляцію між експресією ОСН у первинному вогнищі РПЗ та метастатичній тканині [142]. Таким чином можна стверджувати, що ПК асоційована з ними підвищена експресія ОСН має безпосередній вплив на процеси метастазування та остеотропізм метастатичного враження.

Поєднання ПК та експресії остеобластичних маркерів у клітинах РПЗ може свідчити про тісний зв'язок між цими явищами. Присутність патологічної біомінералізації у вигляді ПК у тканині РПЗ може створювати модулюючий ефект на ракові клітини, сприяючи експресії деяких кісткових маркерів. На нашу думку, це полегшує розпізнавання кісткової тканини циркулюючими клітинами РПЗ як ніші для розвитку метастазу. Це може полегшити розуміння механізмів розвитку кісткових метастазів РПЗ. Тобто, циркулююча пухлинна клітина має відповідний фенотип для пошуку специфічної ніші.

Результати нашого дослідження схематично викладені у рис. 8.8.

Таким чином, діагностичне визначення остеобластичних маркерів у РПЗ може бути використане у якості оцінки схильності до розвитку кісткових метастазів. Для клініки може бути важливою прогностичною інформацією наявність ПК у тканині РПЗ.

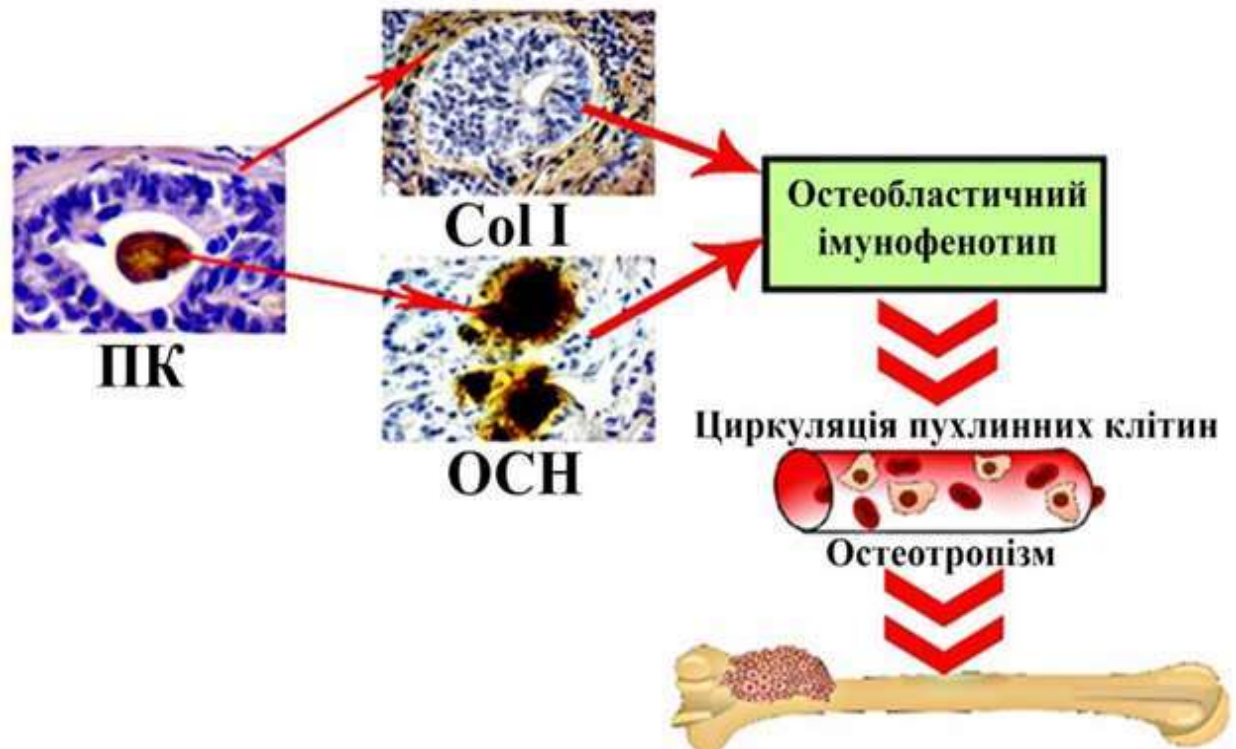


Рисунок 8.8 – Схема зв'язку ПК з розвитком остеобластичного фенотипу

Отже, мінеральна частина всіх досліджених ПК складається з фосфату кальцію у формі гідроксиапатиту з ознаками структурної та хімічної подібності до мінерального компоненту незміненої кісткової тканини. Присутність цих патологічних включень, а саме ПК, сприяє зміні морфологічних характеристик пухлинної тканини та експресії остеобластичних маркерів неопластичними клітинами РПЗ. Ми вважаємо що саме за рахунок цих сполук розвивається їхній специфічний остеобластичний профіль. Це дозволяє циркулюючим пухлинним клітинам селективно обирати найбільш сприятливе мікрооточення для прикріплення та розвитку.

Ми схиляємось до припущення, що саме це може обумовлювати тропність метастазів РПЗ до кісткової тканини.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[221, 223, 229, 234, 237, 241, 243, 248, 253, 260, 266, 259.]

ВИСНОВКИ

Незважаючи на значну поширеність РПЗ, на сьогодні відсутні дані щодо впливу біомінеральних ІлВ на перебіг захворювання та розвиток його ускладнень, зокрема метастазів до кісткової тканини. У дисертаційній роботі вирішується актуальне питання сучасної патологічної анатомії, що стосується покращання якості діагностики і прогнозу перебігу РПЗ шляхом виявлення патоморфологічних особливостей аденокарциноми ПЗ з наявністю біомінеральних ІлВ, установлення патогенетичних особливостей канцерогенезу за умов утворення ПК у пухлинній тканині.

1. Найвища захворюваність на РПЗ у 2010–2017 роках спостерігалась у Великописарівському ($46,14 \pm 5,02 \%$), Буринському ($42,54 \pm 5,84 \%$), Недригайлівському ($41,08 \pm 5,61 \%$), Лебединському ($38,33 \pm 6,12 \%$) районах та в м. Сумах ($45,00 \pm 4,55 \%$). Для Сумської області характерним є середній рівень захворюваності на РПЗ, простежується чітка тенденція до зростання цього показника. На зростання кількості виявлених випадків РПЗ в Сумській області впливають комплекс чинників, зокрема покращання рівня якості клінічної та морфологічної діагностики в регіоні. Частота виявлення біомінеральних ІлВ у тканині РПЗ становить $27,27 \%$.

2. Наявність біомінеральних ІлВ в ацинарній аденокарциномі ПЗ супроводжується ремоделюванням пухлинної тканини, що проявляється кістозною трансформацією залоз, порушенням дренажної функції та застоєм секрету, розвитком перигландулярного запалення і склерозу. За наявності цих структур відбуваються хронічне травмування неопластичної тканини та порушення секреторного циклу.

3. У групі зразків РПЗ з біомінеральними ІлВ було виявлено підвищені показниками експресії Вах ($p < 0,001$), Casp3 ($p < 0,001$), CD68 ($p < 0,001$) та MPO ($p < 0,001$), що пов'язано з морфогенетичним впливом ПК на пухлинну тканину. Вищі рівні експресії Вах та Casp3 у пухлинній тканині РПЗ з ІлВ свідчать про активацію апоптозу. Підвищена наявність макрофагів та

нейтрофілів у пухлинній тканині свідчить про вищу інтенсивність запалення в цій групі зразків. Знижений рівень експресії фактору роста ендотелію VEGF ($p < 0,05$) та Hsp90 ($p < 0,001$) у тканині РПЗ з ІлВ засвідчує негативний вплив ПК на процеси ангіогенезу в тканині РПЗ.

4. За результатами фізико-хімічних досліджень визначено, що мікро- та макроскопічні ПК ацинарної аденокарциноми ПЗ мають подібний хімічний склад і співвідношення кальцію та фосфору. Установлено, що основною складовою цих утворів є нанокристалічний гідроксіапатит кальцію за наявності карбонатних заміщень у ґратці. Рентгенодифракційне дослідження виявило, що, крім основної фази гідроксіапатиту, в структурі ПК наявний також оксид цинку та залізовмісний фосфат кальцію. Зазначені хімічні елементи входять до складу основних ферментів тканини ПЗ (цинк) та є складовою частиною гемоглобіну (залізо), що опосередковано свідчить про хронічну травматизацію тканини РПЗ. Аналіз структури та хімічного складу всіх досліджених ПК за допомогою сканувальної електронної мікроскопії свідчить про подібність механізмів утворення мікро- і макроскопічних ПК та циклічність формування.

5. Ацинарна аденокарцинома ПЗ з біомінеральними ІлВ, порівняно з аденокарциномою ПЗ без біомінеральних ІлВ, демонструє більшу схильність до експресії остеобластичних маркерів ОСН ($p < 0,001$) та Col I ($p < 0,001$), що може зумовлювати остеотропізм метастазів такого раку ПЗ

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Дослідження впливу біомінеральних включень на біологічну поведінку РПЗ дозволяє використовувати простатоліти як прогностичний фактор перебігу цієї хвороби та диференційовано підходити до лікування пацієнтів із РПЗ.

2. На підставі одержаних у дослідженні даних був запропонований діагностичний алгоритм з урахуванням наявності біомінералізації, що дозволить у клінічній практиці оптимізувати діагностику РПЗ, індивідуалізувати лікування та оцінити прогноз перебігу цієї хвороби.

3. Одержані дані свідчать про можливість використання остеонектину як маркера РПЗ, пов'язаного з розвитком метастазів, зокрема віддалених, особливо до кісткової системи.

4. Для ідентифікації мікропростатолітів у тканині РПЗ та їх диференціювання від СА рекомендоване додаткове використання гістохімічних методик забарвлення – реакції фон Косса.

5. Усі досліджені випадки ацинарної аденокарциноми ПЗ характеризувалися підвищеним умістом кислих глікозаміногліканів, що може бути використаним як додатковий критерій при диференційній діагностиці з доброякісною гіперплазією передміхурової залози.

ПРИМІТКИ

Основні результати дисертаційної роботи були висвітлені у публікаціях у співавторстві з Москаленком Р. А., Романюком А. М. та Данильченком С. М.

Москаленко Р. А.– запропонував пов'язати тематику дисертаційної роботи з комплексними дослідженнями процесів патологічної біомінералізації м'яких тканин людського організму, сформулював задачі досліджень, брав участь у спільних морфологічних дослідженнях, обговоренні результатів та підготовці статей.

Романюк А. М. – надавав ґрунтовні і корисні консультації під час вирішення проблемних питань за темою дисертації, брав участь у спільних морфологічних дослідженнях, обговоренні результатів та підготовці статей.

Данильченко С. М. – брав участь у спільних фізико-хімічних дослідженнях, обговоренні результатів та підготовці наукових публікацій.

Вважаю своїм приємним обов'язком висловити щирі подяку науковому керівнику д.мед.н, доценту Москаленку Роману Андрійовичу за вибір тематики, керівництво, мотивацію до роботи і постійну допомогу та підтримку. Окрема подяка завідувачу відділу радіаційної біофізики Інституту прикладної фізики Національної академії наук України, канд. фіз.-мат. наук Данильченку С.М. за можливість проведення та допомогу в проведенні фізико-хімічного та фазового аналізу біомінеральних депозитів раку передміхурової залози.

Виражаю щирі подяку всьому колективу кафедри патологічної анатомії СумДУ за моральну підтримку, допомогу та активне обговорення результатів дисертаційної роботи на наукових семінарах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Torre L.A., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016 Jan;25(1):16–27.
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CANCER J CLIN.* 2018;68:394–424.
3. Децик О.З., Рудко І.В. Аналіз захворюваності та смертності від злоякісних новоутворень губи і ротової порожнини в Україні та Івано-Франківській області за 2007–2016 рр. Україна. *Здоров'я нації.* 2017;3(44):95–100.
4. Fitzmaurice C., Allen C., Barber R.M., Barregard L., Bhutta Z.A. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.* 2017;3:524–548.
5. Zhou C.K., Check D.P., Lortet-Tieulent J., Laversanne M., Jemal A., Ferlay J., Bray F., Cook M.B., Devesa S.S. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. *Int J Cancer.* 2016 Mar 15;138(6):1388–1400.
6. Cooperberg M.R., Broering J.M., Carroll P.R. Risk assessment for prostate cancer metastasis and mortality at the time of diagnosis. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Jun 16;101(12):878–87.
7. Budaus L., Isbarn H., Chun F., Ahyai S., Fisch M., Dahlem R., Salomon G., Schlomm T., Haese A., Steuber T., Heinzer H., Huland H., Graefen M. Risk assessment for prostate cancer metastases by using the capra score: results from 3209 european patients. *The Journal of Urology.* 2011 May 16; 185(4S):E359.

8. Hyun J.S. Clinical Significance of Prostatic Calculi: A Review. *World J Mens Health*. 2018 Jan;36(1):15–21.
9. Dell'Atti L., Galosi A.B., Ippolito C. Prostatic calculi detected in peripheral zone of the gland during a transrectal ultrasound biopsy can be significant predictors of prostate cancer. *Arch Ital Urol Androl*. 2016 Dec 30;88(4):304–307.
10. Park B., Choo S.H. The burden of prostatic calculi is more important than the presence. *Asian J Androl*. 2017;19:482–485.
11. Hong C.G., Yoon B.I., Choe H.S., Ha U.S., Sohn D.W., Cho Y.H. The prevalence and characteristic differences in prostatic calcification between health promotion center and urology department outpatients. *Korean J Urol*. 2012;53:330–334.
12. Geramoutsos I., Gyftopoulos K., Perimenis P., Thanou V., Liagka D., Siambli D., Barbali G. Clinical correlation of prostatic lithiasis with chronic pelvic pain syndromes in young adults. *Eur Urol*. 2004;45:333–337.
13. Zhao W.P., Li Y.T., Chen J., Zhang Z.G., Jiang H., Xia D., Wang S., Wang P. Prostatic calculi influence the antimicrobial efficacy in men with chronic bacterial prostatitis. *Asian J Androl*. 2012 Sep;14(5):715–719.
14. Park S.W., Nam J.K., Lee S.D., Chung M.K. Are prostatic calculi independent predictive factors of lower urinary tract symptoms? *Asian Journal of Andrology*. 2010;12:221–226.
15. Stewart R.W., Lizama S., Peairs K., Sateia H.F., Choi Y.J. Screening for prostate cancer. *Seminars in Oncology*. 2017 Feb;44(1):47–56.
16. Venkatesan A.M., Stafford R.J., Duran C., Soni P.D., Berlin A., McLaughlin P.W. Prostate magnetic resonance imaging for brachytherapists: Anatomy and technique. *Brachytherapy*. 2017 Jul - Aug;16(4):679–687.
17. Bashir M.N. Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(13):5137–41.

18. Lee D.J., Mallin K., Graves A.J., Chang S.S., Penson D.F., Resnick M.J., Barocas D.A. Recent Changes in Prostate Cancer Screening Practices and Epidemiology. *J Urol*. 2017 Dec;198(6):1230–1240.
19. Blackwelder R., Chessman A. Prostate Cancer Screening: Shared Decision-Making for Screening and Treatment. *Prim Care*. 2019 Mar;46(1):149–155.
20. Perin N.N. Global variation in cancer incidence and mortality. *Curr. Sci*. 2001;81, 465–474.
21. Dorr V.J., Williamson S.K., Stephens R.L. An evaluation of prostate-specific antigen as a screening test for prostate cancer. *Arch Intern Med*. 1993;153(22):2529-2537.
22. Dunn M.W. Prostate Cancer Screening. *Seminars in Oncology Nursing*. 2018;33(2):156–164
23. World Health Organization. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012; 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer .aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Accessed 1 September 2016
24. Chung B.H., Horie S., Chiong E. The incidence, mortality, and risk factors of prostate cancer in Asian men. *Prostate International*. 2019;7(1):1–8
25. Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W., Comber H., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2013;49:1374–1403
26. Nguyen-Nielsen M., Møller H., Tjønneland A., Borre M. Causes of death in men with prostate cancer: Results from the Danish Prostate Cancer Registry (DAPROCAdata). *Cancer Epidemiology*. 2019;59:249–257
27. De Angelis R., Sant M., Coleman M.P., Francisci S., Baili P., Pierannunzio D., Trama A., Visser O., Brenner H., Ardanaz E., Bielska-Lasota M., Engholm G., Nennecke A., Siesling S., Berrino F., Capocaccia R. Cancer

survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE-5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):23–34

28. Mottet M., Bellmunt J., Briers E., van den Bergh R.C.N., Bolla M., van Casteren N.J., Cornford P., Culine S., Joniau S., Lam T., Mason M.D., Matveev V., van der Poel H., van der Kwast T.H., Rouvière O., Wiegand T. Guidelines on prostate cancer. European Association of Urology. 2015. <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Prostate-Cancer-2015-v2.pdf>.

29. Fontes F., Severo M., Castro C., Lourenço S., Gomes S., Botelho F., La Vecchia C., Lunet N. Model-based patterns in prostate cancer mortality worldwide. *Br J Cancer.* 2013 Jun 11;108(11):2354–66.

30. Hsing A.W., Chokkalingam A.P. Prostate cancer epidemiology. *Front. Biosci.* 2006;11:1388–1413.

31. Abidia S.H., Bilwania F., Ghiasa K., Abbas F. Viral etiology of prostate cancer: Genetic alterations and immune response. A literature review. *International Journal of Surgery* .2018;52:136–140.

32. Ho S.-M., Lee M.-T., Lam H.-M., Leung, Y.-K. Estrogens and Prostate Cancer: Etiology, Mediators, Prevention, and Management. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2011; 40(3):591–614.

33. Van Hoang D., Shivappa N., Pham N. M., Hebert J. R., Binns C. W., Lee A. H. Dietary inflammatory index is associated with increased risk of prostate cancer among Vietnamese men. *Nutrition.* 2019;62:140–145.

34. Rezaee M.E., Ward C.E., Sverrisson E.F., Dagrosa L.M. Brief report: Impact of healthcare quality on prostate specific antigen screening for the early detection of prostate cancer. *Preventive Medicine Reports.* 2019;14: 100838.

35. Wen Y., An Z., Qiao B., Zhang C., Zhang, Z. .RPS7 promotes cell migration through targeting epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2019 May;37(5):297.e1–297.e7.

36. Tse L.A., Ming P., Lee Y., Ho W.M., Lam A.T., Lee M.K., Man S.S., He Y., Leung K.S., Hartle J.C., Hu H., Kan H., Wang F., Fai C. Bisphenol A and other environmental risk factors for prostate cancer in Hong Kong. *Environment International*. 2017 Oct;107:1–7.
37. Vella V., Malaguarnera R., Lappano R., Maggiolini M., Belfiore A. Recent views of heavy metals as possible risk factors and potential preventive and therapeutic agents in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Dec 5; 457:57–72
38. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–45.
39. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–7.
40. Reeves F., Everaerts W., Murphy D.G., Costello A. Prostate Cancer (Second Edition). *Science and Clinical Practice*. 2016:253–263.
41. Ioachim H. La Lithiase prostatique peut-elle être considérée comme un facteur cancérogène. *Urologia*. 1961;28(1):1–11.
42. Sfanos K.S., Isaacs W.B., De marzo A.M. Infections and inflammation in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*. 2013;1(1):3–11.
43. De Marzo A.M., Platz E.A., Sutcliffe S., Xu J., Grönberg H., Drake C.G., Nakai Y., Isaacs W.B., Nelson W.G. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):256–69.
44. Giles G.G., Severi G., English D.R., McCredie M.R., Borland R., Boyle P., Hopper J.L. Sexual factors and prostate cancer. *BJU Int*. 2003 Aug;92(3):211–6.
45. Leitzmann M.F., Platz E.A., Stampfer M.J., Willett W.C., Giovannucci E. Ejaculation frequency and subsequent risk of prostate cancer. *JAMA*. 2004 Apr 7;291(13):1578–86.
46. Humphrey P. A., Moch H., Cubilla A. L., Ulbright T. M., Reuter, V. E. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and

Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*. 2016;70(1):106–119.

47. Baig F.A., Hamid A., Mirza T., Syed S. Ductal and Acinar Adenocarcinoma of Prostate: Morphological and Immunohistochemical Characterization. *Oman Medical Journal*. 2015;30(3):162-166.

48. Epstein J.I. An Update of the Gleason Grading System. *The Journal of Urology*. 2010;183(2):433–440.

49. Barakzai M.A. Prostatic Adenocarcinoma: A Grading from Gleason to the New Grade-Group System: A Historical and Critical Review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2019;20:661–666.

50. Chen N., Zhou Q. The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res*. 2016 Feb;28(1):58–64.

51. Mackie S., Rai B. Prostate Cancer reviewed: Part 1 – Epidemiology, Aetiology and Pathology. *Oncology news*. 2008;3(1):22–24.

52. Epstein J.I., Allsbrook W.C. Jr, Amin M.B., Egevad L.L.; ISUP Grading Committee. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(9):1228–42.

53. Pierorazio P.M., Walsh P.C., Partin A.W., Epstein J.I. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU International*. 2013;111(5):753–760.

54. Kryvenko O.N., Epstein J.I. Latest Novelties on the World Health Organization Morphological Classifications of Genitourinary Cancers. Latest Novelties on the World Health Organization Morphological Classifications of Genitourinary Cancers. *European Urology Supplements*. 2017 Dec;16(12):199–209.

55. Epstein J.I., Zelefsky M.J., Sjoberg D.D., Nelson J.B., Egevad L., Magi-Galluzzi C., Vickers A.J., Parwani A.V., Reuter V.E., Fine S.W., Eastham J.A., Wiklund P., Han M., Reddy C.A., Ciezki J.P., Nyberg T., Klein E.A. A

Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016 Mar;69(3):428–35.

56. Rao V., Garudadri G., Shilpa A.S., Fonseca D., Sudha S.M., Sharma R., Subramanyeshwar T.R., Challa S. Validation of the WHO 2016 new Gleason score of prostatic carcinoma. *Urol Ann.* 2018 Jul-Sep;10(3):324–329.

57. Haas G.P., Delongchamps N., Brawley O.W., Wang C.Y. de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol.* 2008;15:3866.

58. Moyer V.A., US Preventive Services Task Force. Screening for Prostate Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med.* 2012;157:120–134.

59. Hoffman R.M. Clinical practice. Screening for Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:2013–2019.

60. Van der Kwast T.H., Roobol M.J. Defining the threshold for significant versus insignificant prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2013;(10):473–482.

61. Schröder F.H., Hugosson J., Roobol M.J., Tammela T.L., Ciatto S., Nelen V., Kwiatkowski M., Lujan M., Lilja H., Zappa M., Denis L.J., Recker F., Berenguer A., Määttänen L., Bangma C.H., Aus G., Villers A., Rebillard X., van der Kwast T., Blijenberg B.G., Moss S.M., de Koning H.J., Auvinen A., ERSPC Investigators. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med.* 2009;360:1320–1328.

62. Solovieva S., Karnaukh M., Panchuk V., Andreev E., Kartsova L., Bessonova E., Legin A., Wang P., Wan H., Jahatspanian I., Kirsanov, D. Potentiometric multisensor system as a possible simple tool for non-invasive prostate cancer diagnostics through urine analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2019;289:42–47.

63. Escamilla-Gómez V., Hernández-Santos D., González-García M.B., Pingarrón Carrazón J.M., Costa-García A. Simultaneous detection of free

and total prostate specific antigen on a screen-printed electrochemical dual sensor. *Biosens. Bioelectron.* 2009;24(8):2678–2683.

64. Helfand B.T., Kan D., Modi P., Catalona W.J.. Prostate cancer risk alleles significantly improve disease detection and are associated with aggressive features in patients with a normal prostate specific antigen and digital rectal examination. *Prostate.* 2011;71(4):394-402.

65. Hara M., Koyanagi Y., Inoue T., Fukuyama T. Some physico-chemical characteristics of 'g-seminoprotein', an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. *Nihon Hoigaku Zasshi.* 1971;25:322–324.

66. Sharma S., Zapatero-Rodríguez J., O'Kennedy R. Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools. *Biotechnology Advances.* 2017 Mar-Apr;35(2):135–149.

67. Catalona W.J., Smith D.S., Ratliff T.L., Dodds K.M., Coplen D.E., Yuan J.J., Petros J.A., Andriole G.L. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 1991;324:1156–1161.

68. Brawer M.K., Lange P.H. Prostate-specific antigen in management of prostatic carcinoma. *Urology.* 1989;33(S5):11–16.

69. Roobol M.J., Carlsson S.V. Risk stratification in prostate cancer screening. *Nat Rev Urol.* 2013;10:38–48.

70. Zaytoun O.M., Anil T., Moussa A.S., Jianbo L., Fareed K., Jones J.S. Morbidity of prostate biopsy after simplified versus complex preparation protocols: assessment of risk factors. *Urology.* 2011;77:910–914.

71. Polascik T.J., Oesterling J.E., Partin A.W. Prostate specific antigen: a decade of discovery – what we have learned and where we are going. *J Urol.* 1999;162:293–306.

72. Matsuyama H., Baba Y., Yamakawa G.I., Yamamoto N., Naito K. Diagnostic value of prostate-specific antigen-related parameters in discriminating prostate cancer. *Int J Urol*. 2000;7:409–414.

73. Üçera O., Müezzinoğlu T., Çelen İ., Temeltaşa G. The effect on the sensitivities of PSA and PSA-age volume score of IPSS and nocturia in predicting positive prostate biopsy findings. *African Journal of Urology*. 2017;23(2):116–119.

74. Logozzi M., Angelini D.F., Iessi E., Mizzoni D., Di Raimo R., Federici C., Lugini L., Borsellino G., Gentilucci S., Pierella F., Marzio V., Sciarra A., Battistini L., Fais S. Increased PSA expression on prostate cancer exosomes in in vitro condition and in cancer patients. *Cancer Lett*. 2017 Sep 10;403:318–329.

75. Малков А.Л., Савич В.В., Титяев И.И., Исаенко В.И., Немкадзе Д.С. Опыт лечения простатолитиаза. *Андрология и генитальная хирургия*. 2006;2:35–36.

76. DuPre N.C., Flavin R., Sfanos K.S., Unger R.H., To S., Gazeeva E., Fiorentino M., De Marzo A.M., Rider J.R., Mucci L.A. Corpora amylacea in prostatectomy tissue and associations with molecular, histological, and lifestyle factors. *Prostate*. 2018 Nov;78(15):1172-1180

77. Christian J.D., Lamm T.C., Morrow J.F., Bostwick D.G. Corpora amylacea in adenocarcinoma of the prostate: incidence and histology within needle core biopsies. *Modern Pathology*. 2005;18:36-39.

78. Dikov D., Staribratova D., Belovejdov V. Corpora amylacea in prostatic stromal smooth muscle cells. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2010; 53(3):584–85.

79. Morales E., Polo L.A., Pastor L.M., Santamaría L., Calvo A., Zuasti A., Ferrer C. Characterization of corpora amylacea glycoconjugates in normal and hyperplastic glands of human prostate. *Journal of Molecular Histology*. 2005;36:235–242.

80. Cross P.A., Bartley C.J., McClure J. Amyloid in prostatic corpora amylacea. *J. Clin. Pathol.* 1992;45:894–897.
81. Yanamandra K., Alexeyev O., Zamotin V., Srivastava V., Shchukarev A., Brorsson A.C., Tartaglia G.G., Vogl T., Kayed R., Wingsle G., Olsson J., Dobson C.M., Bergh A., Elgh F., Morozova-Roche L.A. Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate. *Plos One.* 2009;4(5):e5562.
82. Cai T., Tessarolo F., Caola I., Piccoli F., Nollo G., Caciagli P., Mazzoli S., Palmieri A., Verze P., Malossini G., Mirone V., Bjerklund Johansen T.E. Prostate calcifications: A case series supporting the microbial biofilm theory. *Investigative and Clinical Urology.* 2018;59(3):187–183.
83. Sfanos K.S., Wilson B.A., De Marzo A.M., Isaacs W.B. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar 3;106(9):3443–3448.
84. Симонов В.Я., Дяченко В.Н., Россихин В.В., Василюк А.Н., Храпцов В.М., Приходько Р.Ф. Простатолитиаз – этиологические факторы http://www.rusnauka.com/25_DN_2008/Medecine/29067.doc.htm.
85. Lin J.Z., Wu H.F., Wang J.C., Le M.Z., Yu H.B., Zhou H.T. Ectopic opening of cystic dilatation of the ejaculatory duct into enlarged prostatic utricle: a case report. *J. of Andrology.* 2011;45:234–241.
86. Ramirez C.T., Ruiz J.A., Gomez A.Z. A crystallographic of prostatic calculi. *J Urol.* 1980;124:840–843.
87. Guo W., Chen M., He X., Bai A., Gao J., Zhang Y., Li Y., Wen J. Component analysis of prostatic calculi and the causes of calculus formation. *Biomedical Research.* 2016;27(4):1223–1227.
88. Sutor D.J., Wooley S.E. The Crystalline Composition of Prostatic Calculi. *British Journal of Urology.* 1974;46(5):533–535.

89. Fei X., Jin W., Hua S., Song Y. Prospective Study on Association of Prostatic Calcifications with Clinical Symptoms and Results of Treatment in Men with type III prostatitis. *Sci Rep.* 2017;7:5234.
90. Rafay K., Waqas J., Shilpi S., Shuvendu S., Abdalla Y. Prostatic Calculi: A Harbor for Infections, a Case Report and Review of Literature. *World Journal of Nephrology and Urology.* 2015;4(1):186-188.
91. Hwang E.C., Choi H.S., Im C.M., Jung S.I., Kim S.O., Kang T.W., Kwon D.D., Park K.S., Ryu S.B. Prostate calculi in cancer and BPH in a cohort of Korean men: presence of calculi did not correlate with cancer risk. *Asian J Androl.* 2010 Mar;12(2):215–220.
92. Coleman R.E. Skeletal complications of malignancy. *Cancer.* 1997;80:1588–94.
93. Bussard K.M., Gay C.V., Mastro A.M. The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:41–55.
94. Buijs J.T., van der Pluijm G. Osteotropic cancers: From primary tumor to bone. *Cancer Lett.* 2009;273:177–193.
95. Langley R.R., Fidler I.J. The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer.* 2011;128:2527–2535.
96. Guise T. Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment. *Semin Oncol.* 2010;37(S2):S2–S14.
97. Logothetis C., Morris M.J., Den R., Coleman R.E. Current perspectives on bone metastases in castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(1):189–196.
98. Logothetis C.J., Lin S.-H. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:21–8.
99. Faltermeier C.M., Drake J.M., Clark P.M., Smith B.A., Zong Y., Volpe C., Mathis C., Morrissey C., Castor B., Huang J., Witte O.N. Functional

screen identifies kinases driving prostate cancer visceral and bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016 Jan 12;113(2):E172–E181.

100. Sathiakumar N., Delzell E., Morrissey M.A., Falkson C., Yong M., Chia V., Blackburn J., Arora T., Brill I., Kilgore M.L. Mortality following bone metastasis and skeletal-related events among women with breast cancer: A population-based analysis of U.S. Medicare beneficiaries, 1999-2006. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jan;131:231–238.

101. Roodman G.D. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*. 2004;360:1655–1664.

102. Keller E.T., Brown J. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. *J Cell Biochem*. 2004;91:718–729.

103. Yin J.J., Mohammad K.S., Käkönen S.M., Harris S., Wu-Wong J.R., Wessale J.L., Padley R.J., Garrett I.R., Chirgwin J.M., Guise T.A. A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10954–10959.

104. Nelson J.B., Nguyen S.H., Wu-Wong J.R., Opgenorth T.J., Dixon D.B., Chung L.W., Inoue N. New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology*. 1999;53:1063–1069.

105. Ottewill P.D., Wang N., Meek J., Fowles C.A., Croucher P.I., Eaton C.L., Holen I. Castration-induced bone loss triggers growth of disseminated prostate cancer cells in bone. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21:769–781.

106. Dai J., Keller J., Zhang J., Lu Y., Yao Z., Keller E.T. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res*. 2005;65:8274–8285.

107. Cohen P., Peehl D.M., Graves H.C.B., Rosenfeld R.G. Biological effects of prostate specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. *J Endocrinol*. 1994;142:407–415.

108. Cramer S.D., Chen Z., Peehl D.M. Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *J Urol.* 1996;156:526–531.
109. Briganti A., Suardi N., Gallina A., Abdollah F., Novara G., Ficarra V., Montorsi F. Predicting the risk of bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 2014 Feb;40(1):3–11.
110. Hoque A., Chen H., Xu X.C. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:88–94.
111. Zhuang L., Kim J., Adam R.M., Solomon K.R., Freeman M.R. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest.* 2005;115:959–968.
112. Manolagas S.C., O'Brien C.A., Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:699–712.
113. Wiren K.M., Evans C.A., Zhang X.-W. Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. *J Endocrinol.* 2002;175:683–94.
114. Chiang C., Chiu M., Moore A.J., Anderson P.H., Ghasem-Zadeh A., McManus J.F., Ma C., Seeman E., Clemens T.L., Morris H.A., Zajac J.D., Davey R.A. Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. *J Bone Miner Res.* 2009;24(4):621–631.
115. Russell P.K., Clarke M.V., Cheong K., Anderson .PH., Morris H.A., Wiren K.M., Zajac J.D., Davey R.A. Androgen receptor action in osteoblasts in male mice is dependent on their stage of maturation. *J Bone Miner Res.* 2015;30:809–823.
116. Chen J.-F., Lin P.-W., Tsai Y.-R., Yang Y.-C., Kang H.-Y. Androgens and Androgen Receptor Actions on Bone Health and Disease: From Androgen Deficiency to Androgen Therapy. *Cells.* 2019;8:1318.

117. Shafi A.A., Yen A.E., Weigel N.L. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther.* 2013 Dec;140(3):223–38.
118. Krieg M., Weisser H., Tunn S. Potential activities of androgen metabolizing enzymes in human prostate. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995;53(1–6):39–400
119. Davey R.A., Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev.* 2016 Feb;37(1):3–15.
120. Pihlajamaa P., Sahu B., Jänne O.A. Determinants of Receptor- and Tissue-Specific Actions in Androgen Signaling. *Endocr Rev.* 2015 Aug;36(4):357–84.
121. Steers W.D. 5 α -reductase activity in the prostate. *Urology.* 2001 Dec;58(6 Suppl 1):17–24.
122. Dehm S.M., Tindall D.J. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2006;99:333–344.
123. Luo J., Attard G., Balk S.P., Bevan C., Burnstein K., Cato L., Cherkasov A, De Bono J.S., Dong Y., Gao A.C., Gleave M., Heemers H., Kanayama M., Kittler R., Lang J.M., Lee R.J., Logothetis C.J., Matusik R., Plymate S., Sawyers C.L., Selth L.A., Soule H., Tilley W., Weigel N.L., Zoubeidi A., Dehm S.M., Raj G.V. Role of Androgen Receptor Variants in Prostate Cancer: Report from the 2017 Mission Androgen Receptor Variants Meeting. *Eur Urol.* 2018 May;73(5);715–723.
124. Cai Z., Chen W., Zhang J., Li H. Androgen receptor: what we know and what we expect in castration-resistant prostate cancer. *Int Urol Nephrol.* 2018 Oct;50(10):1753–1764.
125. Wyatt A.W., Gleave M.E. Targeting the adaptive molecular landscape of castration-resistant prostate cancer. *EMBO Mol Med.* 2015 Jul;7(7):878–894.

126. Montgomery R.B., Mostaghel E.A., Vessella R., Hess D.L., Kalhorn T.F., Higano C.S., True L.D., Nelson P.S. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* 2008;68(11):4447–54.
127. Karantanos T., Evans C.P., Tombal B., Thompson T.C., Montironi R., Isaacs W.B. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level. *Eur Urol.* 2015;67:470–479.
128. Antonarakis E.S., Armstrong A.J., Dehm S.M., Luo J. Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2016;19:231–41.
129. Ho S.M., Leung Y.K., Chung I. Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1089:177–193.
130. Prins G.S., Korach K.S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids.* 2008;73(3):233–244.
131. Hartman J., Ström A., Gustafsson J.Å. Current concepts and significance of estrogen receptor β in prostate cancer. *Steroids.* 2012;77:1262–1266.
132. Daniels G., Gellert L.L., Melamed J., Hatcher D., Li Y., Wei J., Wang J., Lee P. Decreased expression of stromal estrogen receptor α and β in prostate cancer. *Am J Transl Res.* 2014;6:140–146.
133. Pisolato R., Lombardi A.P.G., Vicente C.M., Lucas T.F.G., Lazari M.F.M., Porto C.S. Expression and regulation of the estrogen receptors in PC-3 human prostate cancer cells. *Steroids.* 2016 Mar;107:74–86.
134. Bradshaw A.D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;44:480–488.
135. Murphy-Ullrich J.E., Sage E.H. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol.* 2014;37:1–14.

136. Rosset E.M., Bradshaw A.D. SPARC/Osteonectin in Mineralized Tissue. *Matrix Biol.* 2016 May–Jul;52–54:78–87.
137. Kelm R.J. Jr., Mann K.G. The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *J. Biol. Chem.* 1991;266:9632–9639.
138. Termine J.D., Kleinman H.K., Whitson S.W., Conn K.M., McGarvey M.L., Martin G.R. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981;26:99–105.
139. Delany A.M., Hankenson K.D. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J. Cell Commun. Signal.* 2009;3:227–238.
140. Trombetta J.M., Bradshaw A.D. SPARC/Osteonectin Functions to Maintain Homeostasis of the Collagenous Extracellular Matrix in the Periodontal Ligament. *J Histochem Cytochem.* 2010 Oct;58(10):871–879.
141. Ingber D., Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1989;109:317–30.
142. Thomas R., True L.D., Bassuk J.A., Lange P.H., Vessella R.L. Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2000 Mar;6(3):1140-1149.
143. Brekken R.A., Sage E.H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol.* 2001;19:816–827.
144. Breton-Gorius J., Clezardin P., Guichard J., Debili N., Malaval L., Vainchenker W., Cramer E.M., Delmas P.D. Localization of platelet osteonectin at the internal face of the alpha-granule membranes in platelets and megakaryocytes. *Blood.* 1992;79:936–941.
145. Reed M.J., Puolakkainen P., Lane T.F., Dickerson D., Bornstein P., Sage E.H. Differential expression of SPARC and thrombospondin 1 in wound repair: immunolocalization and in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 1993;41:1467–1477.

146. Sage H., Johnson C., Bornstein P. Characterization of a novel serum albuminbinding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture. *J Biol Chem.* 1984;259:3993–4007.
147. McCabe N.P., Kerr B.A., Madajka M., VasANJI A., Byzova T.V. Augmented Osteolysis in SPARC-Deficient Mice with Bone-Residing Prostate Cancer. *Neoplasia.* 2011 Jan;13(1):31–39.
148. Ruela-Arispe M. L., Lane T. F., Redmond D., Reilly M., Bolender R. P., Kavanagh T. J., Sage E. H. Expression of SPARC during development of the chicken chorioallantoic membrane: evidence for regulated proteolysis in vivo. *Mol. Biol. Cell.* 1995;6: 327–343.
149. Duarte A.H., Colli S., Alves-Pereira J.L., Martins M.P., Sampaio F.J.B., Ramos C.F. Collagen I and III and metalloproteinase gene and protein expression in prostate cancer in relation to Gleason score. *International Brazilian Journal of Urology.* 2012;38(3):341–354.
150. Gao J., Song J., Huang H., Li Z., Du Y., Cao J., Li M., Lv S., Lin H., Gong Y. Methylation of the SPARC gene promoter and its clinical implication in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29(1):28.
151. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010;141:52-67.
152. Hynes R.O., Naba A. Overview of the matrisome – an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(1):a004903.
153. Cierna Z., Mego M., Janega P., Karaba M., Minarik G., Benca J., Sedláčková T., Cingelova S., Gronesova P., Manasova D., Pindak D., Sufliarsky J., Danihel L., Reuben J.M., Mardiak J. Matrix metalloproteinase 1 and circulating tumor cells in early breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:472.
154. Mohan V., Talmi-Frank D., Arkadash V., Papo N., Sagi I. Matrix metalloproteinase protein inhibitors: highlighting a new beginning for metalloproteinases in medicine. *Metalloproteinases in medicine.* 2016;3:31–47.

155. Radisky E.S., Radisky D.C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010;15:201–212.
156. Mannello F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? *BMC Med*. 2011;9:95.
157. Hu F., Zhang Y., Li M., Zhao L., Chen J., Yang S., Zhang X. BMP-6 inhibits the metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells by regulating MMP-1 expression. *Oncol. Rep*. 2016;35:1823–1830.
158. Liu M., Hu Y., Zhang M.-F., Luo K.-J., Xie X.-Y., Wen J., Fu J.H., Yang, H. MMP1 promotes tumor growth and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Letters*. 2016;377(1):97–104.
159. Lu X., Wang Q., Hu G., Van Poznak C., Fleisher M., Reiss M., Massagué J., Kang Y. ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis. *Genes Dev*. 2009;23:1882–1894
160. Casimiro S., Mohammad K.S., Pires R., Tato-Costa J., Alho I., Teixeira R., Carvalho A., Ribeiro S., Lipton A., Guise T.A., Costa L. RANKL/RANK/MMP-1 Molecular Triad Contributes to the Metastatic Phenotype of Breast and Prostate Cancer Cells In Vitro. *PLoS One*. 2013;8(5):e63153.
161. Ozden F., Saygin C., Uzunaslán D., Onal B., Durak H., Aki H. Expression of MMP-1, MMP-9 and TIMP-2 in prostate carcinoma and their influence on prognosis and survival. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2013;39:1373–1382.
162. Bianchi M.E. Damps, pamps and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol*. 2007;81:1–5.
163. Min H.J., Choe J.W., Chang M.Y., Kim K.S., Lee S.Y., Mun S.K. The expression and correlation of Hsp 70 and Hsp 27 in serous middle ear effusion fluids of pediatric patients-a preliminary study. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2017 Oct;101:145–149.

164. Wu J., Liu T., Rios Z., Mei Q., Lin X., Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 2017;38:226–256.
165. Gabai V.L., Budagova K.R., Sherman M.Y. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene.* 2005;24:3328.
166. Jindal D.G., Jindal V., Joshi S., Bhojia I., Chawdhr A. Heat shock proteins in pathology: A review. *Journal of Pierre Fauchard Academy (India Section).* 2016 Sep–Dec;30(3–4):84–87.
167. Helmbrecht K., Zeise E., Rensing L. Chaperons in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* 2000;92:1564.
168. Ni L., Yang C.S., Gioeli D., Frierson H., Toft D.O., Paschal B.M. FKBP51 Promotes Assembly of the Hsp90 Chaperone Complex and Regulates Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer Cells. *Mol Cell Biol.* 2010 Mar;30(5):1243–1253.
169. Heinlein C.A., Chang C.S. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr. Rev.* 2004;25:276–308.
170. Kurahashi T., Miyake H., Hara I., Fujisawa M. Expression of Major Heat Shock Proteins in Prostate Cancer: Correlation With Clinicopathological Outcomes in Patients Undergoing Radical Prostatectomy. *The Journal of Urology.* 2007 Feb;177(2):757-761.
171. Narula S., Tandon S., Baligar P., Singh S.K., Tandon C. Human kidney stone matrix: Latent potential to restrain COM induced cytotoxicity and inflammatory response. *Chemico-Biological Interactions.* 2017 Dec; 278:114–122.
172. Melman A. Synthesis of Inorganic Nanoparticles Using Protein Templates. *Fine Particles in Medicine and Pharmacy.* Springer US. 2012:195-222.

173. Chen E., Xue D., Zhang W., Lin F., Pan Z. Extracellular heat shock protein 70 promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells through activation of the ERK signaling pathway. *FEBS Letters*. 2015 Dec;589(24, part B):4088–4096.
174. Fong-Ngern K., Sueksakit K., Thongboonkerd V. Surface heat shock protein 90 serves as a potential receptor for calcium oxalate crystal on apical membrane of renal tubular epithelial cells. *J Biol Inorg Chem*. 2016 Jul;21(4):463–74.
175. Li K., Xue Y., Chen A., Jiang Y., Xie H., Shi Q., Zhang S., Ni Y. Heat Shock Protein 90 Has Roles in Intracellular Calcium Homeostasis, Protein Tyrosine Phosphorylation Regulation, and Progesterone-Responsive Sperm Function in Human Sperm. *PLoS One*. 2014;9(12):e115841.
176. Kato K., Adachi S., Matsushima-Nishiwaki R., Minamitani C., Natsume H., Katagiri Y., Hirose Y., Mizutani J., Tokuda H., Kozawa O., Otsuka T. Regulation by Heat Shock Protein 27 of Osteocalcin Synthesis in Osteoblasts. *Endocrinology*. 2011;152(5):1872–1882.
177. Spierings D., McStay G., Saleh M., Bender C., Chipuk J., Maurer U., Green D.R. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science (New York, NY)*. 2005;310(5745):66–67.
178. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science (New York, NY)*. 2002;296(5573):1635–1636.
179. Adams J.M., Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324–1337.
180. Hu J., Duan Z., Yu G., Wang S. Bcl-2 Inhibitors as Sensitizing Agents for Cancer Chemotherapy. Protein Kinase Inhibitors as Sensitizing Agents for *Chemotherapy*. 2019:151–168.
181. Green D.R., Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009;458:1127–1130.

182. Thornton C., Hagberg H. Mechanisms of Cell Death in the Developing Brain. *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*. 2017;1:76-85.e4
183. Chappell W.H., Lehmann B.D., Terrian D.M., Abrams S.L., Steelman L.S., McCubrey J.A. p53 expression controls prostate cancer sensitivity to chemotherapy and the MDM2 inhibitor Nutlin-3. *Cell Cycle*. 2012 Dec 15;11(24):4579–4588.
184. Oren M., Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a001107.
185. Chang Y.J., Linh N.H., Shih Y.H., Yu H.M., Li M.S., Chen Y.R. Alzheimer's amyloid-beta sequesters caspase-3 in vitro via its C-terminal tail. *ACS Chem Neurosci*. 2016;7:1097–1106.
186. Flanagan L., Meyer M., Fay J., Curry S., Bacon O., Duesmann H., John K., Boland K.C., McNamara D.A., Kay E.W., Bantel H., Schulze-Bergkamen H., Prehn J.H. Low levels of caspase-3 predict favourable response to 5FU-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: caspase-3 inhibition as a therapeutic approach. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2087.
187. Rodríguez-Berriguete G., Galvis L., Fraile B., de Bethencourt F.R., Martínez-Onsurbe P., Olmedilla G., Paniagua R, Royuela M. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. *Human Pathology*. 2012;43:229–237.
188. Ashkenazi A., Salvesen G. Regulated Cell Death: Signaling and Mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2014;30:337–356.
189. Bleicken S., Landeta O., Landajuela A., Basanez G., García-Saez A.J. Proapoptotic Bax and Bak Proteins Form Stable Protein-permeable Pores of Tunable Size. *The journal of biological chemistry*. 2013 Nov;288(46):33241-33252.
190. Rostamzadeh A., Ghadimi T., Allahveisi A., Mohammadi M., Rezaei S., Rezaie M.J. The expression of Bax protein in the early stages of

spinal cord injury in the sperm cells of rats. *Polish Annals of Medicine*. 2018;25(2):196–202.

191. Snigdha S., Smith E.D., Prieto G.A., Cotman C.W. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neuroscience Bulletin*. 2012;28(1):14–24.

192. Hernández-Luna M.A., Díaz de León-Ortega R., Hernández-Cueto D.D., Gaxiola-Centeno R., Castro-Luna R., Martínez-Cristóbal L., Huerta-Yépez S., Luria-Pérez R. Bactofection of sequences encoding a Bax protein peptide chemosensitizes prostate cancer tumor cells. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2016 Nov - Dec;73(6):388-396.

193. Maji S., Panda S., Samal S. K., Shriwas O., Rath R., Pellecchia M., Emdad L., Das S.K., Fisher P.B., Dash R. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Advances in Cancer Research*. 2018;137:37–75.

194. Westphal D., Kluck R.M., Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis". *Cell Death & Differentiation*. 2014 Feb;21(2):196–205.

195. Yuan Z., Jiang H., Zhu X., Liu X., Li L. Ginsenoside Rg3 promotes cytotoxicity of Paclitaxel through inhibiting NF- κ B signaling and regulating Bax/Bcl-2 expression on triple-negative breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017 May;89:227–232.

196. Kervancioglu E., Kosan M., Erinanc H., Gonulalan U., Oguzulgen A.I., Coskun E.Z., Ozkardes H. Predictive values of vascular endothelial growth factor and microvessel-density levels in initial biopsy for prostate cancer. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2016 Feb;32(2):74–79.

197. Liu Z.Q., Fang J.M., Xiao Y.Y., Zhao Y., Cui R., Hu F., Xu Q. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:2289–2298.

198. Nordby Y., Andersen S., Richardsen E., Ness N., Al-Saad S., Melbø-Jørgensen C., Patel H.R., Dønnem T., Busund L.T., Bremnes R.M. Stromal expression of VEGF-A and VEGFR-2 in prostate tissue is associated with biochemical and clinical recurrence after radical prostatectomy. *Prostate*. 2015;75:1682–1693.
199. Rivera-Pérez J., Monter-Vera M.D.R., Barrientos-Alvarado C., Toscano-Garibay J.D., Cuesta-Mejías T., Flores-Estrada J. Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies. *Oncology Letters*. 2018;15:1072–1078.
200. Djordjevic S., Driscoll P.C. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov. Today*. 2013;18:447–455.
201. Shibuya M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol Ther*. 2014;22:1–9.
202. Roberts E., Cossigny D.A.F., Quan G.M.Y. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. *Prostate Cancer*. 2013:418340.
203. Gerber H.-P., Vu T. H., Ryan A. M., Kowalski J., Werb Z., Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*. 1999;5(6):623–628.
204. Cossigny D., Quan G. M. Y. In vivo animal models of spinal metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2012;31(1):99–108.
205. Curtin P., Youm H., Salih E. Tree-dimensional cancerbone metastasis model using ex-vivo co-cultures of live calvarial bones and cancer cells. *Biomaterials*. 2012;33(4):1065–1078.
206. Karan D., Dubey S. From Inflammation to Prostate Cancer: The Role of Inflammasomes. *Adv Urol*. 2016;2016:3140372.
207. Sfanos K.S., De Marzo A.M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):199–215.

208. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139:871–890.

209. Zhu X.D., Zhang J.B., Zhuang P.Y., Zhu H.G., Zhang W., Xiong Y.Q., Wu W.Z., Wang L., Tang Z.Y., Sun H.C. High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:2707–2716.

210. Steidl C., Lee T., Shah S.P., Farinha P., Han G., Nayar T., Delaney A., Jones S.J., Iqbal J., Weisenburger D.D., Bast M.A., Rosenwald A., Muller-Hermelink H.K., Rimsza L.M., Campo E., Delabie J., Braziel R.M., Cook J.R., Tubbs R.R., Jaffe E.S., Lenz G., Connors J.M., Staudt L.M., Chan W.C., Gascoyne R.D. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;362:875–885.

211. Wu Y., Deng J., Rychahou P.G., Qiu S., Evers B.M., Zhou B.P. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009;15:416–428.

212. Hoesel B., Schmid J. A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*. 2013;12(1);86.

213. Mishra A., Shiozawa Y., Pienta K.J., Taichman R.S: Homing of cancer cells to the bone. *Cancer Microenviron*. 2011,4:221–235.

214. Scimeca M., Urbano N., Rita B., Mapelli S.N., Catapano C.V., Carbone G.M., Ciuffa S., Tavolozza M., Schillaci O., Mauriello A., Bonanno E. Prostate Osteoblast-Like Cells: A Reliable Prognostic Marker of Bone Metastasis in Prostate Cancer Patients. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018;2018:9840962.

215. Пат. 41235 Україна, МПК51 G01N 1/28. Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати з парафінових гістологічних блоків / Р. А. Москаленко, А. М. Піддубний, А. М. Романюк; заявник і патентовласник Сумський держ. ун-т. – № u201702817; заявл. 27.03.2017, опубл. 11.09.2017, бюл. №17.

216. . Бугайцов С.Г. Аналіз ефективності протиракової санітарно-просвітньої роботи у системі державного управління якістю надання онкологічної допомоги населенню України. www.nbuv.gov.ua. 2008;3.
217. Orellana C. Environmental pollutants that cause cancer. *The Lancet Oncology*. 2001;2(11):P650.
218. Nakano T., Otsuki T. Environmental air pollutants and the risk of cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013 Nov;40(11):1441–1445.
219. Ghorani-Azam A., Riahi-Zanjani B., Balali-Mood M. Effects of air pollution on human health and practical measures for prevention in Iran. *J Res Med Sci*. 2016 Sep 1;21:65.
220. Bagheri G., Rezaee R., Tsarouhas K., Docea A.O., Shahraki J., Shahriar M., Wilks M.F., Jahantigh H., Tabrizian K., Moghadam A.A., Bagheri S., Spandidos D.A., Tsatsakis A., Hashemzaei M. Magnesium sulfate ameliorates carbon monoxide- induced cerebral injury in male rats. *Mol Med Rep*. 2019 Feb;19(2):1032–1039.
221. Романюк А.М., Москаленко Р.А., Піддубний А. М. Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини передміхурової залози в Сумській області. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016;128(1): 94–97.
222. Санніков В., Мучнік А., Колосова С. Гіперплазія щитоподібної залози у дітей з IV зони радіаційного контролю та її кореляція з накопиченням солей важких металів у навколишньому середовищі. *Український журнал радіології*. 1995;3:14–16.
223. Піддубний А. М., Москаленко Р.А. Аналіз захворюваності на рак передміхурової залози серед населення Сумської області. Актуальні питання теоретичної та практичної медицини : збірник тез доповідей IV Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 21-22 квітня 2016 р. 2016;1:137.
224. Lo U.G., Lee C.F., Lee M.S., Hsieh J.T. The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct;18(10):2079.

225. Hensel J., Thalmann G.N. Biology of Bone Metastases in Prostate Cancer. *Urology*. 2016 Jun;92:6–13.
226. Bernstein A.N., Shoag J.E., Golan R., Halpern J.A., Schaeffer E.M., Hsu W.C., Nguyen P.L., Sedrakyan A., Chen R.C., Eggener S.E., Hu J.C. Contemporary Incidence and Outcomes of Prostate Cancer Lymph Node Metastases. *J Urol*. 2018 Jun;199(6):1510–1517.
227. Coleman R.E. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin Cancer Res*. 2006 Oct 15;12(20 Pt 2):6243s–6249s.
228. Hagberg Thulin M., Nilsson M.E., Thulin P., Céraline J., Ohlsson C., Damber J.E., Welén K. Osteoblasts promote castration-resistant prostate cancer by altering intratumoral steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Feb 15;422:182–191.
229. Piddubnyi A., Moskalenko R. Molecular aspects of the bone metastases development in prostate cancer. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2019;7(2): 96–108.
230. Kawai M., Rosen C.J. The insulin-like growth factor system in bone: basic and clinical implications. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012 Jun;41(2):323–33.
231. Park S.H., Keller E.T., Shiozawa Y. Bone Marrow Microenvironment as a Regulator and Therapeutic Target for Prostate Cancer Bone Metastasis. *Calcif Tissue Int*. 2018 Feb;102(2):152–162.
232. Rucci N., Teti A. Osteomimicry: how tumor cells try to deceive the bone. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010 Jun 1;2:907–15.
233. H. Köseoglua, G. Aslanb, B.H. Senc, B. Tunad, and K. Yörükoglud. Prostatic calculi: silent stones. *Actas urol esp*. 2010;34(6):555–559
234. Піддубний А. М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. *Art of medicine*. 2018;3:100–105.

235. Stamatiou K., Magri V., Perletti G., Trinchieri A., Lacroix R., Rekleiti N., Moschouris H. Prostatic calcifications are associated with a more severe symptom burden in men with type II chronic bacterial prostatitis. *Arch Ital Urol Androl.* 2019 Jul 2;91(2)
236. Schwaderer A.L., Wolfe A.J. The association between bacteria and urinary stones. *Ann Transl Med.* 2017 Jan;5(2):32
237. Piddubnyi A., Romaniuk A., Radomychelski I.-M., Moskalenko Yu., Moskalenko R. Prostate Cancer with Intraluminal Inclusions: the Association of the Immunophenotype with Grade Score. *Iranian Journal of Pathology.* 2019;14(3):212-222.
238. Mondal S., Bhattacharya K., Mallick A., Sangwan R., Mandal C. Bak Compensated for Bax in p53-null Cells to Release Cytochrome c for the Initiation of Mitochondrial Signaling during Withanolide D-Induced Apoptosis. *PLoS One.* 2012;7(3):e34277.
239. Chappell W.H., Candido S., Abrams S.L., Russo S., Ove R., Martelli A.M., Cocco L., Ramazzotti G., Cervello M., Montalto G., Steelman L.S., Leng X., Arlinghaus R.B., Libra M., McCubrey J.A. Roles of p53, NF- κ B and the androgen receptor in controlling NGAL expression in prostate cancer cell lines. *Adv Biol Regul.* 2018 Aug;69:43-62.
240. Luo R., Chen X., Ma H., Yao C., Liu M., Tao J., Li, X. Myocardial caspase-3 and NF- κ B activation promotes calpain-induced septic apoptosis: The role of Akt/eNOS/NO pathway. *Life Sci.* 2019 Apr 1;222:195-202
241. Piddubnyi A., Lyndin M., Moskalenko Yu., Vynnychenko I., Romaniuk A., Moskalenko R. The effect of prostatic stones on the immunophenotype of prostate cancer cells. *Medicina: 77th International Scientific Conference of the University of Latvia (February 22, 2019 Riga, Latvia).* 2019;55(S1):95.
242. Njemini R., Forti L.N., Mets T., Van Roie E., Coudyzer W., Beyer I., Delecluse C., Bautmans I. Sex difference in the heat shock response to

high external load resistance training in older humans. *Exp Gerontol.* 2017 Jul;93:46-53

243. Piddubnyi A., Moskalenko R., Romaniuk A., Zakorko I.-M., Lyndin M., Sikora V. Hsp 90 overexpression in chronic bacterial prostatitis with corpora amylacea. *Virchows Arch.* 2017;471(Suppl.1):267–268.

244. Centenera M.M., Fitzpatrick A.K., Tilley W.D., Butler L.M. Hsp90: still a viable target in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Apr;1835(2):211–8.

245. Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M., Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med.* 2008 Jun; 12(3):743–761.

246. Seipelt R.G., Backer C.L., Mavroudis C., Stellmach V., Cornwell M., Seipelt I.M., Schoendube F.A., Crawford S.E. Osteopontin expression and adventitial angiogenesis induced by local vascular endothelial growth factor 165 reduces experimental aortic calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Apr;129(4):773-81.

247. Emma Roberts, Davina A. F. Cossigny, Gerald M. Y. Quan. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Metastatic Prostate Cancer to the Skeleton. *Prostate Cancer.* 2013;2013: Article ID 418340

248. Romaniuk A., Lyndin M., Sikora V., Piddubnyi A., Budko G., Volkogon A. Multifocal primary tumour with lesions in prostate gland and urinary bladder: clinical case. *Bangladesh Journal of Medical Science.* 2017;16(1):161–165.

249. Cioni B., Zwart W., Bergman A.M. Androgen receptor moonlighting in the prostate cancer microenvironment. *Endocr Relat Cancer.* 2018 Jun;25(6):R331–R349.

250. Ammirante M., Luo J.L., Grivennikov S., Nedospasov S., Karin M. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2010;464(7286):302–305.

251. Zhang C., Song X., Zhu M., Shi S., Li M., Jin L., Lang J., Li G., Zheng H. Association between MMP1 -1607 1G>2G polymorphism and head and neck cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(2):e56294.

252. Fanjul-Fernández M., Folgueras A.R., Fueyo A., Balbín M., Suárez M.F., Fernández-García M.S., Shapiro S.D., Freije J.M., López-Otín C. Matrix metalloproteinase Mmp-1a is dispensable for normal growth and fertility in mice and promotes lung cancer progression by modulating inflammatory responses. *J Biol Chem*. 2013 May 17;288(20):14647–14656.

253. Піддубній А.М. Порівняльний аналіз впливу простатолітів та corpora amylacea на імунофенотип раку передміхурової залози. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2019;1:64–69.

254. Odero-Marah V., Hawsawi O., Henderson V., Sweeney J. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1095:101-110.

255. Montanari M., Rossetti S., Cavaliere C., D'Aniello C., Malzone M.G., Vanacore D., Di Franco R., La Mantia E., Iovane G., Piscitelli R., Muscariello R., Berretta M., Perdonà S., Muto P., Botti G., Bianchi A.A.M., Veneziani B.M., Facchini G. Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(21):35376-35389

256. Moskalenko R., Romanyuk A., Danilchenko S., Stanislavov O., Piddubniy A., Zakorko I.M., Tkach G. Morphogenetic aspects of biomineralization on the background of benign prostatic hyperplasia. *Georgian medical news*. 2013;1(214):54–61.

257. Романюк А.М. Москаленко Р.А., Піддубний А.М. Кореляційні зв'язки раку передміхурової залози з Corpora amylacea та простатолітами Актуальні питання теоретичної та практичної медицини : збірник тез доповідей II Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 16-18 квітня 2014 р. 2014:169.

258. Röcken C., Linke R. P., Saeger W. Corpora Amylacea in the Lung, Prostate and Uterus. *Pathology - Research and Practice*. 1996;192(10):998–1006.
259. Piddubnyi A., Danylchenko S., Romaniuk A., Moskalenko R. Prostatic calculi cause osteoblastic immunophenotype of prostate cancer. *Патологія*. 2019.;16(2):170–176.
260. Romaniuk A., Piddubnyi A., Lyndin M., Sikora V., Gyryavenko N., Moskalenko R. Prostate cancer leads to a change in the composition of tissue carbohydrates. *Virchows Archiv*. 2019;449 (Suppl 1): S 435-36.
261. Mathur S.K., Gupta S., Marwah N., Narula A., Singh S., Arora B. Significance of mucin stain in differentiating benign and malignant lesions of prostate. *Indian J Pathol Microbiol*. 2003 Oct;46(4):593–5.
262. Agrawal D.N., Zawar M.P., Deshpande N.M., Sudhamani S. The study of mucin histochemistry in benign and malignant lesions of prostate. *Journal of the Scientific Society*. 2014; 41 (1): 38-40.
263. Bastola S., Talwar O.P. Evaluation of mucin histochemistry in benign and malignant prostatic lesion and their correlation PSA level. *Journal of Pathology of Nepal*. 2014;4:612 – 616.
264. Burns-Cox N., Avery N. C., Gingell J. C., Bailey A. J. Changes in collagen metabolism in prostate cancer: a host response that may alter progression. *The journal of urology*. 2001;166(5):1698–1701.
265. Hall C.W., Dubyk C.W., Riesenberger T.A., Shein D., Keller E.T., van Golen K.L. Type I Collagen Receptor ($\alpha 2\beta 1$) Signaling Promotes Prostate Cancer Invasion through RhoC GTPase. *Neoplasia*. 2008 Aug;10(8):797–803.
266. Piddubnyi A., Moskalenko R., Radomychelski I.-M., Lyndin M., Sikora V., Romaniuk A. Osteonectin overexpression in the case of prostate cancer with intraluminal inclusions. *Virchows Archiv*. 2018;473:S45.

267. Delany A.M., Kalajzic I., Bradshaw A.D., Sage H., Canalis E. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology*. 2003;144:2588—2596.

268. Maeng H.-Y., Song S. B., Choi D.-K., Kim K. E., Jeong H. Y., Sakaki Y., Furihata, C. Osteonectin-expressing cells in human stomach cancer and their possible clinical significance. *Cancer Letters*. 2002;184(1):117–121.

269. Jacob K., Webber M., Benayahu D., Kleinman H.K. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res*. 1999 Sep 1; 59(17): 4453–4457.

ДОДАТКИ

Додаток А1



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Впроваджено:** у діагностичну роботу відділення загальної патології з гістологічними та імуногістохімічними дослідженнями №1 Вінницького обласного патологоанатомічного бюро.
6. **Включено:** у практичну роботу Вінницького обласного патологоанатомічного бюро при інтерпретації пухлинних процесів у передміхуровій залозі.
7. **Результати впровадження:** введено у роботу відділення загальної патології з гістологічними та імуногістохімічними дослідженнями №1 Вінницького обласного патологоанатомічного бюро.
8. **Термін впровадження:** квітень-липень 2019 року.
9. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Вінницьке обласне патологоанатомічне бюро.
10. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на оперативній нараді лікарів обласного патологоанатомічного бюро (протокол № 14 від 02.07.2019 року).

Відповідальний за впровадження:

Завідуючий організаційно-консультативним відділенням з гістологічними дослідженнями та архівом Вінницького обласного патологоанатомічного бюро А.А. Ніколюк.

Додаток А2



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтраломінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтраломінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Впроваджено:** у діагностичну роботу Державного патологоанатомічного центру України.
6. **Включено:** у практичну роботу Державного патологоанатомічного центру України при інтерпретації пухлинних процесів у передміхуровій залозі.
7. **Результати впровадження:** введено у роботу відділень патологоанатомічного центру
8. **Термін впровадження:** квітень-липень 2019 року.
9. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Державний патологоанатомічний центр України
10. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на нараді лікарів Державного патологоанатомічного центру України (протокол № 12 від 2.04.2019 року).

Відповідальний за впровадження:

Завідуючий відділення гістологічних досліджень
 Державного патологоанатомічного центру України

Д.П.Бевза

Додаток АЗ

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018, 3:100–105.
5. **Впроваджено:** у діагностичну роботу Одеського обласного патологоанатомічного бюро.
6. **Включено:** у практичну роботу Одеського обласного патологоанатомічного бюро при інтерпретації пухлинних процесів у передміхуровій залозі.
7. **Результати впровадження:** введено у роботу відділень патологоанатомічного бюро
8. **Термін впровадження:** квітень-липень 2019 року.
9. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Комунальна установа «Одеське обласне патологоанатомічне бюро».
10. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на нараді лікарів обласного патологоанатомічного бюро (протокол № 4 від 24.04.2019 року).

Відповідальний за впровадження:
 Зав. ПАВ Суворовського району

Матюшина Н.М.

Додакто А4



« 24 » квітня 20 19 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори** - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
- Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
- Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Впроваджено:** у діагностичну роботу Полтавського обласного патологоанатомічного бюро.
6. **Включено:** у практичну роботу відділення гістологічних досліджень Полтавського патологоанатомічного бюро, при інтерпритації пухлинних процесів у передміхуровій залозі.
7. **Результати впровадження:** введено у роботу відділень патологоанатомічного бюро.
8. **Термін впровадження:** січень-квітень 2019 року
9. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Полтавське обласне патологоанатомічне бюро.
10. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на нараді лікарів обласного патологоанатомічного бюро (протокол № 15 від 18.04. 2019 року).

Відповідальний за впровадження:

Заступник начальника Полтавського обласного патологоанатомічного бюро



Копиця В.М.

Додаток А5



ЗАТВЕРДЖУЮ
 начальник Чернівецької ОКМУ
 «Патологоанатомічне бюро»

[Signature]
 29 » 05 2019 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Впроваджено:** у діагностичну роботу патологоанатомічного бюро.
6. **Включено:** у практичну роботу патологоанатомічного бюро при інтерпретації пухлинних процесів у передміхуровій залозі.
7. **Результати впровадження:** введено у роботу відділень патологоанатомічного бюро
8. **Термін впровадження:** квітень-липень 2019 року.
9. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Обласна комунальна медична установа «Патологоанатомічне бюро», м. Чернівці.
10. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на нараді лікарів обласного патологоанатомічного бюро (протокол № 23 від 18.05.19 року).

Відповідальний за впровадження:

Завідувач відділення загальної патології № 1 з гістологічною лабораторією обласної комунальної медичної установи «Патологоанатомічне бюро»

[Signature]

Л.Ф. Жуков

Додаток А6



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Впроваджено:** у діагностичну роботу Чернігівського обласного патологоанатомічного бюро.
6. **Включено:** у практичну роботу Чернігівського обласного патологоанатомічного бюро при інтерпретації пухлинних процесів у передміхуровій залозі.
7. **Результати впровадження:** введено у роботу відділень патологоанатомічного бюро
8. **Термін впровадження:** квітень-липень 2019 року.
9. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Комунальний заклад «Чернігівське обласне патологоанатомічне бюро».
10. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на нараді лікарів КЗ «Чернігівське обласне патологоанатомічне бюро» (протокол №2 від 11.03.2019).

Відповідальний за впровадження:

В.о. завідувача відділення загальної патології
КЗ «Чернігівське обласне патолого-
анатомічне бюро»

П.В.Савенко

Додаток А7

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Включено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Результати впровадження:** введено у навчальний процес – матеріали лекцій та практичні заняття.
7. **Термін впровадження:** квітень-травень 2019 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету.
9. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії (протокол № 16 від 14.06.2019 року).

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри патологічної анатомії
Вищого державного навчального закладу України
«Буковинський державний медичний університет»
д.мед.н., професор

І.С. Давиденко

Додаток А8



1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Розроблювач:** Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії; Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії; Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
Джерело інформації: Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
- Базова установа, яка проводить впровадження:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра гістології.
4. **Результати застосування пропозиції** за період з квітня по травень 2019 р. Матеріали використовуються у навчальному процесі кафедри гістології на практичних заняттях.
5. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо особливостей гістологічних змін в тканині передміхурової залози, які виникають у хворих на рак передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями.
6. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.
7. **Затверджено** на засіданні кафедри від 04.04. 2019 (протокол № 9).

Відповідальний за впровадження: доц. Т.М. Кисельова

Завідувач кафедри гістології
 Вінницького національного
 медичного університету ім. М.І. Пирогова,
 доктор медичних наук, професор

С.В. Вернигородський

Додаток А9

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Пропозиції для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Ким і коли запропонований:** аспірант кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету А.М. Піддубний; д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету Р.А. Москаленко; д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії Сумського державного університету доцент А.М. Романюк, 2019 р.
3. **Джерела інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
4. **Впроваджено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри.
5. **Термін впровадження:** квітень-травень 2019 р.
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії і судової медицини Державного закладу «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».
7. **Форма впровадження:** в навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також в наукову роботу кафедри.
8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена та затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗУ» (протокол № 7 від 05 червня 2019 р.).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
і судової медицини ДЗ «ДМА МОЗУ»
к.м.н., доц.

О.А. Алексєєнко

« » _____ 2019 р.

Додаток А10

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної роботи

Запорізького державного медичного

університету, професор

Візір В.А.


2019 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Включено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Результати впровадження:** введено у навчальний процес – матеріали лекцій та практичні заняття.
7. **Термін впровадження:** квітень-травень 2019 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії і судової медицини Запорізького державного медичного університету.
9. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії і судової медицини (протокол № 26 від 20.03.2019 року).

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри патологічної анатомії
і судової медицини Запорізького державного
медичного університету д.мед.н., професор

 С.І. Тертишний

Додаток А11



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Включено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Результати впровадження:** введено у навчальний процес – матеріали лекцій та практичні заняття.
7. **Термін впровадження:** квітень-травень 2019 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії №1 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця
9. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії №1 (протокол № 17 від 4.04.19 року).

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри патологічної анатомії №1
Національного медичного
університету ім. О.О. Богомольця
д.мед.н., професор

Л.М. Захарцева

Додаток А12

«Затверджую»

Т.в.о. ректора
Одеського національного
медичного університету
д.мед.н., професор

« 16 квітня 2019 р. »



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції про впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтрапюмінальними включеннями».
2. **Ким і коли запропоновано,адреса закладу:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романок А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтрапюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100-105.
4. **Де та коли впроваджено:** введено у навчальний процес – матеріали лекцій та практичні заняття.
5. **Термі впровадження:** квітень-травень 2019 року.
6. **Ефективність впровадження:** введено у навчальний процес – матеріали лекцій та практичні заняття.
7. **Зауваження,пропозиції:** не вносилися
8. **Відповідальний за впровадження** Піддубний А.М

УЗГОДЖЕНО

В.о. проректора
з науково_педагогічної
роботи, д.мед.н.,
професор

Вастьянов Р.С.

УЗГОДЖЕНО

В.о. проректора
з науково_педагогічної
(учбово_методичної)роботи
д.мед.н., професор

Шмакова І.П.

Зав. кафедри патологічної анатомії
з секційним укр.ром, д.мед.н., професор

Ситнікова В.о.

Завідувач навчально-методичного
кабінету, д.мед.н., доцент

Чернецька О.В.

Додаток А13

ЗАТВЕРДЖУЮ
 Директор Медичного інституту СумДУ
 д-р мед. наук, доц. Лобода А.М.

« 06 »  20 19 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Включено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Результати впровадження:** введено у навчальний процес – матеріали лекцій та практичні заняття.
7. **Термін впровадження:** березень-квітень 2019 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії медичного інституту Сумського державного університету.
9. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії (протокол № 6 від 05 лютого 2019 року).

Відповідальний за впровадження:
 завідувач кафедри патологічної анатомії
 медичного інституту Сумського
 державного університету, д.мед.н., проф.

А.М. Романюк

Додаток А13



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** *«Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».*
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
5. **Включено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри.
6. **Результати впровадження:** введено у діагностичну – роботу імуногістохімічної лабораторії, матеріали лекцій та практичних занять.
7. **Термін впровадження:** квітень-травень 2019 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського.
9. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною (протокол № 05 від 03.04.19р.).

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри патологічної анатомії
з секційним курсом та судовою медициною
Тернопільського національного медичного
університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України
д.мед.н., професор

Я.Я. Боднар

Додаток А14

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Пропозиція до впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».

2. **Установа розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.

3. **Автори:**

- Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
- Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
- Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.

4. **Джерело інформації:** Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.

5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії з секційним курсом Української медичної стоматологічної академії (м. Полтава) МОЗ України.

6. **Форма впровадження:** В навчальний процес – в матеріали лекцій і практичних занять для студентів медичних факультетів, лікарів – інтернів, та в науково-дослідну роботу.

7. **Термін впровадження:** грудень 2018р – березень 2019р.

8. **Суть впровадження:** Матеріали роботи дозволяють враховуючи рівень експресії маркерів AP, p53, HSP 70 та MMP клітинами пухлин передміхурової залози визначати рівень злоякісності, прогнозувати їх клінічний перебіг та оптимізувати вибір лікувальної тактики.

Пропозиція для впровадження обговорена та затверджена на засіданні кафедри. Протокол засідання кафедри № 15 від 16 квітня 2019 р.

Завідувач кафедри патологічної анатомії з секційним курсом
Української медичної стоматологічної академії,
д.мед.н., професор

I.I. Старченко

Додаток А15



ЗАТВЕРДЖУЮ
 Проректор з наукової роботи
 Харківського національного
 медичного університету
 проф. В.В. М'ясоєдов
 « 02 » листопада 20 19 р.

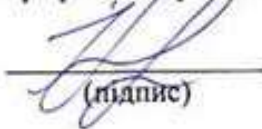
АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): Спосіб удосконалення діагностики раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями.
2. Ким і коли запропонований: аспірант кафедри патологічної анатомії СумДУ Піддубний А.М., д.мед.н., доцент кафедри патологічної анатомії СумДУ Москаленко Р.А., д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії СумДУ Романюк А.М. (Сумський державний університет МОН України, Медичний інститут, 40007, м. Суми, вул. Санаторна, 31).
3. Джерело інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. Art of medicine. 2018; 3:100–105.
4. Де і коли впроваджено: кафедра патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, 2019 р.
5. Результати застосування методу за період з 01.04.2019 р.–30.05.2019 р.: Впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Харківського національного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, клінічними ординаторами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3): Використання результатів роботи в навчальному процесі та науково-дослідній роботі дозволяє поглибити знання студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів і аспірантів щодо вдосконалення діагностики раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями.
7. Зауваження, пропозиції: немає.

Відповідальний(і) за впровадження
 в.о. завідувача кафедри
 патологічної анатомії ХНМУ


01.12.19
 (дата)

проф. І.В. Сорокіна


 (підпис)

Додаток А16

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з наукової роботи
Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна
доктор фізико-математичних наук,
професор В. О. Катрич
«25» листопада 2018 р.


АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями».
2. **Установа-розробник:** медичний інститут Сумського державного університету, кафедра патологічної анатомії.
3. **Автори:**
 - Піддубний А.М. – аспірант кафедри патологічної анатомії;
 - Москаленко Р.А. – д.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії;
 - Романюк А.М. – д.мед.н., професор, зав. кафедри патологічної анатомії.
4. **Джерело інформації:** Піддубний А. М., Москаленко Р. А., Романюк А. М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями // Art of medicine. – 2018. – №3. – С. 100–105.
5. **Включено:** у навчальний процес та наукову роботу кафедри загальної та клінічної патології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.
6. **Результати впровадження:** впровадження у навчальний процес на кафедрі загальної та клінічної патології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
7. **Термін впровадження:** квітень-травень 2019 року.
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра загальної та клінічної патології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.
9. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри загальної та клінічної патології (протокол № 9 від 24 квітня 2019 року).

Відповідальний(і) за впровадження

Завідувач кафедри
загальної та клінічної патології
Харківського національного
університету імені В. Н. Каразіна
д. мед. н., професор

 О. С. Проценко

Додаток Б



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119070** (13) **U**
(51) МПК
C12N 15/10 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 02817	(72) Винахідник(и): Москаленко Роман Андрійович (UA), Піддубний Артем Михайлович (UA), Романюк Анатолій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.03.2017	(73) Власник(и): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.09.2017	
(46) Публікація відомостей про видану патенту: 11.09.2017, Бюл.№ 17	

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ІНТРАЛЮМІНАЛЬНИХ ВКЛЮЧЕНЬ ЗАЛОЗ ПРОСТАТИ З ПАРАФІНОВИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ БЛОКІВ**(57) Реферат:**

Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати, який включає відбір біологічного матеріалу, інкубацію у фосфатному буфері та відокремлення цільового продукту, причому відбір біологічного матеріалу виконують шляхом одержання із парафінового блока тканин простати на мікротомі гістологічних зрізів тканин, які потім підготовлюють гістологічним методом, переносять їх на предметне скельце та здійснюють депарафінізацію при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту, при цьому предметне скельце з гістологічними зрізами тканин простати витримують два рази у ксилолі протягом 5 хвилин, після чого проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки і двократну промивку зрізів у 70 % етиловому спирті протягом 2 хвилин, потім занурюють у порцію дистильованої води 2 рази впродовж 2 хвилин, після цього предметні скельця з гістологічними зрізами інкубують впродовж 10 хвилин у фосфатному буфері, а потім за допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу простати від предметного скельця, а вміст залоз простати, який залишається на предметному скельці, збирають за допомогою стерильного скальпеля в пробірку.

UA 119070 U

UA 119070 U

Корисна модель належить до галузі медицини та біології, а саме до патологічної анатомії, урології, патологічної фізіології, гістології та може бути використана для аналізу білків за допомогою мас-спектрометрії, вестерн-блоту та дот-блоту, вивчення структури включень за допомогою скануючої, просвічуючої електронної та атомної силової мікроскопії.

5 Відомий спосіб виділення зразків інтралюмінального вмісту залоз простати для проведення експериментальних та клінічних досліджень, який включає послідовно проведені стадії, а саме розрізання і макроскопічне дослідження простати, виділення з протокової системи залоз видимих простатолітів та амілоїдних тілець за допомогою стерильних пінцетів або щипців, переміщення простатолітів та амілоїдних тілець у ємність з стерильним фосфатним буфером, проціджування зазначеного розчину через нейлоновий сітчастий фільтр для збору простатичних включень (див. статтю Sfanos et al. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amyloacea and calculi in men with prostate cancer. PNAS. 2009; 106 (9):3443-48).

Даний спосіб є найбільш близьким по суті та результатам, які досягаються, тому його обрано за прототип.

15 Однак недоліком прототипу є те, що за допомогою цього способу можливо дослідження лише великих простатолітів і амілоїдних тілець простати та лише під час макроскопічного дослідження.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу виділення інтралюмінальних включень залоз простати, таких як простатоліти, амілоїдні тілця з парафінових гістологічних блоків шляхом відмінностей при заборі матеріалу та виділення вмісту залоз, що дозволяє досліджувати дрібні об'єкти, ефективно виділяти білок для дослідження, виконувати дослідження в будь-який зручний час впродовж тривалого часового проміжку (відповідає часу зберігання парафінових блоків).

25 Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі виділення інтралюмінальних включень простати, який включає відбір біологічного матеріалу, інкубацію у фосфатному буфері та виділення цільового продукту, згідно з корисною моделлю, відбір біологічного матеріалу виконують шляхом одержання із парафінового блока тканин простати на мікромомі гістологічних зрізів тканин, які потім підготовлюють гістологічним методом, переносять на предметні скельця та здійснюють депарафінізацію при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту, при цьому предметні скельця з гістологічними зрізами тканин простати витримують два рази у ксилолі протягом 5 хвилин, після чого проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки і двократну промивку зрізів у 70 % етиловому спирті протягом 2 хвилин, потім занурюють у порцію дистильованої води 2 рази впродовж 2 хвилин, після чого предметні скельця з гістологічними зрізами інкубують впродовж 10 хвилин у фосфатному буфері, а потім за допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу від предметного скельця, а вміст залоз простати, який залишається на предметному скельці, збирають за допомогою стерильного скальпеля у пробірку.

35 Використання заявлюваного способу з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє досліджувати дрібні об'єкти, ефективно виділяти білок для широкого спектру досліджень із включень просвіту залоз простати впродовж всього часу зберігання парафінового блока тканини.

45 Запропонований спосіб є детальним та точним, дозволяє отримати якісні біологічні зразки для мас-спектрометрії, вестерн-блоту та дот-блоту, скануючої, просвічуючої електронної та атомної силової мікроскопії. Отримані на мікромомі гістологічні зрізи дають можливість проаналізувати банк зразків парафінових блоків тканин з архівів патологоанатомічних відділень і бюро та вибірково досліджувати інтралюмінальний вміст залоз простати впродовж тривалого часу спостереження, особливо у випадку злоякісних пухлин, парафінові блоки яких зберігаються 25 років. Виділення інтралюмінальних включень простати завжди здійснюється після стандартного гістологічного дослідження, тому дослідник вже точно знає про наявність у гістологічних зрізах матеріалу для виділення. Депарафінізація гістологічних зрізів дозволяє видалити парафін з тканин, відмивання у дистильованій воді та фосфатному буфері сприяє очищенню гістологічних зрізів від домішок і дрібного сміття. Інкубація гістологічних зрізів у фосфатному буфері сприяє легкому відокремленню тканини від предметного скельця. Проведення всіх маніпуляцій на предметному скельці значно полегшує збір матеріалу до пробірки. Всі зазначені маніпуляції дозволяють отримати досліджуваний матеріал з низьким відсотком втрат та механічного ушкодження.

Спосіб здійснюється таким чином.

60 Приклад. Відбір біологічного матеріалу проводиться з вибраних парафінових гістологічних блоків тканин простати людини, в яких після гістологічного дослідження уже виявлені

UA 119070 U

інтралюмінальні вклучення. Для дослідження були відібрані 40 парафінових блоків, які зберігалися в архіві філії Сумського патологоанатомічного бюро впродовж 1-2 років. З кожного парафінового блока на мікротомі було отримано 3-4 зрізи товщиною 10-15 мкм, які були перенесені на предметне скельце.

- 5 Проводять депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки зрізів тканин від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту. Гістологічні зрізи тканини простати на предметному скельці витримують у ксилолі (100 мл) протягом 5 хвилин два рази. Після проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом (100 мл) впродовж 10 хвилин для кожної промивки, потім 70 % етиловим спиртом (100 мл) впродовж 2 хвилин 2 рази, потім занурюють у порцію дистильованої води (100 мл) впродовж 2 хвилин 2 рази. Після цього предметні скельця з гістологічними зразками інкубують впродовж 10 хв. у фосфатному буфері (100 мл).

- 10 За допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу тканини простати від предметного скельця, а вміст залоз простати, які залишаються на предметному скельці збирають за допомогою стерильного скальпеля в пробірку типу "Еппендорф" для подальших досліджень.

- 15 Таким чином, спосіб дозволяє досліджувати дрібні об'єкти, ефективно виділяти білок для широкого спектра досліджень із вклучень просвіту залоз простати впродовж всього часу зберігання парафінового блока тканини, є детальним і точним, дозволяє отримувати якісні біологічні зразки для мас-спектрометрії, вестерн-блоту та дот-блоту, скануючої, просвічуючої електронної та атомної силової мікроскопії.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 25 Спосіб виділення інтралюмінальних вклучень залоз простати, який включає відбір біологічного матеріалу, інкубацію у фосфатному буфері та відокремлення цільового продукту, який відрізняється тим, що відбір біологічного матеріалу виконують шляхом одержання із парафінового блока тканин простати на мікротомі гістологічних зрізів тканин, які потім підготовлюють гістологічним методом, переносять їх на предметне скельце та здійснюють
- 30 депарафінізацію при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту, при цьому предметне скельце з гістологічними зрізами тканин простати витримують два рази у ксилолі протягом 5 хвилин, після чого проводять двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом впродовж 10 хвилин для кожної промивки і двократну промивку зрізів у 70 % етиловому спирті протягом 2 хвилин, потім
- 35 занурюють у порцію дистильованої води 2 рази впродовж 2 хвилин, після цього предметні скельця з гістологічними зрізами інкубують впродовж 10 хвилин у фосфатному буфері, а потім за допомогою тонкого пінцета здійснюють відокремлення гістологічного зрізу простати від предметного скельця, а вміст залоз простати, який залишається на предметному скельці, збирають за допомогою стерильного скальпеля в пробірку.
- 40

Комп'ютерна верстка Л. Цванювська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

Додаток В

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Piddubnyi A., Danylchenko S., Romaniuk A., Moskalenko R. Prostatic calculi cause osteoblastic immunophenotype of prostate cancer. *Патологія*. 2019. Vol. 16, № 2(46). P. 170–176. (Дисертант провів морфологічне, імуногістохімічне дослідження, аналіз результатів, сформулював висновки, підготував статтю).
2. Prostate Cancer with Intraluminal Inclusions: the Association of the Immunophenotype with Grade Score / A. Piddubnyi [et al.]. *Iranian Journal of Pathology*. 2019. Vol.14, No.3. P. 212–222. (Дисертантом розроблений дизайн дослідження, проведені імуногістохімічні дослідження, статистична обробка результатів та їхній аналіз, сформульовані висновки).
3. Piddubnyi A., R. Moskalenko. Molecular aspects of the bone metastases development in prostate cancer. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2019. Vol. 7, №2. P. 96–108. (Дисертант провів пошук, аналіз та узагальнення літератури).
4. Піддубний А.М. Порівняльний аналіз впливу простатолітів та corpora amylacea на імунофенотип раку передміхурової залози. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. Вінниця, 2019. №1. С. 64–69.
5. Піддубний А.М., Москаленко Р.А., Романюк А.М. Імуногістохімічна характеристика тканини раку передміхурової залози з інтралюмінальними включеннями. *Art of medicine*. 2018. №3. С. 100–105. (Дисертант провів гістологічне вивчення препаратів та імуногістохімічне дослідження, опрацював отримані результати, сформульовані висновки, підготовлена стаття до друку).
6. Multifocal primary tumour with lesions in prostate gland and urinary bladder: clinical case / A. Romaniuk [et al.]. *Bangladesh Journal of Medical Science*. 2017. Vol. 16, No 1. P. 161–165. (Дисертантом проведено препаратів, аналізовані результати, сформульовані висновки).
7. Романюк А.М., Москаленко Р.А., Піддубний А.М., Сікора В.В. Аналіз захворюваності на злоякісні пухлини передміхурової залози в Сумській

області. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип.2, Т.1 (128). С. 94–97. (Дисертантом проведений пошук та статистичний аналіз епідеміологічних показників захворюваності на рак передміхурової залози).

8. The effect of prostatic stones on the immunophenotype of prostate cancer cells / A. Piddubnyi [et al.]. *Medicina: 77th International Scientific Conference of the University of Latvia* (Riga, Latvia, 22 February 2019). Riga, 2019. Vol. 55, Supplement 1. P. 95. (Дисертантом проведена практична частина дослідження, проаналізовані отримані результати, сформульовані висновки).

9. Osteonectin overexpression in the case of prostate cancer with intraluminal inclusions / A. Piddubnyi [et al.]. *Virchows Archiv*. 2018. № 473. P. S45. (Дисертантом створений дизайн дослідження, проведене гістологічне та імуногістохімічне вивчення зразків, аналізовані дані, сформульовані висновки).

10. Hsp 90 overexpression in chronic bacterial prostatitis with corpora amylacea / A. Piddubnyi [et al.]. *Virchows Arch*. 2017. Vol. 471, Suppl. 1. P. S267–268. (Дисертантом виконане морфологічне та гістохімічне дослідження зразків, аналізовані дані, сформульовані висновки).

11. Prostate cancer leads to a change in the composition of tissue carbohydrates / A. Romaniuk [et al.]. *Virchows Arch*. 2019. Vol. 475, Suppl. 1. P. S.25. (Дисертантом сформульовано схему дослідження, проведене гістохімічне дослідження та інтерпретація результатів, сформульовані висновки).

12. Піддубний А.М. Аналіз захворюваності на рак передміхурової залози серед населення Сумської області. *Актуальні питання теоретичної та практичної медицини* : зб. тез доп. V міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених (м. Суми, 21-22 квітня 2016 р.). Суми, 2016. С. 137.

13. Спосіб виділення інтралюмінальних включень залоз простати з парафінових гістологічних блоків: пат. 41235 Україна, МПК51, G01N 1/28, № u201702817; заявл. 27.03.2017; опубл. 11.09.2017, Бюл. №17. 4 с. (Дисертантом розроблено базовий концепт, проведені експерименти, сформульовано заявку на патент).

Додаток Г

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 29-й Конгрес Європейського товариства патологів, м. Амстердам, Нідерланди, 2-6 вересня 2017 року – стендова доповідь, публікація тез.
2. 30-й Конгрес Європейського товариства патологів, м. Більбао, Іспанія, 8-12 вересня 2018 року – усна доповідь, публікація тез.
3. 31-й Конгрес Європейського товариства патологів, м. Ніца, Франція, 7-11 вересня 2019 року – стендова доповідь, публікація тез.
4. 77-ма Міжнародна наукова конференція Університету Латвії, м. Рига, Латвія, 22 лютого 2019 року – публікація тез.
5. Семінар кафедри медичної біохімії та біофізики Університету Умео (Умео, Швеція), 21 березня 2019 року – усна доповідь.
6. Міжнародна науково-практична конференція студентів та молодих учених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини», Сумський державний університет, м. Суми, 21-22 квітня 2016 року – усна доповідь, публікація тез.
7. Дисертаційну роботу заслухано на міжкафедральному семінарі Медичного інституту СумДУ 26 червня 2019 року (протокол № 6).