

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів  
Кафедра біохімії та біотехнології**

**Біохімічні маркери диференційної діагностики доброякісних  
і злоякісних новоутворень передміхурової залози у чоловіків**

**Дипломна робота  
освітнього рівня «Бакалавр»**

Виконала: студентка IV курсу, групи \_\_\_\_\_  
напряму підготовки 091.6 – «Біологія»

**Сернецька М. С.**

Керівник: к.б.н., доцент Кеца О.В.

До захисту допущено:  
Протокол засідання кафедри № \_\_\_\_\_  
від „\_\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2023 р.

зав. кафедри \_\_\_\_\_ проф. Копильчук Г.П.

## АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена вивченню у плазмі крові змін рівня простатоспецифічного антигену та рівнів тестостерону та дигідротестостерону в чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози.

Встановлено, що у чоловіків з простатитом, доброякісними та злоякісними новоутвореннями передміхурової залози спостерігається підвищення рівня простатоспецифічного антигена з максимальними показниками у пацієнтів з раком передміхурової залози (РПЗ).

Показано, що рівні тестостерону та дигідротестостерону в плазмі крові у чоловіків з простатитом та аденомою простати суттєво нижче показників норми з мінімальними значеннями у пацієнтів при розвитку аденоми. Розвиток у чоловіків злоякісного новоутворення передміхурової залози супроводжується підвищенням рівнів загального тестостерону та дигідротестостерону у плазмі крові. По мірі розвитку злоякісності новоутворення підвищується відношення тестостерон-дигідротестостерон.

*Ключові слова:* простатоспецифічний антиген, тестостерон, дигідротестостерон, новоутворення, передміхурова залоза.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ</b>	4
<b>ВСТУП</b>	5
<b>1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	7
1.1. Патофізіологічні механізми виникнення аденоми передміхурової залози та простатиту	7
1.2. Простатоспецифічний антиген як маркер стану передміхурової залози	10
1.3. Роль чоловічих статевих гормонів у розвитку патологій передміхурової залози	13
<b>2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	16
2.1. Об'єкт та методи досліджень	16
<b>3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ</b>	24
<b>ВИСНОВКИ</b>	32
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	33
<b>ДОДАТКИ</b>	37

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ ТА ПОЗНАЧЕНЬ

ДГПЗ – доброякісна гіперплазія передміхурової залози

ДГТ – дигідротестостерон

ПСА – простатоспецифічний антиген

ПСА-АМГ – простатоспецифічний антиген -  $\alpha$ 2-макроглобулін

ПСА-АХТ – простатоспецифічний антиген -  $\alpha$ 1-антихімотрипсин

РПЗ – рак передміхурової залози

## ВСТУП

Простата – фіброзно-м'язовий залозистий орган, що охоплює передміхурову частину уретри. Має пірамідальну форму. До найпоширеніших захворювань передміхурової залози сьогодні належать аденома, простатит, рак передміхурової залози (РПЗ), туберкульоз передміхурової залози і камені передміхурової залози [1].

Запальні захворювання, зокрема простатит, а також доброякісна гіперплазія суттєво впливають на здоров'я, працездатність та загальний психоемоційний стан чоловіків. Сьогодні показники поширеності цих патологій постійно зростають у зв'язку із збільшенням середньої тривалості життя та відсотка чоловіків старших вікових груп. небезпека цих патологій ще й полягає в тому, що вони можуть бути причиною розвитку РПЗ у майбутньому, що вимагає ранньої діагностики цих патологій [2].

Доброякісна гіперплазія простати – одне з найпоширеніших захворювань сечостатевої системи в чоловіків. Розвиток аденоми простати негативно позначається на фертильності й еректильній функції у чоловіків. За статистикою на доброякісну гіперплазію передміхурової залози (ДГПЗ) (зокрема аденоми) та хронічний простатит хворіє більше половини чоловіків від 45 років. У зв'язку з цим виявлення маркерів ранньої діагностики цих патологій дозволить їх диференціювати на ранніх стадіях розвитку, що є досить актуальною проблемою сьогодення [3].

Патогенетичні причини розвитку цієї патології мають тісний зв'язок зі змінами гормонального спектру чоловічих статевих гормонів. Порушення гормонального фону та розвиток простатиту або аденоми простати спостерігається при віковому андрогенному дефіциті, який поєднують із захворюваннями передміхурової залози з частотою до 68,7 % [4]. Гормональна дисфункція у зв'язку з віковим андрогенодефіцитом суттєво впливає на мікроциркуляцію. Мікроциркуляція – один із провідних патогенетичних чинників розвитку простатиту. Окрім того, існує думка, що розвиток аденоми простати можна віднести до системного гормонально-

метаболічного захворювання. Проте досі залишається доволі дискусійним питанням пошук біохімічних маркерів ранньої діагностики простатиту, аденоми простати, які можуть бути причиною розвитку РПЗ [3].

Одним із маркерів діагностики новоутворень передміхурової залози залишається простатоспецифічний антиген (ПСА), проте відкритими залишаються питання зміни його концентрації при різних захворюваннях передміхурової залози, як і визначення гормонального дисбалансу чоловічих статевих гормонів [5].

Враховуючи вище вказане *метою роботи* було визначити рівень простатоспецифічного антигену та андрогенів у плазмі крові чоловіків із патологіями передміхурової залози.

У зв'язку з цим поставлені наступні *завдання*:

1. Визначити рівень простатоспецифічного антигену в плазмі крові чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози.

2. Оцінити зміни рівня вільного та зв'язаного тестостерону в плазмі крові чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози.

3. Дослідити рівень дигідротестостерону (ДГТ) та співвідношення тестостерон/ДГТ в плазмі крові чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Патофізіологічні механізми виникнення аденоми передміхурової залози та простатиту

Передміхурова залоза (prostata) являє собою непарний залозисто-м'язовий орган, який розташований у малому тазі між сечостатевою діафрагмою та дном сечового міхура [1]. За формою її порівнюють із каштановим горіхом або усіченим конусом. Вона має основу і верхівку, передню та задню поверхні та бічні сторони. Передньою своєю поверхнею (facies anterior) передміхурова залоза спрямована в бік лобкового симфізу (symphysis ossium pubis) і фіксована до лобкових кісток за допомогою парної лобково-передміхурової зв'язки (lig.puboprostaticum). Задня поверхня залози прилягає до передньої стінки прямої кишки, від якої відокремлюється фасціальною перегородкою. Ясно виражена на задній поверхні вертикальна борозна або вирізка (incisura prostatica) ділить передміхурову залозу на частки – праву (lobus dexter) і ліву (lobus sinister). Обернена вгору основа передміхурової залози зрощена з шийкою міхура (рис.1.1) [6].



Рис.1.1. Анатомічна будова передміхурової залози

Кровообіг передміхурової залози досить інтенсивне. Основними є нижні міхурові артерії, а також *aa. rectales mediae*. Венозний відтік здійснюється в *plexus venosus vesicoprostaticus* [6].

Різні секрети передміхурової залози містять кислу фосфатазу, фібринолізин, лимонну кислоту, амілазу, ПСА і простагландини. Більша частина насінної рідини утворюється її секретами. Жіночим гомологом передміхурової уретри є парауретральні залози.

Досить частим захворюванням серед чоловіків, які досягли літнього і навіть середнього віку є аденома передміхурової залози (парауретральних залоз) [7].

Аденома виникає не з тканини передміхурової залози, а з парауретральних залоз. Ці залози мають окремі і не завжди постійні групи міжслизової та м'язової оболонок уретри, які тягнуться від шийки сечового міхура до насінневого горбка. В даний час доведено, що ріст, аденоми починається саме з парауретральних залоз передміхурової частини сечівника. У міру росту новоутворення воно відтісняє тканину передміхурової залози до периферії, здавлює її, порушує кровообіг і вона атрофується. У кінцевому результаті передміхурова залоза настільки витончується, що з неї утворюється так звана хірургічна капсула [8].

Найбільш прийнятною концепцією походження аденоми парауретральних залоз є настання «чоловічого клімаксу», при якому спостерігається згасання інкреторної функції яєчок, що призводить до переважання естрогенів над андрогенами. Зважаючи на існуючий механізм зворотного зв'язку між яєчками, наднирниками і гіпофізом згасання діяльності яєчок призводить до підвищення вироблення гонадотропного гормону передньою часткою гіпофіза. Останній стимулює розростання парауретральних залоз та утворення аденоми [9].

Розростання залоз, що розташовуються навколо передміхурової частини уретри або парауретральних залоз, відбувається неоднаково за часом. Спостереження показують, що в деяких хворих це розростання

відбувається повільно і триває кілька десятків років. У інших ріст відбувається дуже швидко, і аденома може досягти значних розмірів вже в перший рік початку захворювання. У міру росту аденоматозних парауретральних залоз тканина найпередовішої залози здавлюється і поступово відтісняється до периферії. При цьому порушується її кровопостачання, і вона зазнає атрофії, перетворюючись на хірургічну капсулу. Слід зазначити, що її товщина не скрізь однакова і коливається від декількох міліметрів до 1 см [8].

Залежно від переважання тієї чи іншої тканини гістологічно розрізняють залозисту (аденому), фіброзну (фіброаденому), міоматозну (аденоміому) та змішані форми. Найчастіше спостерігається аденоматозна та фіброаденоматозна форми аденоми парауретральних залоз. Аденома частіше складається з 2 часток, має кулясту форму, а при ректальному дослідженні згладжену борозенку, гладку поверхню і плотноеластичну консистенцію. Сечівник при цьому розташовується в її центрі [10].

Аденому парауретральних залоз необхідно диференціювати від низки захворювань, які теж викликають розлад сечовипускання. Сюди відносяться хронічний простатит, РПЗ, склероз передміхурової залози, стриктура уретри, камені сечового міхура, нейрогенний сечовий міхур [11].

Основною проблемою в диференційній діагностиці аденоми простати є вибір маркера, який би дозволив на ранніх стадіях розрізнити цю патологію від простатиту [12].

Запалення простати сьогодні є лідером у групі чоловічих захворювань, що передаються переважно статевим шляхом. Його ускладнення загрожує безпліддям, зниженням лібідо, імпотенцією. Симптомами простатиту є не просто болючі відчуття, але й розлади сечовипускання, запалення насіннєвого канатика тощо [13].

В основі розвитку простатиту лежить розвиток інфекційного процесу різного походження. Збудники простатиту проникають у тканини

передміхурової залози, в основному, через сечовипускальний канал, або струмом крові або лімфи з інших вогнищ запалення [14].

Найхарактернішими скаргами при простатиті є тупий біль в ділянці промежини, паха, який іноді віддає в крижі та статеві органи. Іноді можуть відзначатися помилкові позиви з боку сечостатевої системи та може бути відчуття неповного випорожнення сечового міхура або утруднене сечовипускання [15].

Простатит – запальний процес, який схильний до хронічного перебігу. Ремісія нерідко спостерігається у весняно-літній період, тоді як в осінньо-зимовий період часто виникає загострення. При загостренні може підвищуватися температура, посилюватися больовий синдром, можуть з'являтися інші симптоми запалення [16].

Найнебезпечнішим наслідком запущеного запалення може стати ракове переродження передміхурової залози. Тоді як вчасно діагностований патологічний процес легко усувається [13].

Отже, актуальним залишається пошук біохімічних маркерів, які би на ранній стадії дозволили диференціювати аденому простати від простатиту.

## **1.2. Простатоспецифічний антиген як маркер стану передміхурової залози**

ПСА – це глікопротеїн з протеазною активністю, що утворюється в клітинах епітелію передміхурової залози і виділяється в насінну рідину, забезпечуючи розрідження сперми. У кровотоку наявний у малих кількостях та може бути представлений як у вільній формі (вільний ПСА) так і у зв'язаній формі: з  $\alpha$ 1-антихімотрипсином (ПСА-АХТ) та  $\alpha$ 2-макроглобуліном (ПСА-АМГ). Близько 85% циркулюючого ПСА представлені ПСА-АХТ комплексом, невелика частка ПСА це зв'язаний з  $\alpha$ 2-макроглобуліном, і в ході лабораторного тестування не визначається. Тому рівень загального ПСА, що досліджується, є сумою вільного ПСА і комплексу ПСА-АХТ. З віком

кількість загального ПСА збільшується, а відсоток вільного ПСА знижується [17].

ПСА є специфічним маркером тканини простати, збільшення кількості відзначається при будь-яких процесах: запальних, доброякісних, злоякісних, травмах, діагностичних та лікувальних маніпуляціях. Тому важливо проводити визначення рівня будь-яких маніпуляцій у ділянці передміхурової залози: підвищення спостерігається після біопсії та зберігається 2-3 тижні, трануретальне УЗД, масаж простати, ректального пальцевого обстеження. Короткочасне збільшення викликає еякуляція (нормалізація рівня відбувається протягом 48 годин) [13].

У пацієнтів, які страждають на РПЗ, спостерігається зниження відсоткового вмісту вільної фракції ПСА порівняно з пацієнтами з ДГПЗ. Було запропоновано використовувати цей показник для диференційної діагностики доброякісних та злоякісних захворювань (розрахунковий показник – відсоток вільного ПСА). Проводиться визначення рівнів загального та вільного ПСА в одній пробі та розраховується математичне співвідношення рівня вільного ПСА до загального ПСА  $\times 100$  %. Співвідношення форм ПСА при РПЗ: 90% ПСА-АХТ, 10% ПСА вільний. Даний показник особливо необхідний у ситуаціях підвищення ПСА не більше 10 нг/мл, коли висока ймовірність підвищення обумовленого доброякісними або запальними процесами в передміхуровій залозі: при значеннях більше 25% можна говорити про доброякісний процес, при значеннях менше 15% – як додатковий маркер злоякісного процесу [18].

Міжнародні рекомендації щодо раннього виявлення раку простати включають щорічне тестування загального ПСА у поєднанні з обстеженням простати (ректальне пальцеве дослідження) у чоловіків старше 50 років з помірним ризиком. Скринінг у молодшому віці (40-45 років) показаний у випадках з обтяженим сімейним анамнезом (РПЗ у родичів першої лінії). Хоча ПСА є найкращим лабораторним тестом для виявлення доброякісних та злоякісних пухлин, відкритим залишається його значення при простатиті та

аденомі, що допоможе диференціювати ці захворювання [19]. Часто ці результати інтерпретуються разом з клінічними даними, отриманими за допомогою фізикального обстеження (пальцевого ректального обстеження). Виявлення підвищеного рівня загального ПСА має супроводжуватися визначенням відсотка вільного ПСА для можливості диференціювати доброякісні та запальні процеси у передміхуровій залозі [16].

Таким чином, ПСА являє собою мономерний глікопротеїн – серинову протеазу з хімотрипсинподібною специфічністю з молекулярною масою біля 32 кДа, що секретується епітеліальними клітинами передміхурової залози. ПСА в нормі виділяється в насінну рідину, виконуючи функцію розщеплення білків, присутніх у насінневих бульбашках і розрідження еякуляту, що коагулював. Тільки низькі концентрації ПСА присутні в нормі у кров'яному руслі [20]. Підвищення рівня ПСА у сироватці є індикатором патології простати, включаючи доброякісну гіперплазію та рак простати. Визначення ПСА тепер широко використовується для скринінгу та моніторингу пацієнтів з РПЗ і є найкращим серологічним маркером для визначення цього виду раку. ПСА знаходиться у формі стабільних комплексів з різними антагоністами протеаз, у сироватці переважно в комплексі ПСА-АХТ. Є великі варіації у різних індивідуумів у співвідношенні між вільним ПСА та ПСА-АХТ комплексом. Дослідження показали, що частка вільного ПСА вища при доброякісних захворюваннях, ніж при раку [18].

Отже, найбільша діагностична значимість визначення рівня загального ПСА для прогнозу ефективності лікування (визначення до початку лікування), моніторингу лікування (зниження до невизначеного рівня у пацієнтів із віддаленою передміхуровою залозою), контроль рецидиву та метастазів (підвищується за 6-18 місяців до клінічних проявів).

### 1.3. Роль чоловічих статевих гормонів у розвитку патологій передміхурової залози

Чоловічі статеві гормони – це андрогени, які належать до похідних андростану (C<sub>19</sub>-стероїди). Основний андроген вважається тестостерон, який в чоловічому організмі синтезується в клітинах Лейдига – інтерстиціальних клітинах сім'яників. У нормі за добу в чоловіків секретується 5 мг тестостерону (рис.1.2) [21].

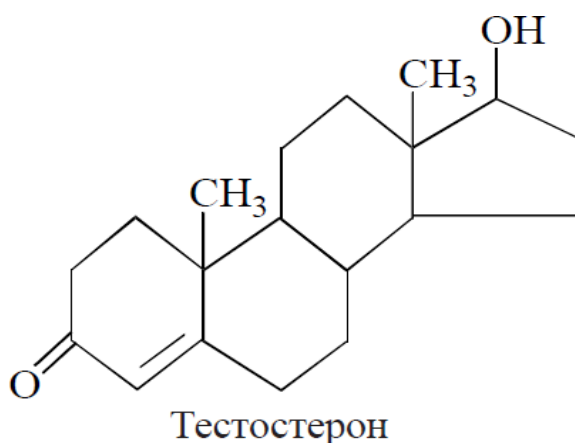
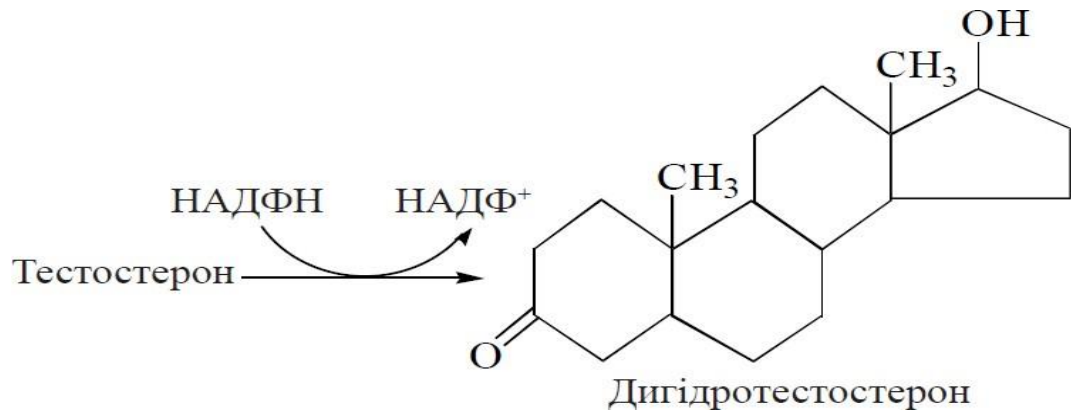


Рис.1.2. Структура тестостерону

У клітинах-мішенях тестостерон може конвертуватися в активніший метаболіт – дигідротестостерон (ДГТ). Тому, вважається, що для ДГТ тестостерон є, по суті, прогормоном. Локалізація ДГТ спостерігається в сім'яних везикулах, у передміхуровій залозі, а також у зовнішніх статевих органах та в деяких ділянках шкіри [22].

В організмі здійснюється перетворення тестостерону на ДГТ, яке каталізується ензимом НАДФН-залежною 5- $\alpha$ -редуктазою (рис.1.3) [23].



**Рис.1.3. Утворення дигідротестостерону в організмі**

Біоперетворення тестостерону здійснюється в печінці та інших тканинах організму, яке супроводжується утворенням метаболітів. Утворені метаболіти володіють значно меншою андрогенною активністю або така активність відсутня взагалі. Основними продуктами такого перетворення тестостерону в організмі є 17-кето- (або 17-оксо) стероїди – етіохоланолон та андростерон [24].

Біологічна роль тестостерону полягає в забезпеченні репродуктивних функцій чоловічого організму, оскільки цей гормон контролює сперматогенез та стимулює розвиток в пубертатний період як первинних, так і вторинних статевих ознак. Окрім того, ще однією особливістю біохімічної дії андрогенів у організмі (тестостерону та його похідних, а також синтетичних андрогенів) є суттєвий анаболічний ефект. Вказаний ефект виражається у стимуляції синтезу протеїнів у багатьох тканинах організму. Особливо це стосується м'язів. Ці властивості андрогенів враховують при виробництві синтетичних анаболічних препаратів [25].

Фізіологічні функції чоловічих статевих залоз контролюються гонадотропними гормонами – фолікулостимулюючим гормоном (ФСГ) та лютеїнізуючим гормоном (ЛГ). ФСГ сприяє стимуляції сперматогенного епітелію яєчок, тоді як ЛГ активує синтез та секрецію тестостерону. ЛГ належить до гормонів, що стимулюють інтерстиціальні клітини [26].

Концентрація сироваткового тестостерону циклічно змінюється протягом доби з максимальними значеннями о 7-9-й годинах ранку та мінімумом о 24-3 годинах ночі [24].

Молекулярні механізми дії чоловічих статевих гормонів полягають у взаємодії андрогенів у клітинах-мішенях із специфічним клітинним цитозольним рецептором. Після взаємодії відбувається транслокація комплексу стероїд-рецептор у ядро, де гормони стимулюють експресію генів, які контролюють синтез протеїнів. Через синтезовані протеїни реалізується фізіологічна функція того чи іншого гормону [27].

Зміни гормонального статусу в чоловіків можуть бути причиною розвитку патологічних процесів у передміхуровій залозі. Так, у етіології багатьох захворювань, що призводять до порушення статевої функції, сечовипускання і больових відчуттів у чоловіків, значну роль відіграє підвищення синтезу ДГТ. Цей гормон спричинює ріст тканини передміхурової залози через зв'язування з цитоплазматичними рецепторами для андрогенів. ДГТ утворюється з тестостерону не тільки через активацію ензиму 5- $\alpha$ -редуктази, а також через активацію  $\alpha$ -адренорецепторів. У результаті цього збільшується концентрація іонів кальцію всередині клітин, а це, у свою чергу, призводить до скорочення гладких м'язів [28].

Отже, визначення гормонального фону в чоловіків може передбачити розвиток новоутворень на ранніх стадіях.

## 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Об'єкт та методи досліджень

У роботі було проведено аналіз лабораторних результатів 24 пацієнтів чоловічої статі віком від 55 до 65 років, яким було діагностовано захворювання передміхурової залози.

Всіх пацієнтів із досліджуваними патологіями розділили на три групи:

I група – 10 пацієнтів із запаленням передміхурової залози (простатит) різного ступеня інтенсивності;

II група – 8 хворих з доброякісними новоутвореннями передміхурової залози (аденома передміхурової залози);

III група – 6 хворих із злоякісними новоутвореннями передміхурової залози (РПЗ).

Під час діагностики новоутворення простати проводили пальцеве дослідження передміхурової залози через пряму кишку з метою визначення розміру та форми органа. Діагностика могла включати УЗД простати (інформативнішим є трансректальне УЗД).

При новоутвореннях простати призначалися такі аналізи: загальний аналіз сечі (для перевірки наявності інфекції сечового міхура), аналіз крові на рівень ПСА, який проводили до огляду уролога та УЗД. Цей антиген переважно виробляється клітинами простати. ПСА можна використовувати в діагностиці як аденоми, так і раку простати. У чоловіків ПСА може слугувати маркером ранньої діагностики виду онкологічного захворювання передміхурової залози.

Діагноз простатиту визначався на підставі анамнезу, скарг, результатів лабораторних тестів та біохімічних показників дослідження крові, сперми і секрету простати. Для уточнення діагнозу пацієнтам могли призначати уретероскопію або УЗД передміхурової залози.

Усі пацієнти перебували на диспансерному обліку з приводу захворювань передміхурової залози. За аналізом історій хвороб тривалість захворювання становила від 1 до 2 років.

Для визначення біохімічних показників проводили забір крові з ліктьової вени натще. Забір крові здійснювався як в момент встановлення діагнозу, так і в процесі та після лікування тієї чи іншої патології передміхурової залози. У нашій бакалаврській роботі аналізувалися результати біохімічного дослідження, які проводилися в момент встановлення діагнозу і враховували результати при наявності або відсутності доброякісного або злоякісного новоутворення.

Відібрану кров звільняли від формених елементів, а в плазмі крові визначали рівень зв'язаного та вільного ПСА, а також рівень чоловічих статевих гормонів – тестостерону, дигідротестостерону та їхнє співвідношення.

### **Кількісне визначення пухлинного маркера простатоспецифічного антигену в зразках плазми крові імуноферментним методом.**

*Принцип методу.* Цей метод (Fujirebio PSA-EIA) заснований на використанні двох типів моноклональних антитіл (PSA10, PSA66) до різних епітопів ПСА, які експоновані як у вільному ПСА (вПСА), так і в комплексі ПСА з  $\alpha$ 1-антихімотрипсіном (ПСА-АХТ). Використання комбінації цих антитіл дозволяє визначати як вПСА, так і ПСА-АХТ комплекс [29].

У роботі використовувався набір реагентів DRG PSA Total ELISA – твердофазний імуноферментний аналіз, який заснований на принципі сендвіча. Лунки мікротитратора у наборі для визначення покриті моноклональним (мишачим) антитілом, яке спрямоване на унікальну антигенну ділянку молекули ПСА. Під час інкубації крові молекули ПСА зв'язуються з іммобілізованими антитілами. Потім додається кон'югат ензиму, який містить антитіло проти ПСА, що кон'юговане з пероксидазою хрому. Воно зв'язується з ПСА і утворює сендвіч-комплекс.

Після етапу промивання (проводиться для видалення всіх незв'язаних речовин твердої фази, у якій проводилося інкубування із розчином субстрату). Колориметричну реакцію зупиняють шляхом додавання стоп-

реагенту, у результаті чого отримують продукт жовтого кольору, після чого вимірюють його оптичну густину. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації аналіту.

#### *Реагенти*

1. Мікротитраційні лунки, які покриті моноклональними антитілами проти ПСА.
2. Нульовий стандарт, який містить безртутний консервант (Sample Diluent) (1 флакон на 10 мл, готовий до використання).
3. Стандарт – 5 флаконів по 0,5 мл з концентраціями 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0 нг/мл. Готовий до використання; Концентрації: Стандарти відкалібровано за таким еталонним матеріалом.
4. Ферментний кон'югат – анти-ПСА антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (1 флакон на 12 мл, готовий до використання).
5. Розчин субстрату (тетраметилбензидин (ТМБ) (1 флакон на 12 мл, готовий до використання).
6. Стоп-розчин, що містить 0,5 моль/л  $H_2SO_4$  (1 флакон на 14 мл, готовий до використання).

*Необхідні матеріали:* калібрований пристрій з еталонною довжиною хвилі від 620 нм до 630 нм (450 нм) для зчитування мікропланшетів; калібровані мікропіпетки змінної точності; фільтрувальний папір; дистильована вода; міліметровий папір, таймер.

У цьому аналізі використовували плазму крові з антикоагулянтом цитратам натрію. Для отримання плазми крові використовували центрифужні пробірки, що містили антикоагулянт і центрифугували відразу після забору крові.

#### *Процедура аналізу*

1. Закріплюють потрібну кількість дослідних лунок мікротитратора в тримачі рамки.
2. До лунок додають по 25 мкл кожного стандарту новими одноразовими наконечниками.

3. Інкубують протягом 5 хвилин при кімнатній температурі.
4. У кожную лунку вносять по 100 мкл ферментного кон'югату та ретельно перемішують протягом 10 секунд. На цьому етапі важливо забезпечити повне змішування.
5. Проводять інкубацію протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
6. Лунки промивають 5 разів, шляхом додавання 400 мкл дистильованої води у кожную лунку. Після кожного промивання різко постукують лунками об абсорбуючий папір. При цьому видаляють залишкові краплі води. Слід зауважити, що чутливість і точність цього методу значною мірою залежить від правильності виконання процедури промивання.
7. У кожную лунку додають по 100 мкл розчину субстрату.
8. Інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
9. Ензимну реакцію зупиняли шляхом додавання до кожної лунки по 100 мкл стоп-розчину.
10. Визначають оптичну густину розчину кожної лунки при 450 нм з використанням пристрою для зчитування мікропланшетів. За методикою рекомендовано зчитування лунок протягом 10 хвилин після додавання стоп-реагенту.

Рекомендації: перед використанням усі реагенти та зразки повинні бути прогріті до кімнатної температури. Змішувати реагенти потрібно без утворення піни. Після початку тесту всі кроки потрібно проводити без перерви. Потрібно використовувати нові наконечники піпеток для кожного стандарту. Перед початком аналізу рекомендується підготувати всі реагенти.

#### *Розрахунок результатів*

Для кожного набору стандартів і контролів пацієнтів обчислюють значення середньої оптичної щільності. Будують стандартну калібрувальну криву шляхом відкладання середнього значення оптичної щільності для кожного стандарту. Під час проведення розрахунків автоматичним методом криву підганяють за 4 параметрами – 4-параметричний метод Родбарда.

Референтні значення ПСА – 4,0 нг/мл. Якщо концентрація ПСА перевищує 4,0 нг/мл необхідні повторні та додаткові обстеження для встановлення точного діагнозу.

### **Методика визначення тестостерону**

*Принцип методу* полягає у використанні конкурентного імуноферментного аналізу. В лунку планшета, яка містить іммобілізований антиген (специфічні анти-тестостерон-антитіла), додають кон'югат (тестостерон, мічений пероксидазою) та досліджуваний зразок. Тестостерон, який знаходиться у зразку конкурує з кон'югатом за взаємодію з антигеном на поверхні лунок. Після проведення процедури відмивки, активність ензиму, зв'язаного на поверхні лунки планшета, визначається додаванням субстрату, після чого проводиться вимірювання при довжині хвилі 450 nm (нм). Інтенсивність забарвлення після реакції зворотно пропорційна кількості тестостерона в пробі [30].

#### *Реагенти*

1. Набір калібраторів та контролю по 0,5 мл (всього 6 калібраторів концентрацією 0, 1, 3, 10, 30, 100 нмоль/л).
2. Відмиваючий розчин концентрат (22 мл у флаконі).
3. Кон'югат (11 мл у 1 флаконі).
4. Субстрат (11 мл у флаконі).
5. Зупиняючий розчин (11 мл у флаконі).

*Необхідні матеріали:* планшет з іммобілізованим антигеном; стрічка для заклеювання планшета; автоматичні дозатори на 5-1000 мкл; аналізатор імуноферментний з довжиною хвилі 450 нм.

#### *Процедура аналізу*

1. В рамку помістити потрібну кількість стрипів – лунки для зразків, калібраторів і контролів в 2-х повторях.
2. У відповідні лунки внести по 25 мкл досліджуваних зразків, калібраторів та контролів.

3. Внести у лунки по 100 мкл кон'югату.
4. Інкубувати 120 хв при температурі 37°C.
5. Відмити стрипи 5 разів за допомогою відмиваючого розчину.
6. Внести у лунки по 100 мкл субстрату.
7. Інкубувати 15-25 хв в темному місці при температурі 20-25°C.
8. Внести у лунки по 100 мкл стоп-реагенту.
9. Виміряти оптичну щільність розчину в лунках на імуноферментному аналізаторі при довжині хвилі 450 нм проти повітря.
10. Використати лінійно-логарифмічні методи обчислення значень.

#### *Розрахунок результатів*

Концентрацію тестостерону в досліджуваних зразках визначали з використанням калібрувального графіка.

Референтні значення тестостерону в крові – 5,9-18,1 нмоль/л (для чоловіків старше 55 років, результати яких аналізувалися у роботі).

#### **Методика визначення дигідротестостерону**

*Принцип методу* визначення ДГТ відповідає типовим імуноферментним методам конкурентного зв'язування. Конкурентне зв'язування відбувається між неміченим антигеном, який наявний в зразках пацієнтів, стандартах і контролях, та ензим-міченим антигеном (кон'югатом). Під час процедури промивання видаляються незв'язані матеріали, після чого додається субстрат ензиму. Ензимну реакцію зупиняють шляхом додавання стоп-розчину. Оптичну густину вимірюють на ІФА-рідері. Інтенсивність утвореного забарвлення обернено пропорційна концентрації ДГТ в зразку [30].

#### *Реагенти*

1. Концентрат промивного буфера містить іонний розчин для промивання і консервант (50 мл у флаконі). Перед використанням необхідно розвести дистильованою водою 1:10.

2. ТМБ – субстрат, який готовий до використання (містить тетраметилбензидин і  $\text{H}_2\text{O}_2$  в буфері (16 мл у флаконі). Зберігають охолодженим при 2-8°C.

3. Стоп-розчин, який 1 моль/л сірчаної кислоти, готовий для використання (1 флакон на 6 мл). Зберігають охолодженим при 2-8°C.

4. Стандарти і контролю готові до використання.

5. Буфер аналізу, що містить основний білковий буферний розчин з консервантом.

6. Концентрований кон'югат ДГТ-HRP в білковому розчині з консервантом (0,2 мл у флаконі).

*Необхідні матеріали:* точні мікропіпетки та одноразові наконечники для розподілу зразків (50, 100, 150 і 300 мкл); дистильована вода; рідер мікропланшетів з фільтром з довжиною хвилі 450 нм.

#### *Процедура аналізу*

Перед використанням все реагенти повинні мати кімнатну температуру. Після початку процедури всі кроки повинні бути завершені без перерви.

1. Приготувати робочі розчини промивного буфера і HRP кон'югату.

2. Видалити необхідну кількість стріпів.

3. Додати у відповідно позначені лунки в дублях по 50 мкл кожного стандарту, зразка сироватки та контролю.

4. Додати в кожен лунку по 100 мкл робочого розчину HRP кон'югату.

5. Акуратно необхідно струсити пластину мікропланшета в шейкері протягом 10 сек, після чого інкубувати протягом 1 години при кімнатній температурі.

6. Промити кожен лунку 3 рази шляхом внесення по 300 мкл буферного розчину для промивання. Залишки вологи видаляють абсорбуючим папером.

7. Додати в кожен лунку по 150 мкл ТМБ-субстрату через задані інтервали часу.

8. Акуратно струсити пластину мікропланшета протягом 10 сек та інкубувати 10-15 хвилин при кімнатній температурі без струшування.

9. Додати 50 мкл стоп-розчину в кожну лунку через відповідні інтервали (як на етапі 7).

10. Після додавання стоп-розчину зчитувати результати на рідері мікропланшетів при 450 нм протягом 20 хвилин.

#### *Розрахунок результатів*

Спочатку розраховують оптичну густина кожного стандарту. Будують калібрувальний графік із значеннями середньої оптичної щільності на Y-осі і концентрацією калібратора на X-осі.

У випадку, якщо для аналізу використовується програмне забезпечення, то потрібна крива на 4 або 5 параметрів. Далі розраховують середню оптичну густина невідомих зразків у дублях.

Референтні значення ДГТ – 250-990 пг/мл для чоловіків. Коефіцієнти перерахунку:  $\text{нг}/100 \text{ мл} \times 10 = \text{пг}/\text{мл}$ ;  $\text{нмоль}/\text{л} \times 290,454 = \text{пг}/\text{мл}$ . З цього випливає, що норма у нмоль/л буде: 0,86-3,4 нмоль/л.

#### **Статистична обробка результатів**

Статистична обробка всіх проаналізованих результатів проводилася за допомогою використання персонального комп'ютера Pentium у табличному редакторі "Excel 2000 for Windows" в опції «аналіз даних» [31]. Визначення різниці між досліджуваними групами проводили із застосуванням t-критерію Стьюдента. Статистично достовірними вважалися результати при  $p \leq 0,05$  [32].

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток гіперпластичних процесів у передміхуровій залозі може перебігати як доброякісно (розвиток аденоми), так і злоякісно (розвиток РПЗ). Ці новоутворення мають при цьому відповідні клініко-діагностичні та патоморфологічні особливості [33].

Диференційну діагностику доброякісних новоутворень передміхурової залози необхідно проводити для розрізнення таких захворювань як РПЗ, гострий або хронічний простатит, туберкульоз простати, камені простати. Це пов'язано з тим, що ці патологічні стани супроводжуються подібними клінічними ознаками – порушення сечовипускання, біль у нижній частині живота, відчутні зміни при пальцевому дослідженні передміхурової залози. Проте, для кожної з цих патологій можуть бути притаманні специфічні діагностичні критерії з визначенням біохімічних маркерів, що дозволить провести диференційну діагностику [34].

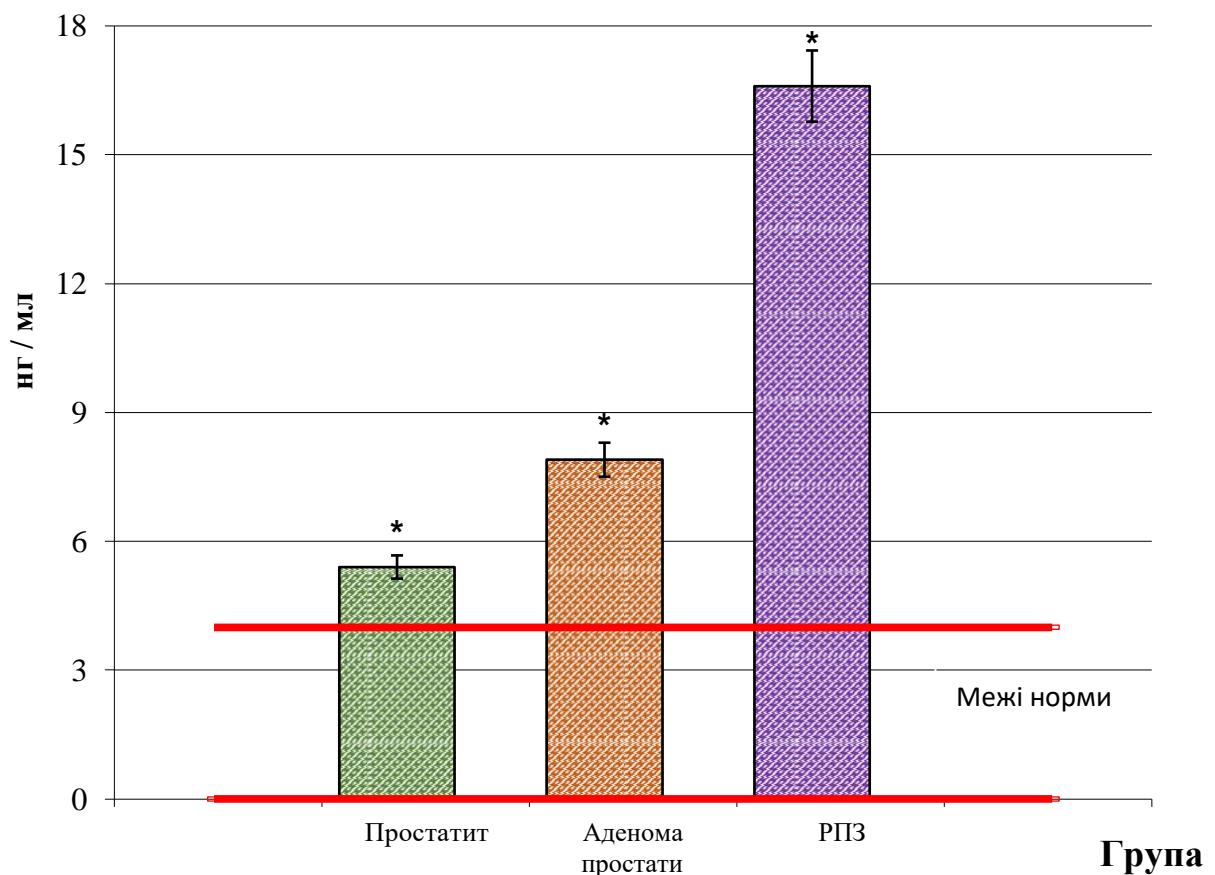
Так, спільними ознаками аденоми простати та РПЗ є затруднене сечовипускання й ослаблення струменя сечі. Однак, при РПЗ перебіг хвороби швидкий і прогресуючий, можуть з'являтися симптоми інвазії у сусідні тканини (болі у прямій кишці, відчуття розпирання в області промежини). Може спостерігатися віддалене метастазування та пухлинна інтоксикації (втрата маси тіла, анемія, поганий апетит) [16]. При пальцевому дослідженні простати при РПЗ характерна нерівномірنا, кам'яниста консистенція. При аденомі консистенція передміхурової залози рівномірно-туго еластична. Орган має рівні чіткі контури, збережена рухомість стінки прямої кишки. Слід врахувати, що всі ці ознаки спостерігаються на пізніх стадіях розвитку новоутворення, проте на ранніх стадіях доречно було б визначити біохімічні маркери, зміна рівня яких могла б передбачити розвиток пухлинного процесу та своєчасно призначити адекватне лікування.

Одним із таких маркерів може бути ПСА. Перевага ПСА-тесту полягає в тому, що саме за його визначенням можна виявити пухлину передміхурової залози на ранній стадії. Такі локалізовані новоутворення піддаються

лікуванню з найменшими несприятливими наслідками. Виявлення максимально ранніх стадій розвитку новоутворень допоможе краще лікувати онкологію, що продовжить життя пацієнтів [35].

У крові ПСА наявний в трьох формах: вільній, зв'язаний з альфа-2-макроглобуліном, зв'язаний з альфа-1-антихімотрипсином.

Результати проведених досліджень показали, що при розвитку злоякісних новоутворень передміхурової залози рівень ПСА у плазмі крові був на найвищому рівні і становив  $16,6 \pm 1,23$  нг/мл, що у 4,2 рази перевищувало показник верхньої межі норми (рис.3.1).



**Рис.3.1. Вміст простатоспецифічного антигена у плазмі крові чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози**

*Примітка (тут і надалі): РПЗ – пацієнти, у яких діагностований рак передміхурової залози; \* – статистично достовірна різниця порівняно з показниками норми,  $p \leq 0,05$ .*

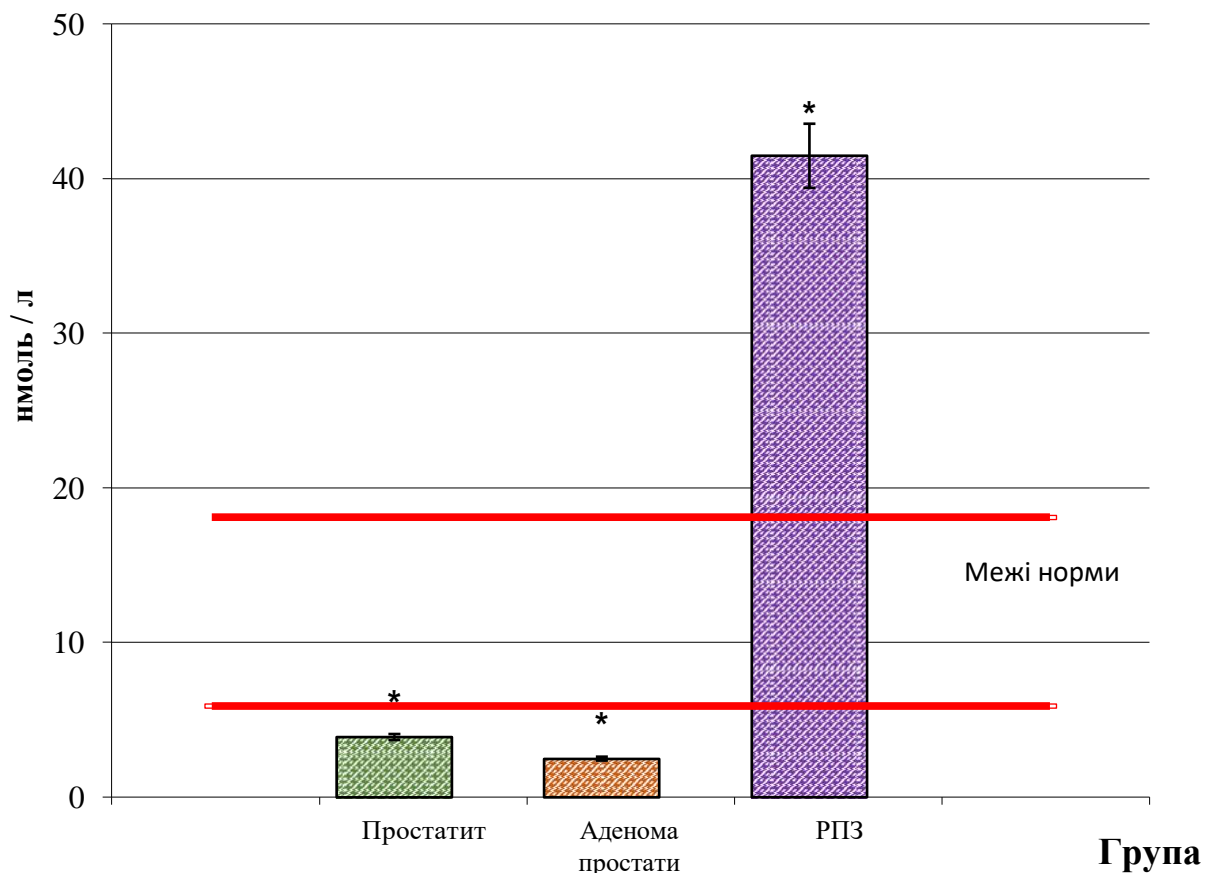
При аналізі результатів пацієнтів з простатитом і аденомою простати виявлено, що рівень ПСА у 1,4 рази та у 2 рази перевищував показник верхньої межі норми відповідно (рис.3.1). Тобто, для цих досліджуваних патологій концентрація ПСА знаходилася в межах від 4,1 до 10,0 нг/мл. Якщо порівняти абсолютні значення, то для простатиту рівень ПСА у сироватці крові становив  $5,4 \pm 0,654$  нг/мл, а для аденоми простати –  $7,9 \pm 0,687$  нг/мл (рис.3.1). Встановлений факт може вказувати, що межі ПСА від 4,1 до 7 нг/мл свідчать про розвиток в організмі простатиту, а межі ПСА від 7,1 до 10 нг/мл – про розвиток доброякісного новоутворення (аденоми).

Отже, проведення ПСА-тестування дозволяє диференціювати доброякісні пухлини передміхурової залози від злоякісних. Проте, найбільші проблеми в постановці діагнозу виникають у тому випадку, коли концентрація ПСА знаходиться в межах 4-10 нг/мл. У цьому випадку ПСА-тест може мати низку недоліків, оскільки в літературі цей діапазон концентрацій називають «сірою зоною» [20]. Тому, для підвищення диференційно-діагностичних можливостей виявлення простатиту, аденоми та РПЗ необхідний пошук додаткових маркерів, зокрема з'ясування стану гормонального фону чоловічих статевих гормонів. Одним із таких гормонів є тестостерон – стероїдний гормон з групи андрогенів [21].

Під впливом тестостерону відбувається розвиток вторинних статевих ознак у чоловіків, здійснюється функція простати, відбувається сперматогенез і потенція, відбувається статеве дозрівання й відповідна статева поведінка. Тестостерон забезпечує виконання фізіологічної статевої функції. У чоловіків тестостерон впливає на енергетичний рівень, тонус м'язів, синтез ендорфінів, синтез ліпопротеїнів печінкою, дозрівання кісткової тканини, пам'ять. Тестостерон також стимулює утворення шкірної жирової тканини, стимулює лібідо, впливає на ріст волосся. Тому цей показник може вказувати на стан передміхурової залози [16].

Аналіз результатів показав, що у пацієнтів з простатитом спостерігалось зниження рівня тестостерону в плазмі крові у 1,5 рази

порівняно з показниками нижньої межі норми (рис.3.2). Імовірно, запальний процес в передміхуровій залозі призводить до зниження вироблення тестостерону. Симптоми, які спостерігаються при простатиті (порушення лібідо, сечовипускання, ерекції) опосередковано зв'язані зі зниженням рівня тестостерону [23]. Ці симптоми провокують сильний стрес організму, в результаті чого може вироблятися значна кількість адреналіну. Додатково можуть синтезуватися норадреналін і кортизол. Ці гормони, у свою чергу, пригнічують функцію вироблення тестостерону [25].



**Рис.3.2. Вміст тестостерону в плазмі крові чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози**

Дослідження рівня тестостерону в пацієнтів з аденомою простати показали його зниження у 2,4 рази порівняно з показниками нижньої межі норми (рис.3.2). Це може вказувати на той факт, що аденома передміхурової

залози може виникнути через порушення гормонального фону в чоловіків, зокрема, через зміну співвідношення чоловічих і жіночих статевих гормонів. Оскільки після 40 років у чоловіків синтез тестостерону знижується, то підвищується ризик розвитку аденоми простати. Ще однією причиною може бути підвищення концентрації ПСА, який виробляється клітинами передміхурової залози [19, 36].

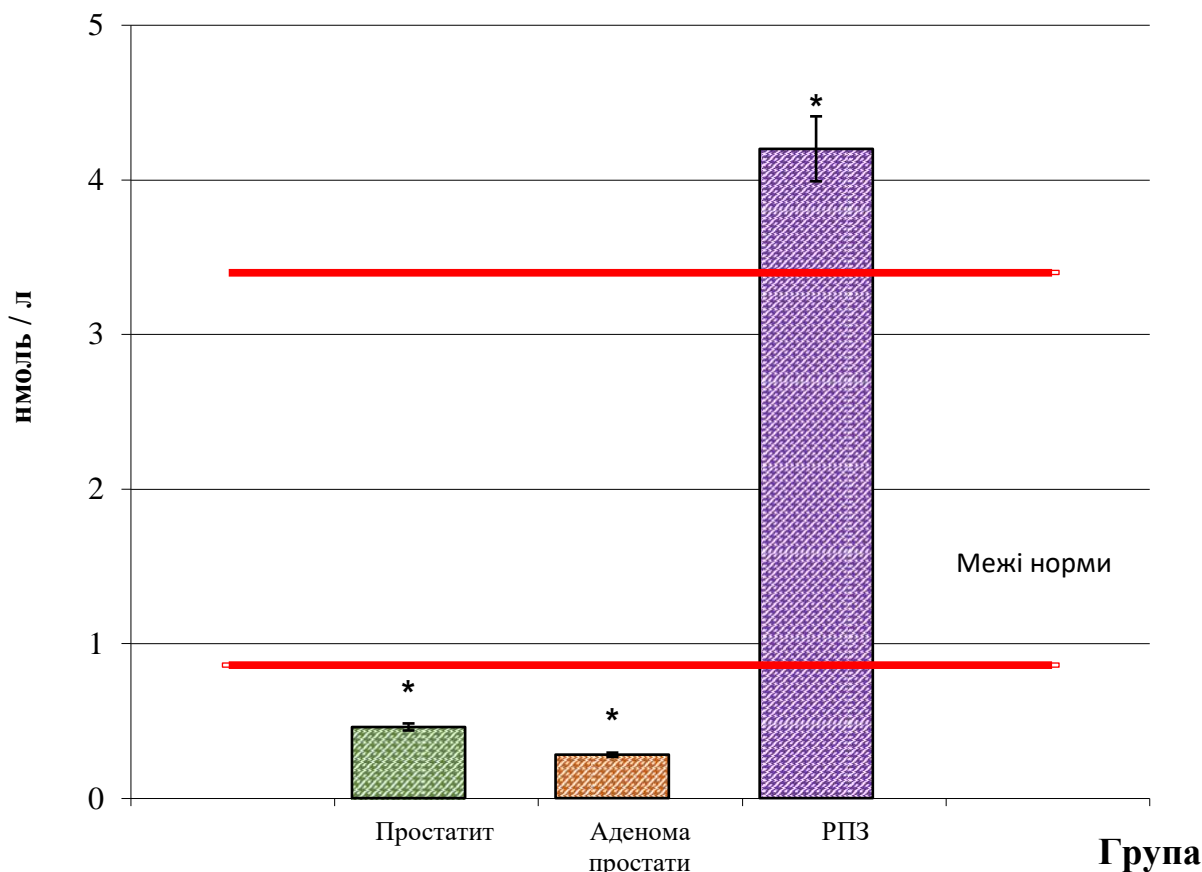
При РПЗ виявлено підвищення рівня тестостерону в сироватці крові у 2,3 рази порівняно із верхньою межею норми (рис.3.2).

Отже, у пацієнтів із різною патологією передміхурової залози виявлена різноспрямована зміна концентрації тестостерону в плазмі крові. Так, при простатиті й аденомі рівень тестостерону в сироватці крові знижується, причому більшою мірою при аденомі передміхурової залози. Водночас, у пацієнтів з РПЗ концентрація тестостерону в плазмі крові підвищується. Встановлений факт може лежати в основі ранньої діагностики досліджуваних патологій.

Оскільки метаболізм тестостерону частково здійснюється у передміхуровій залозі за дії ензиму 5 $\alpha$ -редуктази з утворенням активного метаболіту ДГТ, то доречно було б визначити його рівень у плазмі крові чоловіків із патологією передміхурової залози. ДГТ бере участь в активації андрогенових рецепторів клітин Сертолі, а це, у свою чергу, призводить до ініціації сперматогенезу та дозрівання сперматозоїдів [37].

Аналіз рівнів ДГТ встановив його зменшення нижче нижньої межі норми у всіх пацієнтів, у яких спостерігався простатит та розвиток аденоми простати. Так, у пацієнтів групи з простатитом виявлено зниження концентрації ДГТ у плазмі крові у 1,8 рази порівняно з показниками нижньої межі норми. Поряд з цим спостерігалось зниження і у групі пацієнтів з аденомою передміхурової залози, у яких рівень ДГТ був у 3,1 рази нижчий порівняно з показниками нижньої межі норми (рис.3.3). У чоловіків, у яких діагностований РПЗ спостерігалось незначне підвищення (у 1,2 рази) рівня ДГТ в сироватці крові (рис.3.3). Встановлений факт вказує на те, що на фоні

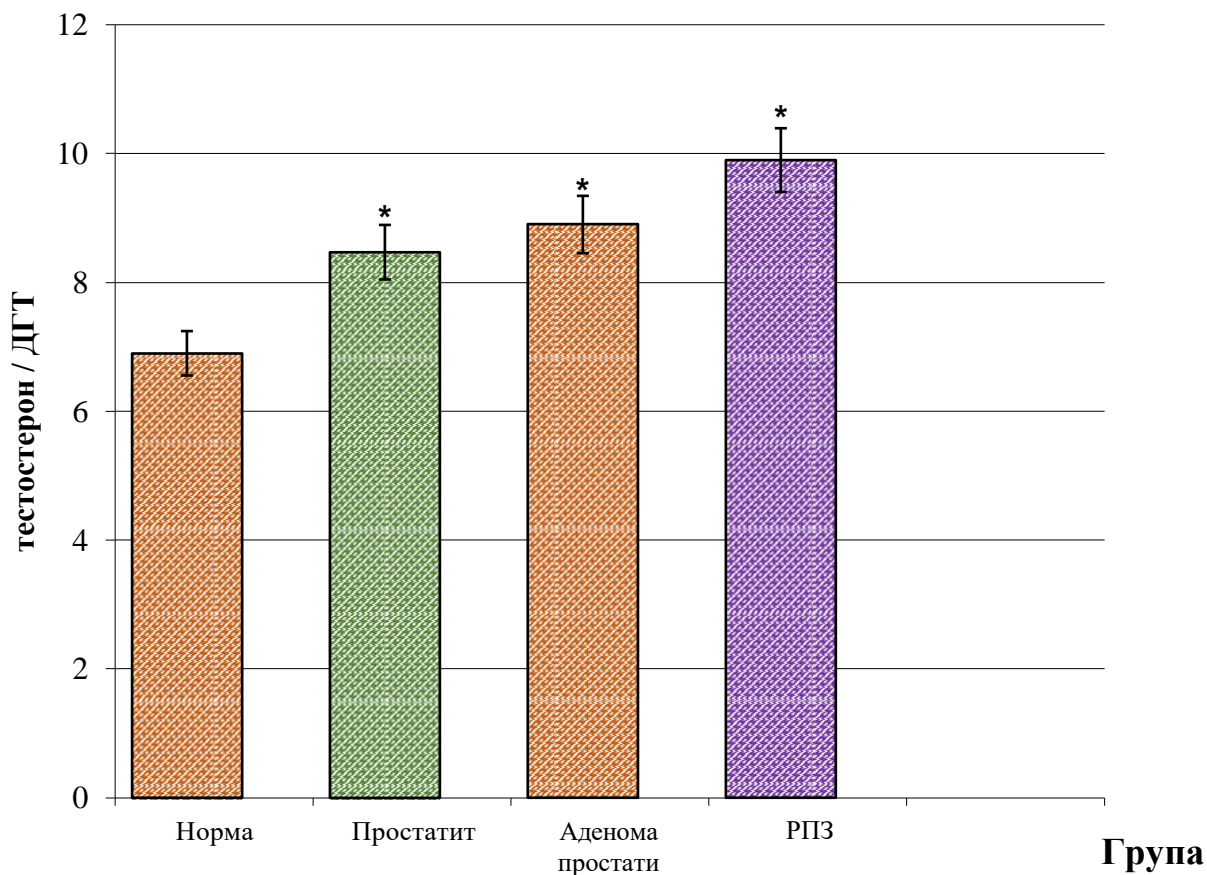
зниження рівня тестостерону відмічалось і зниження ДГТ у пацієнтів із простатитом та аденомою простати. Це може свідчити про недостатність ензиму 5 $\alpha$ -редуктази. У пацієнтів з РПЗ рівень ДГТ підвищувався на фоні підвищення рівня загального тестостерону в плазмі крові.



**Рис.3.3. Вміст дигідротестостерону в плазмі крові чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози**

Відомо, що при гіпогонадізмі на фоні андрогенодефіциту при зниженні рівнів загального тестостерону рівень ДГТ знижується більшою мірою. Тому, діагностично важливим є встановлення співвідношення тестостерон-дигідротестостерон (Т/ДГТ). Так, у всіх пацієнтів з патологіями передміхурової залози відмічалось підвищення співвідношення Т/ДГТ з максимальними значеннями у пацієнтів з РПЗ та з мінімальними значеннями

у пацієнтів із простатитом, що статистично достовірно відрізнялося від показників норми (рис.3.4).



**Рис.3.4. Співвідношення рівнів тестостерону до дигідротестостерону в плазмі крові чоловіків з доброякісними і злоякісними новоутвореннями передміхурової залози**

Отже, значення співвідношення Т/ДГТ повною мірою свідчать про те, що в групі пацієнтів з простатитом і аденомою простати відмічається зниження усіх андрогенів з більшим зниженням ДГТ. У пацієнтів з РПЗ спостерігалось підвищення як тестостерону, так і ДГТ, проте рівень тестостерону підвищувався більшою мірою. Виявлені факти дають підставу припустити, що у пацієнтів усіх дослідних груп відмічалась недостатня конверсія тестостерону в ДГТ, що свідчить про  $5\alpha$ -редуктазну недостатність. Аналіз середніх величин співвідношення Т/ДГТ в досліджуваних групах

встановив, що найменше співвідношення виявлено у пацієнтів з простатитом, а найвище – у пацієнтів з РПЗ [22].

Цілком очевидно, що виявлені зміни показників дозволять своєчасно провести лікування агресивних і небезпечних для життя видів раку на ранній стадії [38]. Тому визначення біомаркерів для встановлення злоякісності є досить важливим. На даний момент важливість важко переоцінити ПСА-тесту. А для вирішення проблеми діагностики та лікування патологій передміхурової залози на допомогу приходять сучасні технології. Визначення співвідношення Т/ДГТ дозволить встановити причину дефіциту ДГТ, який розвивається, переважно, при недостатності 5 $\alpha$ -редуктази, що може лежати в основі ранньої діагностики патологій передміхурової залози.

## ВИСНОВКИ

1. У плазмі крові чоловіків з простатитом, доброякісними та злоякісними новоутвореннями передміхурової залози спостерігається підвищення рівня простатоспецифічного антигена з максимальними показниками у пацієнтів з раком передміхурової залози.

2. Рівні тестостерону та дигідротестостерону в плазмі крові у чоловіків з простатитом та аденомою простати суттєво нижче показників норми з мінімальними значеннями у пацієнтів при розвитку аденоми. Розвиток у чоловіків злоякісного новоутворення передміхурової залози супроводжується підвищенням рівнів загального тестостерону та дигідротестостерону в плазмі крові.

3. У чоловіків по мірі розвитку злоякісності новоутворення передміхурової залози відзначається збільшення відношення тестостерон-дигідротестостерон, що може свідчити про недостатність активності 5- $\alpha$  редуктази.