

11. Благодарности

В нашето проучване всички микроскопски илюстрации към текста са авторско дело. Имунохистохимичните анализи бяха проведени в Клиниката по урология на МБАЛ „Св. Анна“ – Варна и Катедрата по обща и клинична патоанатомия на Университетска болница „Св. Марина“ – Варна, с ръководител проф. д-р Петър Генев, д.м., със съдействието на д-р Христо Попов и отличния лаборант Елена Боева, за което съм им особено признателен. Специални благодарности на проф. д-р Антон Тончев, д.м.н., както и моя ментор доц. д-р Георги Чалдъков, без чиято безкористна подкрепа не бих осъществил това проучване.

Медицински университет „Проф. д-р Параксев Стоянов“ - Варна

Медицински факултет

Катедра „Хирургически болести“, УС „Урология“

Доц. д-р Николай Тодоров Евтимов, д.м.

**Ролята на NGF, BDNF и техните рецептори TrkA, TrkB
и p75NTR за възникване и метастазиране
на простатния карцином**

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен
„Доктор на медицинските науки“
по научна специалност „Урология“

Научно жури:

ПРЕДСЕДАТЕЛ:
Доц. д-р Тошо Йорданов Ганев, д.м.

ЧЛЕНОВЕ:

Проф. д-р Димитър Динков Младенов, д.м.н.
Полк. проф. Илия Петров Салтиров, д.м.н.
Проф. д-р Митко Цветков Цветков, д.м.н.
Проф. д-р Антон Божидаров Тончев, д.м.н
Проф. д-р Иван Янков Дечев, д.м.
Проф. д-р Петър Иванов Генев, д.м.

РЕЗЕРВНИ ЧЛЕНОВЕ:
Проф. д-р Христо Куманов, д.м.н.
Доц. д-р Деян Анакиевски, д.м.

Варна, 2018 г.

Дисертационният труд съдържа общо 232 страници, онагледен е с 58 фигури и 44 таблици. Библиографията включва 290 заглавия, от които 27 на кирилица и 263 на латиница.

Проучването е осъществено в Клиниката по урология към МБАЛ „Св. Анна“ – Варна, и Катедрата по патоанатомия към Университетска болница „Св. Марина“ – Медицински университет „Проф. д-р Паракев Стоянов“ - Варна.

Докторантът работи като уролог към МБАЛ „Св Анна“ – Варна.

Докторатът е обсъден, приет и настроен за защита пред научно жури от Катедрен съвет при Катедра „Хирургически болести“ на МУ „Проф. д-р Паракев Стоянов“ – Варна, Медицински факултет, УС „Урология“ на 19.11.2018 г.

23. Евтимов Н. Зависимост между Gleason score и експресията на BDNF и NGF при простатния карцином Урология и ендоурология 2018;24:4. В печат
24. Евтимов Н. Пътността на експресия на BDNF, NGF, TrK A, TrK B, p75 спрямо нивата на туморния маркер PSA Уронет ISSN 1312-1960 в печат изпратено 19.04.2018

Заштитата на дисертационния труд ще се състои на от в Аудитория № III на МУ „Проф. д-р Паракев Стоянов“ – Варна на открито заседание на научното жури.

Материалите по защитата са публикуван на интернет страницата на МУ-Варна, www.mu-varna.bg

В нереферирани списания:

11. Евтимов Н., Ганев Т., Петкова Л. Адипобиология на простатен карцином. Уронет 2012. 1;3:10-14.
12. Евтимов Н., Ганев Т., Железов М. Ролята на перипростатаната мастна тъкан NGF & BDNF при простатен карцином. Урология 2014.20:4,93-98.
13. Евтимов Н. Затълствяване и простатен карцином. Урология и ендоурология 2015.21:4.67-75.
14. Евтимов Н. Адипопаракринология и простатен карцином Уронет 2016.2:20-21.
15. Евтимов Н. Железов М. Ганев Т, Петкова Л. Ролята на мастната тъкан за развитие на простатен карцином Уронет 2015.2: 13-14.
16. Евтимов Н. Невротрофини NGF, BDNF и ролята им за развитие и метастазиране на простатния карцином. Урология. и ендоурология 2016;1:13-17.
17. Евтимов Н. Плътност на експресия на NGF&BDNF и техните рецептори , като негативен прогностичен фактор при простатния карцином Уронет ISSN 1312-1960 : 2017: 2;9.
18. Петкова Л., Ганев Т., Стателов Т., Евтимов Н. Простатоспецифичен антиген (PSA): място в съвременната диагностика и скриниране на простатен карцином Варненски медицински Форум 2014:3;1.29-32.
19. Ганев Т., Петкова Л., Стателов Т., Евтимов Н. Номограми за оценка на пациенти при лечение с интермитентна хормонова терапия.Уронет 2012.1:24-33.
20. Евтимов Н. Nerve Growth Factor (NGF) От саркома 180 до рак на простатал Урология и ендоурология 2018.24:3. В печат.
21. Евтимов Н. Комбинирана оценка на експресията на BDNF и NGF в зависимост от стойности на Gleason + PSA + cTNM Урология и ендоурология 2019.25:1. В печат.
22. Евтимов Н. Микросъдова плътност и невротрофините NGF и BDNF при карцином на простата Урология и ендоурология 2018.24:4. В печат

Съдържание

| | |
|---|-----|
| 1. Използвани съкращения | 4 |
| 2. Увод | 5 |
| 3. Цел и задачи | 6 |
| 4. Материал и методи | 10 |
| 5. Резултати | 29 |
| 6. Обсъждане | 85 |
| 7. Изводи | 102 |
| 8. Заключение | 104 |
| 9. Приноси на дисертационния труд | 106 |
| 10. Публикации във връзка с дисертационния труд | 109 |
| 11. Благодарности | 112 |

1. Най-често използвани съкращения

| | |
|----------------------|---|
| ДПХ | доброкачествена простатна хиперплазия |
| КП | карцином на простата |
| ЛРП | лапароскопска радикална простатектомия |
| РРП | ретропубична радикална простатектомия |
| ADRF | Adipocyte-derived relaxing factor |
| AT | Adipose tissue |
| BAT | Brown adipose tissue |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor |
| BMI | Body mass index – боди мас индекс (БМИ) |
| CNTF | ciliary neurotrophic factor |
| cTNM | клиничен стадий, близки метастази, далечни метастази |
| EGF | Epidermal growth factor |
| G | grading – грейдинг |
| GDNF | glial cell-derived neurotrophic factor |
| Gleason score | Оценка по Глийсън (Prostate Cancer Grading) |
| GPCR | G protein-coupled receptors |
| HIF | hypoxia-inducible factor |
| NGF | Nerve growth factor |
| NO | Nitric oxide |
| NT | neurotrophin |
| p75 ^{NTTR} | p75 neurotrophin receptor – пан-невротрофен рецептор |
| PSA | prostate specific antigen – простатоспецифичен антиген (ПСА) |
| pTNM | хистологично доказан тумор, близки метастази, далечни метастази |
| RRP | retropubic prostatectomy – |
| RRPVE | ретропубична радикална простатектомия |
| TNF | Radical retropubic prostate vesiculectomy |
| TNF-□ | Tumour necrosis factor |
| TNF-□ | Tumour necrosis factor-alpha |
| TNM | Classification of Malignant Tumours |
| Trk | tyrosine receptor kinase - рецептори за NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 |
| TrkB | Tropomyosin receptor kinase B |
| TrkB ^{BDNF} | Trk рецептор за BDNF |
| Trk ^{NGF} | Trk рецептор за NGF |
| TrkA | Tropomyosin receptor kinase A |
| UICC | Union for International Cancer Control |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| WAT | White adipose tissue |

10. Научни публикации във връзка с дисертационния труд

В реферирани списания:

- Georgi Chaldakov, Nese Tuncei, Gerzy Beltowskiq Marco Fiore, Corana Rancic, Anton Tonchev, Plamen Panaiotov, Nikolay Evtimov, Alexander Hinev, Deyan Anakievski, Luigi Aloe. Adipoparacrinology: An emerging field in biomedical research. Balkan Medical Journal 2012; 29: 6074-6097.
- Evtimov N. Periprostatic adipose tissue, NGF&BDNF in prostate cancer. Eur. Urol.Suppl.2013;11:(4)1282.
- Goran R,Popob K, Tonchev A,Fiore M, Evtimov N, Yanev S,Aloe L, Chaldakov G. Adipose tissue: The renaissance marked by four paradigm shifts Adipobiology 2014;6:50-54.
- Evtimov N, Hinev A, Anakievski D, Zhelezov M et al. Adipoparacrinology: Periprstatic adipose tissue as an example. Adipobiology ISSN 1313-3705(online) 2016;8:61-65.
- Genev P, Kitanova G, Popob K, Evtimov N, et al. Neuradipobiology of right ventricular dysplasia. An Immunohistochemical study of neurotrophins. Adipobiology ISSN 1313-3705 (online) 2016;8:55-58.
- Rancic G, Fiore M, Pancheva R, Tuncel N, Beltowski J, Zhelezov M, Chenev P, Hinev A, Evtimov N,Yanev S, Thonchev A, Aloe L, Chaldakov G. Adipose Tissue: The Renaissance marked by four paradigm shifts. Adipobiology ISSN 1313-3705 (online) 2016;8:50-53.
- Yanev S, Fiore M, Hinev A,Ghenev P, Thonchev A, Evtimov N, Aloe L, Chaldakov G. From Antitubulins to Tracking. Biomedical Revives 2017;27:59-67. Microglia as potential regulators of empathy and prosocial behavior – a hypothesis
- Genev P, Goran R, Popob K, Anton T, Fiore M, Evtimov N, Yanev S, Aloe L, Chaldakov G. Que Vadis Atherogenesis Part 2 Tunica adiposa- The new player in the process of atherogenesis Adipobiology ISSN 1313-3705 (online) 2017;9:1-4.
- Evtimov Nikolay Proonkogeens neurotrophyns NGF and BDNF expression in prostate gland depending on the PSA levels in prostate carcinoma 14th EAU South Eastern European Meeting 20-24 September 2018, Belgrade, Serbia. Eur. Urol.Suppl.2018;17:(11)e2564.
- Evtimov Nikolay Relationship between Gleason score and the expression of BDNF and NGF in prostatniâ carcinoma 14th EAU South Eastern

Трето: BDNF експресира само в простатата и слабо в мастната тъкан, разположена вентрално и периректално.

Четвърто: Комбинираната оценка между експресия NGF и BDNF спрямо Gleason score, PSA pTNM. Комбинираната оценка на трите фактора показва, че експресията на невротрофините се засилва с покачване на серумните нива на PSA, Gleason score и патоанатомичния стадий. Експресията на рецепторите обаче е различна за NGF, запазва тенденцията си към повишаване, а за BDNF тя е обратна. При силна експресия на NGF и BDNF и Gleason score ≥ 7 , PSA > 20 , с TNM $\geq T2M0N0$ вероятността от биологична прогресия на ПК е голяма и това би трябвало да промени терапевтичното поведение. Обратно, при стойности на Gleason score ≤ 7 , PSA < 20 , с TNM $< T2M0N0$ и слаба експресия на NGF и BDNF се касае за локализиран ПК и оперативното лечение при тези пациенти ще е достатъчно. При тях не се налага допълнителна хормонна, рентгенова или химиотерапия.

Пето: Предполагаме, че лекарства, които инхибират активността на NGF и BDNF, биха имали антиканцерогенен ефект.

2. Увод

Простатният карцином е най-честата диагноза от малигнените неоплазми сред мъжката популация. Вече има достатъчно събрани доказателства, които показват наличие на междуклетъчни взаимодействия между стромалните клетки и епителните клетки на простатната жлеза, наречено паракринно. Тези протеини служат за връзка и играят важна роля за уголемяването при хиперплазията и растежа на туморните клетки при карцином на простатната жлеза.

Концепция за клетъчните растежни фактори - диференциацията и функциите на различните клетъчни видове се регулират от специфични сигнални протеини, наричани клетъчни растежни фактори. Днес, клетъчните растежни фактори са повече от 50 на брой и заемат централни места в патогенезата на много болести.

Nerve growth factor - като протеин, секретиращ се от стромалните клетки е отговорен за паракринната регулация на епителния тумор в простатната жлеза *In vitro*. Този NGF дериват се различава от познатите досега членове от групата на невротрофините. Освен това, съответни NGF рецептори се откриват върху епителните клетки на човешката простата *in vivo* и е възможно да са представители на простато- специфична форма, чиято продукция се определя от специфичен ген. Логично е да се предположи зависимостта между рецепторите и ролята на NGF, който се секретира от стромните клетки на простатата и тяхната функция в паракринната регулация, както за уголемяването на простата при БПХ, така и за възникването на карцинома на простатната жлеза.

Ясно е че, механизъмът, който контролира тези процеси потенциално ще играе роля и при лечението на карцинома на простата. С развитие на технологиите и усъвършенстването на тестовете за откриване на протеините, които са отговорни за междуклетъчните взаимодействия, се приближаваме все по-близо до възможността за контрол върху туморната пролиферация, диференциация и клетъчната апоптоза.

Идеята за междуклетъчните взаимодействия е на повече от тридесет години, но доказването на тези вещества, наречени невротрофини става възможно едва през последните 30 години. Основна заслуга за това има работата на (Rita Levi- Montalcini et al.1987). Тези малки протеини за пръв път са открити в нервните клетки, откъдето идва и името им. Едва покъсно се открива техният синтез и от други клетки в човешкия организъм.

Тези сигнални молекули играят решаваща роля за основните жизнени процеси на клетката, каквото са растежа, диференциацията и клетъчната апоптоза.

„Клетъчни растежни фактори“, са протеини, които стимулират растежа на клетките.

Невр Растежен Фактор (NGF) е първият идентифициран. За да бъде описан е наречен NGF. Той е и полипептид, отнася се до един прототипен растежен фактор, докато нервните растежни фактори се отнасят до семейство фактори, известни като „Невротрофини“. NGF е първият познат невротрофин, който е с доказана роля за развитието на нервната система. Той стимулира пролиферацията и диференциацията и потиска апоптозата на нервната клетка. Невротрофното активиране се медиира посредством два класа рецептори, разположени върху клетката. Това са Trk рецептори и neurotrophin receptor p75/ntr, по-късно установен, че принадлежи към групата на Tumor Necrosis Factor-receptor (Lu B.,Pang PT, Woo NGF преференциално се свързва с TrkA^{NGF}, BDNF и NT4/5 -4/5), както и с TrkB^{BDNF}. NT/3 приоритетно се свързва с Trk C, както и с TrkA & TrkB, но те са по-малко специфични. Всички невротрофини се свързват и активират p75ntr.

Много проучвания доказват, че не само нервните клетки реагират на въздействието на невротрофините при здрави тъкани с наличие на патологични процеси. Това показва ключовата роля на невротрофините и техните рецептори при неневронални карциноми.

Непосредствено е доказана ролята на невротрофините при следните неопластични заболявания: тироиден карцином, простатен карцином, меланом, миеломна болест, панкреатичния карцином, карцинома на яйчиците и хепатоцелуларния карцином.

При карцинома на гърдата, NGF стимулира пролиферацията и потиска клетъчната апоптоза на туморните клетки чрез активиране на TrkA и p75ntr рецепторите, вследствие на което NGF индуцира HER2 гена, което пък активира пролиферацията на клетките при карцинома на гърдата.

Тази корелация между растежния фактор и клетъчната пролиферация и апоптоза при туморните клетки при този тип неоплазма, се използва и в съвременното таргетно лечение на карцинома на млечната жлеза. Антиестрогенният препарат tamoxifen инхибира митогеният ефект на NGF. Той потиска и експресията на SHP-1 фосфатазата чрез въздействие върху p53 гена, който е отговорен за TrkA рецептора. Блокира се

8. За пръв път е обсъдена възможността за използването на невротрофините като потенциални таргети за терапия при простатния карцином.

От направената библиографска справка и тази в PubMed към 4 – 7 юни 2018 г., от над 55 хиляди статии за ролята на невротрофините само 42 са свързани с перипростатната адипозна тъкан. Няма проучване, удостоверяващо плътността на експресията на NGF и BDNF и специфичните им рецептори, обективизиращи сигнификантна пропорционална зависимост между експресия на BDNF и NGF и малигнеността на простатния карцином. За пръв път се прави комбинирана оценка на експресията на BDNF и NGF в зависимост от стойности на Gleason score + PSA + cTNM.

Приноси с потвърдителен характер:

Първо: С промяна на обиколката на ханша има тенденция за промяна на стадия на заболяването. В КП NGF експресира изключително силно в областите с инвазивен простатен карцином и почти липсва в заобикалящите аденоматозни структури. BDNF експресира силно в микросъдовите глиални тъкани. Тя се свързва с метастазирането на солидните тумори и се счита за негативен прогностичен индикатор. TrkA експресира силно в простатната карциномна тъкан, разположена ректално и слабо в мастната тъкан. Няма експресия в аденоматозната простатна тъкан и контролната проба. Има слаба експресия в периректалната мастна тъкан. Липсва експресия на TrkB рецептора в мастната тъкан, а в ганглийната и карциномните тъкани тя е слаба.

Второ: NGF се експресира в мастната (периректална, перипростатна тъкан). Също се експресира силно както в епителната, така и в стромните простатни тъкани. NGF експресира слабо в мастната тъкан, особено при PSA< 20 в мастната тъкан, разположена периректално. NGF експресира слабо в простатната тъкан, когато имаме по-малко от 5% карцином в изследвания материал.

9. Приноси на дисертационния труд

Приноси с оригинален характер:

1. За първи път в България се прави проучване, проследяващо експресията на NGF и BDNF и техните специфични TrkA,B рецептори в перипростатната, периректална мастна тъкан и пътността на експресия на тези невротрофини в простатната карциномна тъкан и такава с ДПХ, сравнявашо резултати след радикална простатектомия при локализиран простатен карцином чрез имуноистохимичен анализ на пролиферативните растежни фактори и тяхната възможност да функционират като прогностичен маркер за типа на диференциация на тумора, доказани чрез резултатите, потвърдени в Катедрата по патоанатомия към Университетска болница „Света Марина“ - Варна.
2. За пръв път се прави анализ между антропометричните параметри на пациентите и корелативната им връзка с експресията на невротрофините и техните рецептори в простатната жлеза.
3. За пръв път се прави комбинирана оценка на експресията на BDNF и NGF в зависимост от стойности на Gleason score + PSA + cTNM.
4. Демонстрира се сигнificantна пропорционална зависимост на експресия на BDNF и NGF в полза на карциномната тъкан спрямо бенигнената в един и същи препарат.
5. Представят се оригинални данни за корелативна зависимост между количествената експресия на невротрофините в простатата и перипростатната адипозна тъкан спрямо: обем на жлезата, Gleason score, PSA, pTNM, Grading.
6. Документира се комплексната експресия на растежни фактори BDNF и NGF и техните рецептори TrkA,B в простатната и адипозната тъкан, разположена около нея като важен паракринен орган.
7. За пръв път е обсъдена възможността за откриване на тези невротрофини в серума на пациенти с предполагаем КП, както и в урината по метода на масажиране на простата и ексфолиране на простатни клетки, след което с моноклонални антитела да се установи пътността на експресия на NGF и BDNF и възможността му да се използва като прогностичен маркер за метастазиране на простатния карцином.

фосфорилирането на тирозина, което пък супресира пролиферацията на туморните клетки при карцинома на гърдата.

Най-вероятно и на това се дължи експресията на TrkA и p75 receptorите и още по-демонстративната експресия на NGF при повечето от туморните клетки при карцинома на гърдата, и тяхното инхибиране води до намаляване на туморния размер при преклинични модели. За съжаление другите невротрофини BDNF, NT4/5, NT-3 и тяхната продукция не показват апоптотичен ефект при карцинома на гърдата *in vivo*.

За да се изясни действието на тези адипокини е необходимо да се представи теорията възникнала преди повече от тридесет години, за наличие на междуклетъчни взаимодействия.

Първоначалната идея вероятно е заимствана от свойствата притежаващи стволовите клетки. Стволовите клетки са недиференциирани клетки със специфична характеристика. Във феталния период отделните стволови клетки на различните тъкани се диференцират в отделни органи. В полово зрели организми, стволовите клетки се намират в различни органи, като тяхната функция е най-вероятно замяна на клетки, в резултат на физиологичната им обмяна или при патологични обстоятелства. Последователността от различни процеси води до образуването на нови неврони в мозъка при възрастни и този процес се означава като „nevrogenеза при възрастни.“

3. Цел и задачи на настоящата работа

Цел:

Да се установи и оцени имунохистохимичната плътност на експресия на невротрофините NGF и BDNF, както и тирозин киназните им рецептори TrkA, TrkB, p75, които регулират стромно-епителните взаимодействия и тяхната фундаментална роля за възникване и прогресия на простатния карцином според pTNM стадия на пациента в перипростатната, предната периректална мастна тъкан и епителните клетки при пациенти с простатен карцином. За постигане на тази цел бяха поставени следните задачи:

Задачи:

Първата група включваща задачи свързани с хирургичната и онкологична преценка на оперираните пациенти. Хирургична оценка на оперираните пациенти се състоише в:

- ❖ метод на използваната оперативна процедура;
- ❖ онкологични критерии;
- ❖ оперативно време;
- ❖ кръвозагуба;
- ❖ кръвопреливане;
- ❖ постоперативни усложнения;
- ❖ периоперативни усложнения;
- ❖ продължителност на катетеризация;
- ❖ среден болничен престой;
- ❖ еректилна дисфункция.

За целта се извърши подбор на пациенти с предварително установлен локализиран КП и те се разпределиха в две групи в зависимост от хирургичните критерии и имунохистохимичната експресия на растежните фактори и техните рецептори.

1. Да се извърши подбор на пациенти с локализиран КП, Gleason score <> 7, PSA <> 20 G <> III, тегло на простата > < 60 g и се разпределят в групи:
 - I. Група пациенти с Gleason score < 7, PSA<20, G I-II, cTNM 2b-c, възраст < 60 г., големина на простата 60 g.
 - II. Група пациенти с Gleason score >7, PSA>20, G III-IV, cTNM>2c, възраст > 60 г., големина на простата над 60 g.

на туморните клетки тяхната експресия вероятно моделира условията и играе роля на развитие или диференцирането на клетките. Експресията на TrK са моделиращи условия за посоката на процеса растеж или диференциация.

8. Заключение

Все повече се използва таргетната терапия за лечение на неоплазмени процеси. Употребата на инхибитори на растежните фактори бързо се превръща в обещаваща лечебна стратегия при различни солидни тумори.

Важно е да се отбележи, че след започната антиандрогенна терапия е неизбежна появата на хормон-рефрактерна резистентност. Вече има оформена нозологична единица „кастрат резистентен простатен карцином“, която се появява при пациенти, при които е приложена самостоятелно хормонална терапия. Често имаме и комбинирана хормонова и цитостатаична терапия, при която в течение на времето също се изчерпват възможностите ѝ. Това води до възникване на нови стратегии, позволяващи преодоляването на резистентността чрез таргетираното атакуване с медикаменти на ендотелни и стромни клетки с малко или без унаследени мутации (Karbel R. et al. 1991)

Съществуват доказателства, подпомагащи увеличаването ефективността на цитотоксичната химиотерапия в комбинация със специфични ангиогенни инхибитори в резултат на съдовото нормализиране и подобряване на налягането в интрутуморната или интерстициалната течност, позволяващо по-добро разпространение на химиотерапевтичното средство в засегнатата област (Cerber et al. 2005, Jain et al. 2005).

От нашето проучване доказвахме, че експресията на BDNF и NGF е ограничена в областите с инвазивен карцином и значително е по-слаба в заобикалящата простатна тъкан само с хиперплазия. Подобни наблюдения подкрепят нарастващия фокус върху потискането им като терапевтична цел при КП.

Пациенти с повищена експресия на TrkA рецептори имат добра прогноза и нисък риск от развитие на метастази в по-късен етап от развитие на заболяването, а тези със силна експресия на TrkB и BDNF според нас са с лоша прогноза.

Протеин киназите фосфорилират тирозиновите и сериновите остатъци и активират синтеза на протеините. Протеин фосфатазите дефосфорилират и така дезактивират протеините. Протеин киназите се свързват с плазмени рецептори и това са TrK рецепторите. Диференцирането на изоформите на TrK рецепторите и тяхната експресия биха функционирали като прогностичен маркер за типа на диференциация на тумора. В мембраните

2. Хирургични критерии включваха: оперативно време, кръвозагуба, среден болничен престой, продължителност на катетеризация, употреба на аналгетици, пери- и постоперативни усложнения
3. Да се определи БМИ на пациентите.
4. Да се определи онкологичния статус на пациентите в двете групи – Gleason score, позитивен маргинален срез, лимфни възли.
5. Имунохистохимичен анализ на препаратите за експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75NTR.
6. Да се определи полуколичествената експресия на невротрофините и техните рецептори, посредством измерване на плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 p75NTR.
7. Да се извърши корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и възрастта на пациентите <> 60 г.
8. Да се извърши корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и БМИ.
9. Да се извърши корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и големината на простатата под и над 60 g.
10. Да се извърши корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и клиничния стадий с TNM и G.
11. Да се извърши корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и PSA<>10.
12. Да се извърши корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и
13. Въз основа на направения анализ на резултатите да се установи и докаже, че предполагаемата различна експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 в стромните и епителните клетки на простатната жлеза в двете групи пациенти играят важна роля за уголемяването при хиперплазията и растежа на туморните клетки при карцином на простатната жлеза.
14. Да се извърши комбинирана хистохимична оценка на BDNF, NGF в зависимост от PSA<>10 Gleason score, клиничен стадий.

Тъй като BDNF и NGF са основните невротрофии, отговорни за клетъчната пролиферация, диференциация и апоптоза, нарушеното взаимодействие на сигналите между епителните и стромните клетки в жлезата е вероятният патофизиологичен път за развитие и метастазиране на простатния карцином.

4. Материал и методи

Структура на изследването

През периода 2010 – 2016 г. в Урологичната клиника на болница „Св. Анна“ във Варна беше извършена радикална простатектомия по повод на локализиран карцином на простатата на 257 пациенти.

Пациентите бяха оперирани по две различни техники – лапароскопски и отворен подход, като разпределението бе на принципа на случаен подбор.

Проучването е моноцентрично, ретроспективно по отделни параметри, като еректилна дисфункция е проспективно.

Пациентите бяха разпределени в две групи в зависимост от стойностите на PSA <> 20, <pT2NOM0> pT2N0M0, <GII> GII и Gleason score <> 7.

Методика за доказаване експресията на невротрофините

Тъканините препарати бяха рутинно обработени за H&E оцветяване и пероксидазна/антiperоксидазна имунохистохимия със заешки поликлонални антитела, производство на Santa Cruz Biotech. Експресията на NGF, BDNF, TrkA, се доказваше с миши вторично моноклонално антитяло, производство на EnVision Flex Vis Syst; с DAKO се доказваше експресията на p75.

Пътност на експресия на NGF и BDNF се установяваше посредством броенето на епителните клетки, свързани с антигена, в които пътността се изчисляваше на 20 полета. Проследяваше се и дали има развитие на метастази при пациентите след 24 месеца. Определяше се пътност на експресия на растежните фактори от материал, взет интраоперативно от пациенти с простатен карцином:

1. Мастна тъкан:
 - a. супрапубично перипростатна мастна тъкан се отбелязваше с буквата (P);
 - b. периректално предна периректална мастна тъкан се отбелязваше с буквата (R);

9. TrkA експресира силно в простатната карциномна тъкан, разположена ректално и слабо в мастната тъкан. Няма експресия в аденоцитозната простатна тъкан и контролната проба има слаба експресия в периректалната мастна тъкан.

10. TrkB рецептор в мастната тъкан липсва, а в ганглийната и карциномните тъкани е слаба. В карциномната тъкан експресията на BDNF е най-слаба и липсва експресия на специфичния му рецептор TrkB.

11. Комбинирана оценка между експресия NGF и BDNF и трите фактора Gleason score, PSA, pTNM показва, че експресията на невротрофините се засилва с покачване на серумните нива на PSA, Gleason score и патоанатомичния стадий. Експресията на рецепторите обаче е различна за NGF и запазва тенденцията си, а за BDNF тя е обратна.

При Gleason score ≥ 7 , PSA > 20 , с TNM $\geq T2M0N0$ и слаба експресия на NGF и BDNF, вероятността от биологична прогресия на ПК е голяма и това би трябвало да промени терапевтичното поведение.

Обратно при стойности на Gleason score ≤ 7 , PSA < 20 , с TNM $< T2M0N0$ и слаба експресия на NGF и BDNF при тези пациенти се касае за локализиран ПК и оперативното лечение ще е достатъчно. При тях няма да се налага допълнителна хормонотерапия, рентгенова терапия или химиотерапия.

Комбинираната оценка дава възможност да се определи група от пациенти с нисък риск от развитие на лимфни метастази, поради което те не се нуждаят от разширена тазова лимфна дисекция.

7. Изводи

1. Ако обиколката на талията се промени с 1 см спрямо обиколката на ханша, степента на Gleason score се променя с 0.023, коефициентът на регресия е 0.313. Това е слаба, но позитивна зависимост.
2. При увеличаване на обиколката на шията с 1 см, Gleason score се увеличава с 0.39. Проверката за адекватност е нулева, което показва алтернативна значимост.
3. При корелация между трите антропометрични показатели – обиколка на талия, шия, ханш, Gleason score се увеличава с 0.034. Тенденцията е към увеличаване на патоанатомичния стадий, но тази корелация е вярна само при съвместно действие на трите променливи. Разглеждани поотделно, тези променливи не показват зависимост спрямо промяната на патологичния стадий.
4. Отношението между промяната на Gleason score в зависимост от БМИ като корелация е слаба и обратна; не е статистически достоверна. Дължи се на факта, че БМИ е отношение между тегло и височина, което е относително постоянно в продължение на човешкия живот.
5. NGF се експресира едновременно в мастната периректална и перипростатна тъкан, експресира силно в епителните и стромно-простатни клетки. NGF експресира слабо в мастната тъкан при PSA < 20, разположена периректално. NGF експресира слабо в простатната тъкан, когато имаме по-малко от 5% карцином в изследвания материал. NGF не експресира в контролната проба.
6. BDNF експресира само в простатните епителни клетки и слабо в мастната тъкан. Тя е изключително силна в областите с инвазивен простатен карцином и липсва в жлезите с ДПХ. Няма експресия на BDNF в стромната тъкан и контролната проба. Това предполага, че плътността на експресия на BDNF би бил прогностичен фактор за агресивността на процеса.
7. BDNF експресира изключително силно в микросъдовите и глиални тъкани. Тя се свързва с метастазирането на солидните тумори и се счита за негативен прогностичен индикатор. Средният брой на микросъдова експресия на BDNF е 76.8 микросъдове (медиана 66); много по-голям брой от 39.2 микросъдове в сравнение с експресията на BDNF в тъканите с ДПХ.

- v. ретропубична мастна тъкан беше вземана от същите пациенти за контрола и се отбелязваше с буквата (C).
2. Плътност на експресия на BDNF и NGF в карциномната тъкан.
3. Плътност на експресията на BDNF и NGF в доброкачествената простатна тъкан.
4. Сравняване на плътността на експресията на BDNF и NGF между карциномна и нормална простатна тъкан.
5. Плътност на експресията на BDNF и NGF при пациенти с наличие на близки метастази и голям риск спрямо пациенти без наличие на метастази.

Установяване на експресията на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75, извършваше по следния начин. Всички препарати бяха рутинно оцветявани с хематоксилин/еозин H&E за предварителна хистологична оценка и определяне границите на патологичната, нормалната простатна тъкан, перипростатната адипозна тъкан, разположена супрапубично, перипростатна мастна тъкан, разположена периректално и контрола от мастна тъкан, разположена под симфизата. Контролната мастна тъкан беше вземана интраоперативно, а трайният препарат се вземаше след приключване на операцията. Стремежът беше да се взема материал тип „сандвич“ като препаратът трябваше да съдържа мастна тъкан, нормална простатна тъкан и карциномно променена простатна тъкан. Нивата на невротрофините и техните рецептори се установяваха посредством имунохистохимичен тест и посредством моноклонални антитела (Diagnostic Products. Los Angeles CA, USA), а чрез турбидиметричен тест се определяха серумните нива, като всичките тестове се употребяваха в зависимост от инструкциите на производителя.

Собствен клиничен материал

Изследвани бяха 257 пациента с карцином на простатната жлеза, чрез формула бе определен обемът на извадката и оценката на относителния дял.

След изключване на пациентите, неотговарящи на критериите, се определи окончателна извадка от 208 пациенти, лекувани по двата оперативни подхода, 27 лапароскопска и 157 конвенционална радикална простатектомия. Изследването е експериментално – теоретично. Преди събирането на данните има непосредствено въздействие върху обекта,

извършена е оперативна намеса по две различни методики, отворена радикална простатектомия и лапароскопска радикална простатектомия. По отношение на точния момент на събиране на данните, изследването е ретроспективно. По вид проучването е наблюдалено, аналитично, тип случай – контрола. Всички пациенти бяха стадирани по следните еднакви критерии: диагностицираните тумори да съответстват на стадий pT2a.b по pTNM класификацията, Gleason Score ≤ 7 , хистологичен стадий $\leq G3$ (grade), общ PSA да е ≤ 10 mg/mL, в отделни случаи беше допускано и стойности до 40 mg/mL. Тези пациенти бяха равномерно разпределени в две групи.

Първата група включваща 179 пациенти, при които беше извършена конвенционална радикална ретропубична простатектомия РРП по Walsh. Всяка процедура започваше с пелвична лимфаденектомия, добре утвърдена в нашата клиника, и се извършваше от опитни хирурги, като нямаше разлика в оперативните резултати при нито един от пациентите.

При 27 пациенти се извърши екстраперitoneална лапароскопска радикална простатектомия (ЛРП), предлагана от няколко автори. При всеки пациент беше извършена пелвична лимфна дисекция от опитни хирурги, като отново нямаше разлика в оперативните резултати на всички пациенти.

Клиничните данни включваха следните критерии: продължителност на оперативната процедура, интраоперативна кръвозагуба, честота на хемотрансфузии, компликации, болничен престой, продължителност на катетеризацията.

От онкологична гледна точка, оценяваните критерии бяха: Gleason score, патологичен стадий G; статус на маргиналния срез (резекционна линия).

Всички пациенти бяха предварително уведомени и им беше взето писменото съгласие според Хартата за правата на пациента от 1986 г.

Материалът за изследване на невротрофините и техните рецептори се вземаше интраоперативно от таргетните зони, които за нас представляваха интерес.

Комбинираната оценка при тези пациенти дава възможност да се определи група от пациенти с нисък риск от лимфни метастази, поради което те не се нуждаят от разширена тазова лимфна дисекция.

Тъй като от направеното от нас проучване се доказва, че експресията на невротрофините при пациенти с висок Gleason score е много силна (+++) не само в тумора, а и в самите нерви, това означава, че повишената експресия в ганглийната тъкан е сигурен фактор и асоциира с повишен риск от лимфни метастази. От това следва, че експресията на NGF и BDNF като предиктор за развитие на лимфни метастази би бил сигурен критерий.

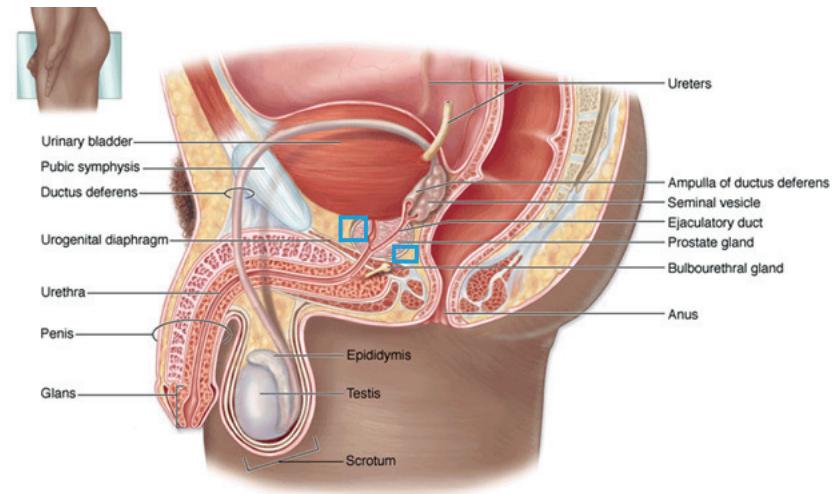
Благодарение на комбинираната оценка с използването на масовия скрининг на ПСА вече се открива много по-рано карцином в ранни стадии на болестта, когато туморите са с малки размери и не се палпират често и след неколкократни отрицателни биопсии. Да не забравяме, че патологите са на различно мнение: когато има минимално количество тумор в препарата, даже когато то е по-малко от 5% или по-малко от 1 mm от изследвания цилиндър, се счита за минимален ПК и това се явява голям диагностичен и терапевтичен проблем както за пациента, така и за поведението на лекара при такива случаи (Partin et al. 1990).

PSA се увеличава с напредването на стадия, но самостоятелно той не може да служи като маркер за патологичния стадий, тъй като преценката само по този показател е твърде неточна. Неговата стойност може да се увеличи и при доброкачествена хиперплазия, влияе се и от други фактори. Затова и достоверността на този тест е само 30%. Доказано е, че комбинацията от PSA, Gleason score и клиничният стадий предсказва много по-точно патологичния стадий, отколкото всеки един от тези показатели, взети поотделно (Partin A et al 2001).

Броят на позитивните биопсични цилиндри е фактор, който независимо предсказва наличието на екстрапростатно разпространение, позитивни хирургични граници и наличие на позитивни сентинелни лимфни колектори.

Доказахме корелация между БМИ, обем на простата, ПСА, Gleason score, и плътността на експресия на невротрофините, както и използването им в комбинация. Тези три фактора водят до създаването на прогностичен модел с висока позитивна предиктивна стойност. Комбинираната оценка може да бъде от полза при опит да се свърже експресията на изследваните от нас невротрофии и крайния патологичен стадий с изхода от радикалното оперативно лечение, тъй като при Gleason score ≤ 6 , 70% от пациентите имат локализирано заболяване (Narayan P et al. 1995). При силна експресия на NGF и BDNF, Gleason score ≥ 7 , PSA >20 , с TNM \geq T2M0N0 вероятността от биологична прогресия на ПК е голяма и това би трябвало да промени терапевтичното поведение.

Обратно, при пациенти със стойности на Gleason score ≤ 7 , PSA < 20 , с TNM $<$ T2M0N0 и слаба експресия на NGF и BDNF се касае за локализиран ПК и оперативното лечение ще е достатъчно. При тях не се налага допълнително хормонотерапия, рентгенова или химиотерапия терапия.



Фиг. 1. Сагитален анатомичен разрез, показващ таргетните зони, от които се взема хистологичен материал

- Субпубична мастна тъкан, която се прие за контрола, отбелязва се с буквата C;
- Перипростатна мастна тъкан, заедно с капсула на простатата, отбелязана с буквата P;
- Периректална мастна тъкан, заедно с капсула на простатата, отбелязана с буква R.

Табл. 1. Характеристика на пациентите преди, по време и след ЛРП и РРП

| | Лапароскопска простатектомия | Ретропубична простатектомия | P |
|---|------------------------------|-----------------------------|--------|
| Брой пациенти | 27 | 179 | 208 |
| Средни стойности години | 62.9 (42-74) | 64.8 (52-76) | |
| Средна стойност и преоперативно PSA | 7.9 (2.4-10.2) | 7.25 (4.4-11.3) | |
| Gleason score (биопсична) | 5.7 | 5.3 | |
| Преоперативен клинически стадий | | | |
| T1a | 0 | 6 | |
| T1c | 79 | 75 | |
| T2a | 14 | 12 | |
| T2b | 7 | 7 | |
| Средни стойности на продължителност в min | 180 (120-240) | 120 (80-190) | < 0.05 |
| Загуба на кръв в ml | 200 (100-700) | 550 (200-1900) | < 0.05 |
| Трансфузии в % | 3% | 9% | |
| Усложнения в % | | | |
| лезия на ректум | 1.8 | 1.6 | |
| лиммоцеле | 3.2 | 2.9 | |
| супорация | 3.1 | 3.4 | |
| ревизия | 1.25 | 2.5 | |
| Продължителност на катетеризация в дни | 8,9 | 10.2 | < 0.05 |
| Обезболяване | 33 | 35 | |
| Среден болничен престой | 9.4 | 11.2 | |
| Хистологични параметри | | | |
| Средна тегло на простатата, g | 37 (18-72) | 42.3 (20-120) | |
| Средни стойности на Gleason score | 6.4 | 5.7 | |
| Патологичен стадий в % | | | |
| pT2a | 16% | 19% | |
| pT2b | 27% | 22% | |
| pT2c | 23% | 25% | |
| pT3/a/b | 33% | 34% | |
| Позитивни лимфни възли % | 0 | 1.67 | |
| Позитивна резекционна линия % | | | |
| pT2 a/b/c | 9.8 | 12.6 | |
| pT3a/b | 29 | 31 | |

експресията на NGF в туморната тъкан е (+++), а така също и в тъканите с доброкачествена простатна хиперплазия; тя е (+++) и в ганглийната тъкан. Силно положителна е и в перипростатната и периректална мастни тъкани. Експресията е силна и в специфичният TrkA рецептор. Експресията на BDNF е слаба (+) в ДПХ тъканите, а в туморната тъкан е умерена (++) . Експресията на BDNF в перипростатната и периректалната мастна тъкан е слабо положителна (+), както и експресията BDNF в ганглийната тъкан. Експресията на специфичния за BDNF TrkB рецептор в мастната тъкан липсва (0), а в ганглийната и карциномните тъкани е слаба (++) .

Във втората група влязоха общо 78 пациенти с PSA \geq 20, Gleason score \geq 7, с TNM \geq T2M0N0. С покачване на недиференциацията на тумора при Gleason score \geq 8, PSA \geq 20, с TNM \geq T2M0N0 експресията на NGF се засилва и е силно положителна (+++); понижава се експресията на рецептора TrkA. В карциномната тъкан експресията на BDNF е най-слаба (+) и липсва експресия на специфичния му рецептор TrkB (0). Колкото по-злокачествен е процесът, толкова експресията на специфичните им рецептори намалява.

Комбинираната оценка на трите фактора показва, че експресията на невротрофините се засилва с покачване на серумните нива на PSA, Gleason score и патоанатомичния стадий. Експресията на рецепторите обаче е различна за NGF, запазва тенденцията си, а за BDNF тя е обратна. Нашето изследване се опита да потърси връзка между експресията на невротрофина и рецепторите за тях. В някои случаи нивата им са повисоки при злокачествените тъкани в сравнение с нормалните. Вероятно концентрацията на рецепторите зависи от клетъчния вид и от степента на диференциация на тумора.

Знаем също, че комбинираната оценка между Gleason score, ПСА и клинически стадий се използва за прогностичен критерий на риска от прогресия на заболяването след рентгенотерапия. Комбинирана оценка за прогноза на развитието на заболяването се проучва от много автори. Имунохистохимичното изследване (ИХХ) и комбинираната оценка подпомагат диференциалната диагноза на метастазиране в лимфните възли и костите, като доказва епителния произход на първичния тумор. Комбинирана оценка между PSA/Cytokeratin се предлага от много автори (Shariat et al. 2003). Те показват, че пациентите с позитивна експресия на цитокератин и високи стойности на ПСА са имали висок риск от развитие, биохимична прогресия и развитие на метастази.

попаднаха 17 пациенти със стадий G3. От направения анализ се вижда, че NGF има слаба експресия в мастната тъкан в областите, разположени периректално и вентрално в патоанатомичен стадий G1, като тя става умерено положителна с напредване на недиференцираността на процеса. Същата тенденция се наблюдава и при експресията на невротрофина в простатно-епителните клетки. Тя е слаба при високо диференцираните туморни клетки, засилва се до умерена при G2 и е силно положителна в стадий G2, G3.

При експресията на BDNF Grading < > G2 зависимостта е следната: тя е умерена при Grading < G2 и силно положителна при Grading > G 2.3 при анализ на експресията на специфичните рецептори за изследваните от нас невротрофини TrkA и TrkB Grading < > G2.

За TrkA при 19 пациенти с Grading = G1 експресията на рецептора в перипростатната адипозна тъкан, разположена периректално, перивентрално е (+); при 34 пациенти с Grading = G2 е слабо положителна (++) в мастната тъкан. При изследването на експресията за TrkA в перивентралната, периректалната, хиперплазидалата и карциномната тъкан експресията е еднаква и тя е (++) .

При 17 пациенти с Grading G3 експресията на рецептора е умерена (++) към силно положителна (+++) в изследваните от нас области.

Това доказва, че връзката между експресията на рецептора TrkA и NGF в адипозната тъкан при различен Grading е пропорционална в зависимост от промяната на степента на диференциация. Същото важи и за експресията в простатно-епителните клетки.

При експресията на TrkB при Grading =1, Grading =2 липсва експресия в адипозната тъкан (0); слабо положителна е при по-недиференцирания хистопатологичен стадий и се засилва при Grading = 3. В простатната тъкан тази зависимост е слаба и обратна.

Комбинирана оценка на експресията на BDNF и NGF в зависимост от стойности на Gleason score + PSA + cTNM

Общо 257 пациенти бяха разпределени в зависимост от стойности на PSA ≤ 10 , PSA ≥ 20 , Gleason $\leq \geq 7$, с TNM $\leq \geq T2M0N0$ в следните групи:

В първата група влязоха общо 179 пациенти с PSA ≤ 10 Gleason score ≤ 7 , TNM $\leq T2M0N0$. При Gleason score ≤ 6 , PSA ≤ 10 TNM $\leq T2M0N0$

Методи на изследване

Клинични методи на изследване

Анамнеза – обхваща симптоми, привличащи вниманието на пациента, субективни оплаквания като болки и парене при уриниране, чести позиви за уриниране, никтурия.

Клиничен преглед, включващ:

- ❖ Ректално туширане, определящо палпаторна големината и наличие на променени участъци в простатната жлеза;
- ❖ Ехографско изследване в две различни проекции: сагитална и трансверзалния, чрез която се измерваше обем на простатата и наличието на хетерогенни зони;
- ❖ Транс ректална TRU – CUT биопсия под ехографски контрол.

Беше извършвана по строго определена схема на вземане на материала като всеки номер на „цилиндъра“ означава точно определена зона от жлезата, което позволява предварително прецизиране на оперативната техника.

Простатната биопсия се вземаше стандартно: по 10 биопсични „цилиндъра“ + 2 от съмнителните участъци, а при ребиопсия – по 10 биопсични „цилиндъра“ + 4 трансверзално + 2 „цилиндъра“ от съмнителните участъци.

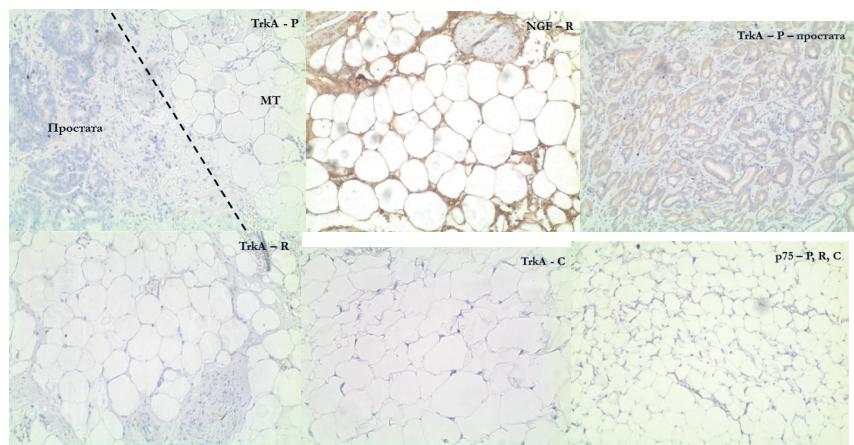
Преимуществено е ползван документален метод за регистриране на данните на пациентите, които са взети от клиничната история на заболяването на пациентите в Клиниката по урология към МБАЛ „Св. Анна“ - Варна. Основният документален източник е история на заболяването на пациентите, оперативният протокол, имунохистохимичния анализ на невротрофините и техните рецептори, изследвани в патоанатомичната лаборатория към Университетска болница „Св. Марина“ - Варна. Документалният метод е съчетан с метода на клиничното интервю и наблюдение, осъществено от лекуващия лекар с цел потвърждаване на достоверността.

Хистологични методи на изследване

За морфологична диагноза (типизиране, определяне на дълбочината на инфильтрация и хистологичния грейдинг, васкулярна и периневрална инвазия) изследваният материал се фиксираше в 10% буфериран разтвор на формалин, както и материалът, взет за изследване на резекционната линия. Резултатите са изследвани в патоанатомичната лаборатория към Университетска болница „Св. Марина“ - Варна.

Имунохистохимични методи на изследване

За определяне на имунохистохимичната експресия на невротрофините BDNF и NGF и техните рецептори TrkA,B и p75 се използваха моноклонални антитела на фирмата Dako En Vision TM FLEX, High pH, (Link) и стандартна имунохистохимична техника.



Фиг. 2. Демонстрира експресията на NGF, TrkA, B и p75 в перипростатна адипозна тъкан, разположена вентрално, ректално и в контролата проба

(Имунохистохимична микрография на пациент Й.Д. ИЗ №00359
Хистологичен резултат №320031-41. От 12.01.2012 увеличение x 100)

Това са моноклонални миши антитела EAB 903 (basal cell-specific antibody). Методиката на извършване на имунохистохимичния анализ, която беше

бъдеща посока, в която ние трябва да продължим изследванията си. Вероятно под въздействието на андрогените се променя броят на TrkA и TrkB рецепторите върху мембрани на стромните клетки, междинните клетки променят митогенната си активност и се усилва продукцията на NGF и BDNF. Това пък разкъсва стабилните връзки между епителните клетки, намалява стабилното им закрепване спрямо базалните клетки. Така стабилното равновесие под въздействието на ендокринната и паракринна регулация, влияеща се от епигенетичните въздействия, се нарушава и започва неконтролираната пролиферация, диференциация и апоптоза. Дали това не е един вероятен патогенетичен път за възникване на това коварно заболяване?

Корелационен анализ между плътността на експресия на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75 и G < > II

Степента по Gleason score е много важен показател за хода на биологичната прогресия на простатния карцином. Често Gleason score по-голям от 7 е контраиндикация за оперативно лечение, но степента на диференциация или хистопатологичната оценка не е също за пренебрегване. Предоперативният Gleason score се използва и за предвиждане на биохимична прогресия или рецидив след операция, както и на риска от специфично причинена от карцинома смърт. Това ни накара и да обсъдим и тази зависимост спрямо експресията на изследваните от нас невротрофини.

Средната стойност на хистопатологичната оценка в групата, подложена на отворена операционна техника, беше 4 със стандартно отклонение 1.19, при което тези пациенти се стадират в стадий G2a периоперативно. Постоперативно средната стойност бе 4, при стандартното отклонение 0.55, което показва, че няма промяна на хистопатологичнияperi- и постоперативен грейдинг, който си оставаше в стадий G2a.

Лапароскопската група също показва пред- и постоперативно еднакъв стадий G2a. Получените стойности преди операцията бяха 4, при стандартно отклонение 1.2, а след операцията отново – 4, и стандартно отклонение 0.56, което говори, че също не се променяше стадият на болестта.

В групата с експресия на NGF при Grading < G 2 попаднаха 43 пациенти, от които: 19 с Grading G1; 34 пациенти с G2. В групата с Grading > G2

пациенти беше установен патоанатомичен стадий над границата в стадий pT3a/b. В групата, подложена на лапароскопска оперативна процедура, това се наблюдаваше при 5-ма пациенти.

Проследени бяха 49 пациенти в Стадий < T2M0N0 от които: 18 пациенти в Стадий < T1cM0N0, 17 пациенти в Стадий < T2aM0N0, 14 пациенти в Стадий < T2bM0N0.

В другата група бяха общо 26 пациенти: 17 пациенти в Стадий < cT3aM0N0, 9 пациенти в Стадий < cT3bM0N0.

Експресията на NGF при Стадий < T2M0N0 се засилва с промяна на патоанатомичния стадий. Отчетлива е пълността на експресия в периректалната простатна тъкан спрямо перивентралната.

Обратна е зависимостта на експресия на BDNF и неговият специфичен рецептор TrkB.

При BDNF в зависимост от промяната Стадий < > T2M0N0, зависимостта на корелация е обратна.

TrkA експресира силно при диференцираните тумори, а намалява при пациенти с недиференцирани тумори. При TrkB в Стадий > T2M0N0, при тази зависимост стойността на корелация е обратна, при недиференцираните тумори липсва експресия на TrkB.

Отново способността на неопластичната тъкан да се свързва с NGF и BDNF е намалена в сравнение с доброкачествената хиперплазирана тъкан. Вероятно намалява местата за свързване на невротрофините и корелира с намалената диференциация на тумора. Нивата на рецепторите са по-високи при добре диференцираните тумори и намалени при слабо диференцираните. Вероятно това се дължи на експресия на променени TrkA и TrkB. Може да се дължи на пълно отсъствие на генна експресия за тези рецептори или пък на интернализиране на рецепторния комплекс. Дали няма връзка и с андрогените, това също би трябвало да се обсъди? Андрогените вероятно биха модулирали производството на растежни фактори. Не е ясна тенденцията, която се отразява и действителната разлика между нормална и карциномно-променена простата. Трябва да се уточни дали клетки, стимулирани с растежни фактори, са андроген чувствителни, а тези, които нямат митогенна активност, са андроген нечувствителни. Това са въпроси, които чакат своя отговор и подлежат на бъдещи проучвания. Взаимодействието между паракринната регулация, която е обект на нашето проучване и ендокринната андрогенна регулация, през която се постига регресия при лечението на простатните тумори, е

използвана, следващо указанията на производителя и е представена детайлно:

1. Парафиновото блокче се поставя в Dako En Vision TM FLEX Target Retrieval Solution 1:50, разреден с дестилирана вода.
2. Залива се с 1.5 литра вода.
3. Загрява се до 65 °C.
4. Парафин-фиксированото блокче се поставя в предварително подгответната смес на Dako En Vision TM FLEX Target Retrieval Solution и се поставя за 20 min на 97 °C в инкубатор.
5. Охлажда се до 65 °C.
6. Връща се в Autostainer и незабавно се подсушава в съд/контейнер (PT Rinse Statin, Code PT 109) на стайна температура.
7. Включва се отново с Dako En Vision TM FLEX Wash Buffer (20x) за 1 – 5 min.
8. Срезът се поставя в Autostainer на стайна температура без да се изсушава.
9. След привършване на реакцията се дехидратира. След депарафинизация и дехидратация с буферирана вода тъканта трябва да се подгответ за оцветяване.
10. Поставя се препаратът в разтвор на Dako En Vision TM FLEX разреждане 1:50 в дейонизирана вода.
12. Срезът се поставя в течността и се затопля до 65 °C.
13. Следва поставяне на среза върху предметно стъкло със силиконово покритие.
14. Затопля се до стайна температура а след това до 97 °C за 20 min.
15. Следва охлаждане на препарата до 65 °C.
16. Връща се препарата в PT Link контейнер Code PT 109 с Dako En Vision TM FLEX разреждане (20x) за 1 – 5 min.
- След депарафинизация и хидратация с буферирана вода е необходимо да се извърши Heat-induced epitope retrieval (HIER).
17. Препаратът се поставя в En Vision TM FLEX разтвор разреждане (50x).
18. Загрява се до 95 – 99 °C.
19. След това се охлажда до стайна температура.

20. Отново се поставя в En Vision TM FLEX за 20 min. В разтвор и се загрява до 95 – 99 °C за 20 min.
21. Връща се във ваната и се промива с вода за 20 min.
22. Декантира се от разтвора на En Vision TM FLEX и се оставя да изсъхне на стайна температура.
23. Отново се поставят в En Vision TM FLEX буфериран разтвор с разреждане (20x) за 1 – 5 min.

Така препаратът е оцветен с моноклонални антитела и може да се определя експресията на растежните фактори и техните рецептори. Случайте бяха селектирани да демонстрират сигнификантни зони от препаратите с наличие на туморни клетки, периневрална инвазия и бенигнени простатни жлези. Формалин фиксираните и в парафин включените тъкани бяха сецирани през 5 микрона.

Определянето на експресията на невротрофините ставаше посредством видео камера, комбинирана с дигитална система с голяма резолюция. Препаратите са сканирани на система *Spliced Scene Aperio RT2 Leica* с програма за обработка на препаратите *Aperio Image Scope Version 12.2*. Качеството на образа се подобряваше чрез оптимизиращ софтуер (Bioscan Inc.) Данните се обработваха посредством Microsoft Excel и се анализираха със статистическа програма.

Пътността на експресията на невротрофините и техните специфични рецептори се определяше полуку quantitatively, при което визуално се определяха три степени на експресия. Отрицателна експресия отбелязахме със знака (0). Положителна експресия, отбелязахме със знака (+). Средно силна експресия отбелязахме със знака (++) и силна експресия отбелязахме със знака (+++). Количество броене на клетки се извършваше под микроскоп при увеличение x100, като на тази площ зрителното поле е 2 mm^2 . Съпоставяхме интензитета на експресия в карциномната тъкан спрямо силата на експресия в бенигнената простатна тъкан. Използвахме броене на клетки върху поле с площ от 0.25 mm^2 . Броенето се осъществяваше мануално върху компютърния образ, като клетките с експресия бяха оцветени с черно или тъмно кафяво, докато тези, при които нямаше експресия, бяха светли.

Данните се обработваха посредством изчисляването на броят на клетките върху 1 mm^2 . Валидността на нашата методика се изчисляваше на базата на

Концентрацията на рецепторите за NGF-TrkA комплекса, който се образува между тях, както и повишаване на неговата концентрация, явно варира от клетъчния вид и степента на диференциация на тумора. Слабо диференциалните тумори на простатния карцином имат по-високи нива на рецепторите и друга степен на хистологично развитие на тумора. Способността на неопластичната тъкан да се свързва с NGF е намалена в сравнение с доброкачествената хиперплазирана тъкан. Спадането на броя на местата за свързване за NGF корелира с намалената диференциация на тумора. Така нивата на рецепторите са по-високи при добре диференцираните тумори и намалени при слабо диференцираните. Вероятно това се дължи на експресия на променени TrkA и TrkB рецептори вследствие на пълно отсъствие на генна експресия за тези рецептори или пък на интернализиране на рецепторния комплекс.

Корелационен анализ между пътността на експресия на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75 и клиничен стадий pTNM <> II

Следваща зависимост, която беше проследена, е между патоанатомичния стадий и пътността на експресия на изследваните от нас невротрофии и специфичните им рецептори. При изследваните от нас пациенти имаше промяна на клиничния стадий към по-висок в трайният препарат. Лапароскопската група получиха средна стойност 3 със стандартно отклонение от 1.37 предоперативно и 7 със стандартно отклонение (0.95) постоперативно. Това е пре- и постоперативният стадий на лапароскопски оперирани болни, който показва тенденция към промяна на стадия в по-напреднал стадий на болестта, в сравнение с установения с 10-кратна биопсия стадий периоперативно. Пациентите в pT1c показват тенденция за промяна към по-недиференциран стадий, установен постоперативно патоанатомично в стадий pT2c.

Разпределението на стадия в групата, подложена на отворена операционна техника, бе предоперативно предимно в pT1c, а постоперативно в стадий pT2c.

В тази група получените резултати от биопсичното изследване се установи средната стойност 3 със стандартно отклонение 1.24) при патологичен стадий pT1c. При изследване на препаратите патоанатомично, стадият се променяше в pT2c при средна стойност 7 със стандартно отклонение 1.42. Постоперативно в оперираната по традиционен начин група при 12

При 11 от пациентите, подложени на конвенционална операционна техника, постоперативният Gleason score > 7. Когато, Gleason score е определен от пункционна биопсия, т.е. pTNM стадиран, почти винаги има разминаване с cTNM или клиничния стадий след окончателното разглеждане на целия препарат. Това разминаване се дължи и на различния субективен подход, използван от хистолога при оценка на препарата. Тъй като обикновено при пункционната биопсия карциномната тъкан е прекъсната от участъци с доброкачествена хиперплазия, различните патолози определят различна дължина на засегнатия участък. Те или измерват от най-външните участъци с фокуси от карцином, или определят цялата дължина в милиметри, или като процент все едно е налице един непрекъснат карцином. Този метод може значително да повлияе върху количественото определяне на тумора (Младенов 2017, Смилов 2017, Диагностика на простатен карцином. Фондация Урология, София 2017:335 с.)

Наше по-ранно проучване при проследени от нас 179 пациенти показва същата тенденция на покачване на хистологичния стадий към понедиференциран в трайния препарат (Евтимов Н. Системен възпалителен отговор при лапароскопска радикална простатектомия. Университетско издание, МУ-Варна 2016: 182 с.)

Експресията на NGF е (3+) при Gleason score (3+3=6) в перипростатна адипозна тъкан, което предполага по-мощна продукция на този невротрофин със засилване на недиференциацията на тумора. Заедно с това силно експресира и NGF (3+) в ганглиална тъкан. С увеличение на недиференцираността на карцинома се засилва експресията на NGF както в адипозните, така и в глиалните простатни структури. При BDNF (0) зависимостта е обратна, а в доброкачествено хиперплазирали простатни жлези – негативна.

Демонстрираната експресията на BDNF (3+) в карциномна простатната тъкан с Gleason score 3 е (3+) и е над 90 % в изследвания материал. С увеличение на диференциацията намалява експресията на TrkB както в мастната тъкан, нервната тъкан, така и в карциномните простатни структури. Експресията на TrkB е (3+) в карциномната тъкан с Gleason score (4+3=7) е (3+). С увеличение на недиференциацията се засилва експресията на специфичните рецептори за изследваните от нас невротрофии както в мастната тъкан, така и в карциномните простатни структури.

5 полета, които бяха избирани мануално или чрез компютър, по модифицирана методика на Bigler et al. 1993 (Bigler S, Deering R, Brawer M. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. Hum Pathol 1993; 24:220-6.)

Определяхме плътността на експресия върху пет полета от всеки случай. За силата на интензитета се използваше общоприетият стандарт *от един до три плюса*, което е полуколичествен метод, тъй като при всички препарати експресията на избраните от нас невротрофии и техните рецептори обхващаща почти всички клетки, което правеше броенето на клетки върху единица площ на зрително поле безсмислено. Все пак това се отдаваше в определени случаи.

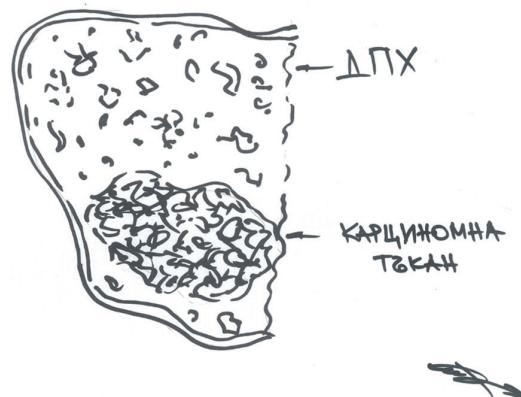
Интензитет на оцветяването е както следва (–) отрицателен = 0, (+) положителен = 1, (++) умерено положителен = 2, (+++) силно положителен = 3. Това е модифицирана методика на Habib F, Chichholm G. Department of Surgery/Urology Western General Hospital, Edinburgh, Scotland.

Всички препарати бяха оцветени стандартно с H&E, като таргетът на селектирани препарати, представен на диапозитивите, е в зависимост от хистологичния стадий по Gleason score.

Неопластичните зони бяха установявани обективно от патолозите в Катедрата по патоанатомия в МБАЛ Св. Марина“ - Варна.

В отделни случаи, когато имаше колебание в диагнозата, това се постигаше с помощта на имунохистохимичен анализ с моноклонални антитела срещу високо молекулярен цитокератин [34bE12] (Dako, Carpinteria, CA), посредством използваната стандартна имунохистохимична техника (Brawer M, Peehl D, Stamey et al., Keratin immunoreactivity in the benign and neoplastic human prostate. *Cancer Res* 1985; 45:3663-7). Високо молекулярен цитокератин маркира базалните простатни клетки, а това е важно, за да се разбере дали има или не неоплазия. Ако има *наличие на базален епителен слой* тогава можем със сигурност да твърдим, че липсва карцином на простатата. Обратно, след оцветяване на високо молекулярен цитокератин, виждаме, че базалните епителни клетки *липсват* или тяхната подредба е нарушена. Тогава можем да твърдим, че този пациент има неоплазма на простатата. Всички материали са на разположение в университетската клиника по патоанатомия в същата болница.

Количествен анализ се постигаше, като се сравняваха един участък с тумор в края на карциномната тъкан, сравнен с участък проксимално на 2.0 mm от неоплазмата.



Фиг. 3. Селекция на участъка от препарата за определяне плътността на експресия на BDNF и NGF и техните TrkA и TrkB рецептори в региона на карциномна тъкан спрямо жлезите само с хиперплазия (Автор на изображението д-р Росен Райков, по Irstain A, Siegal A, Enyou Yu. Topography of Neovascularity in human prostate carcinoma Cancer, 1995;10:2545-2551)

По този начин се оформят извън зоната на неоплазмата три зони.

- а) зона на туморния маргинален участък;
- б) гранична зона на прехода към хиперплазираните жлези с ширина от 2.5 – 5.0 mm;
- в) зона на бенигнено хиперплазираните жлези.

Всеки регион е средно с площ от 0.25 mm^2 , което отговаря на едно зрително поле при увеличение x 100 при използваната от нас програма. Полетата се избраха произволно, като се спазваше принципа да обхваща зоните, показани по-горе схематично (Фиг. 3).

Определянето на плътността в мастната тъкан се отдаваше лесно, тъй като тези клетки са с малко количество цитоплазма. Трудността се появяваше при карциномните участъци и такива с доброкачествена хиперплазия. При тях експресията на изследваните от нас растежни фактори беше

прогресира и се превърне в заплашващ живота простатен карцином, е неясна и вероятно се дължи на епигенетични влияния.

Дали е вследствие на възпалително атрофичен процес? Дали е мутирана интраепителна неоплазия? Това е трудно да се докаже. Според нас под въздействието на различни фактори се стига до нарушение в междуклетъчните взаимодействия. А кой, ако не растежните фактори, контролира тези процеси и то автокринно? Тази работна хипотеза ни караше да определим експресията на изследваните от нас невротрофии при пациенти с различен Gleason score. Знаем, че адено карциномните клетки имат висок пролиферативен индекс и експресия на антиапоптотичен ген (Sherowd E. 1990). Това води до по-дълъг клетъчен живот и генетична нестабилност на епителния клек.

Тези клетки притежават огромна част от андрогенните рецептори и апоптозо-активираща генна експресия, не притежават антиапоптотична генна експресия, което означава, че са чувствителни на андроген-зависима програмирана клетъчна смърт (Whight G. 1995). Много проучвания определят предразположението към рак на простатата като комбиниран ефект от полиморфизми и мутации в гени с ниска пенетрантност.

С покачване на Gleason score се усилва плътността на експресия на NGF. Тази зависимост може да се дължи на две причини. Първата е обемът на самия тумор, втората – на локализацията на карцинома в различните зони на простатата. Неслучайно обръщахме внимание и взехме материал за анализ от перивентралната и периуретрални зони на простатата. Ние знаем, че карциномът, разположен в апекса и основата на простатата, корелира с екстракапсулна инвазия. При Gleason score > 7 се повишава рисъкът от инвазия в семенни мехурчета и лимфни колектори (Badalament R et al. 1996). Данните от разположението на тумора са важни за планиране на вида на хирургичната намеса, за извършване или не на невросъхраняваща операция, брахитерапия, хормонтерапия или друг вид бъдещо лечение.

В настоящото проучване Gleason score бе сравняван пери- и постоперативно. В лапароскопската група средната стойност на Gleason score предоперативно е 6.00 със стандартно отклонение от (1.1). Постоперативно стойността оставаше в границата на предварително определените стойности на Gleason score 7.00, при което стандартното отклонение беше (0.87). В другата група биопсично установеният Gleason Score преоперативно средно е 6,5, стандартно отклонение – 1.2, постоперативен Gleason score = 7 със стандартно отклонение (0.96).

(4+3)=7, 10 пациенти – с Gleason score (4+4)=8 и 7 пациенти – с Gleason score (4+5)=9.

При пациентите с Gleason score < 7 експресията на NGF в мастната тъкан е под 30 %, при пациентите със сбор (2+2)=4 и се засилва до 60% при пациентите със сбор (7). При пациенти с висок Gleason score > 7 експресията в мастната тъкан на този невротрофин е най-висока. При Gleason score 9 достига 100% плътност на експресия както за епителните клетки с хиперплазия, така и в карциномно променените епителни туморни клетки.

Нашите проучвания доказваха, че при Gleason score < 7 експресия на NGF и експресията на NGF-TrkA и BDNF-TrkB комплексите е налична, като при гранични стойности на Gleason score 7 тя е в рамките на (++). С покачване на Gleason score експресията на NGF се запазва, но експресията на TrkA намалява. BDNF-TrkB комплексът експресира най-слаба при повишаване на малигнеността. Колкото е по-недиференциран туморът, толкова намалява TrkA експресията, а липсва експресия на TrkB. В хиперплазираните простатни клетки тези рецептори експресират силно положително (+++).

На какво се дължат тези корелации?

След публикацията на Hodge et al. 1989 г., която определи сексантната биопсия като златен стандарт в урологията, основен морфологичен критерий с оглед на малигнения потенциал на карцинома е неговата степен на диференциация. Тя е добре диференцирана, умерено и недиференцирана. Морфологичната класификация за оценка на малигнения потенциал е Gleason score. Основава се на архитектурното устройство на клетките и взаимовръзката им със стромните клетки. Тази система е утвърден „златен стандарт“ и има диагностично, клинично и прогностично значение по отношение на простатния адено карцином.

В момента повечето от водещите клиники в света са въвели сатурационната биопсия на простатата. По този начин се взема материал приблизително по една пункция от 1 cm³ тъкан. Това означава вземане на поне 20 биопсии от простата, плюс две от съмнителния участък при ректално туширане. Тя е особено надеждна при поредна биопсия при пациенти с висок риск от развитие на простатен карцином.

В големи проучвания сред аутопсионен материал се установява наличие на простатен адено карцином без да има клинична изява на болестта. Това се нарича „латентен“ простатен карцином. Причината за потенциала му да

обикновено между два и три плюса при полу количествения анализ, което означава 60 – 90% от препарата. Това означава силно оцветяване на почти всички засегнати клетки. Въпреки това ние успяхме да извършим и количествена корелация и да определим зависимостта между плътността на експресия и Gleason score, PSA, обем на простатата.

Статистически методи за обработка на данните

Вариационен анализ – за тестване на нормалността на разпределението е използван теста на Kolmogorov-Smirnov за описание на количествени показатели с нормално или близко до нормалното разпределение.

Алтернативен анализ – метод за оценка честотата на появя и относителния дял при качествени признаки; метод на Wan der Warden за оценка на малообемни извадки.

T – критерий за оценка на хипотезата за наличие на статистически значимо разлике между изследваните показатели. Използвано е нивото на значимост на нулевата хипотеза P < 0.05. Критичната област за посочените стойности на P е с двустренно разпределение на данните.

Непараметричен анализ – при съпоставка на дадено емпирично и очакваното теоретично разпределение на данните. При тестване на хипотезите за неосъществено случайно влияние на даден фактор са използвани теста на (Fischer, exact test) при четирикратни таблици и критерият χ^2 при многократни таблици.

За сравняване двойките стойности в групите беше използван непараметричният тест на Frindman.

Доказване на причинната връзка:

За доказване на причинната връзка се ползва Chi – Square. Емпиричната характеристика е представена по Chi-Square Pearson.

Когато изследваната връзка е статистически значима, се използва корелационният коефициент на Cramer, измерващ степента на връзката между отворената и лапароскопска простатектомия и дали е статистически значима.

Класифициране на единиците за изследване

За сравнение на двойките стойности в групите и достоверността на резултатите се използва тестът за вероятност. За оценка на влиянието на отделните предиктори, при класифициране на единиците в групи е ползван тестът на т. нар. коефициент на Wilcoxon – Wilks' Lambda. При по-ниски стойности на коефициента се приема, че съответният предиктор има по-голям принос при диференциране на единиците в двете групи.

Резултатите от класифицирането на единиците е представено в т. нар. Кръстосана таблица (матрица за объркването – confusion matrix). За коригиране на грешката за диференциране на правилата за класификация е използван метод на последователно изключване на единиците Cross-Validation Method, U-Method.

Средни оценки

За характеристика на центъра на емпиричното разпределение на изследваните променливи са определени следните обобщаващи характеристики:

- ❖ Средна аритметична величина (Mean);
- ❖ Медианата или средна стойност (Median);
- ❖ Мод (Mo).

При по-значителни отклонения от нормалното разпределение и при наличие на отдалечени наблюдения, като алтернатива на обикновената средна и медианна стойности, е определена и т. нар. претеглена устойчива оценка (M – оценки). Отдалечените наблюдения са установени с методите на числовата диаграма. Когато разпределението е близко до нормалното и отдалечените наблюдения са силно изразени за определяне на претеглената среда, е използван методът на Huber's M – Estimator.

При значителни отклонения от нормалното разпределение и наличие на силно изразени отдалечени наблюдения за определяне на притегателната среда, са използвани методите на Tukey's Wiweight, Hampel's M – Estimator Andrew's Wave. Средните оценки са определени като за база се вземаше величината 0.8 и сигнifikантните стойности $p < 0.05$, което беше налично при 50% от пациентите, при 10% статистически достоверна грешка беше налична при 5% от случаите.

клетъчното деление (Младенов М. Монография, Доброкаществена простатна хиперплазия. 2017:185-191).

Последните проучвания показват, че хиперплазията на простатата е предимно заболяване на стромата като намалява жлезистата тъкан за сметка на фиброму скулната пролиферация, т.е. за сметка на стромните клетки, докато при карцинома има силна пролиферация на епителните жлези, откъдето се покачват и серумните нива на PSA.

Съответно нашите резултати показват, че при стойности на $PSA < 10$ има експресия на NGF както в мастната тъкан, така и в карциномната тъкан. Слаба е в хиперпластичната адено мна тъкан, плътността на експресия на NGF се усилва и при стойности на PSA по-големи от 10 nmol/mL . Това вероятно се държи на усилената пролиферация на епителни клетки, които се намират под влиянието на невротрофина.

При ниски стойности на PSA плътността на експресия на BDNF е около 60%, в целия изследван от нас материал тя достига 100 % при стойности над 25 nmol/mL .

Възможно е клетката, която произвежда NGF и BDNF, както и други молекулни форми на невротрофии, различни по биологичната си активност, да се намират под автокринен контрол, който регулира клетъчния отговор. Връзката между серумните нива на PSA и плътността на експресия на изследваните от нас невротрофии и техните рецептори имунохистохимично, биха били важен критерий за прогнозиране развитието на установен вече простатен карцином.

Проследяването на серумните нива на свободния PSA, динамиката на скоростта на годишното увеличаване на PSA и имунохистохимичния анализ от тънкоиглената биопсия, биха предвидили риска от развитие на КП при млади мъже с негативна ТКБ.

Корелационен анализ между плътността на експресия на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75 и Gleason score $\leq \geq 7$

При проследяване на тази зависимост имахме най-големи очаквания, които се потвърдиха и от нашите резултати. Проследени бяха 44 пациенти с Gleason score < 7 , от които 13 със Gleason score (2+2)=4, 12 пациенти с Gleason score (2+3)=5, 19 пациенти с Gleason score (3+3)=6. В другата група с Gleason score > 7 влязоха 38 пациенти, съответно: 21 с Gleason score

Експресията на TrkA намалява, но е налична при стойности на PSA < 10 nmol/mL. При стойности на PSA > 10 nmol/mL експресията на TrkB липсва при ниско диференцираните тумори.

Връзката между PSA като специфичен антителен, произвеждащ се в особено големи количества от карциномно променените клетки и невротрофините NGF и BDNF, е логична. Общоприето е, че тези протеини преминават на близки разстояния дифузно и действат локално по паракринен път. Обратно на ендокринните хормони, всеки растежен фактор се синтезира от почти всички зрели и ембрионални тъкани. Друг факт е, че простатната жлеза се намира под непрекъснатото въздействие на андрогените и от тях зависи диференциацията на простатните клетки.

Тези два начина на контрол върху епителните и базални простатни клетки са вероятният „ключ“ за разкриване на патогенетичния път за развитие на простатния карцином. От направеното от нас проучване се доказва, че експресията на изследваните от нас невротрофини корелира с кръвните нива на простато специфичния антителен Te се покачват с повишаване на PSA, като за NGF достига максимална експресия, докато за BDNF експресията е около 60%. Протеазата PSA се произвежда в по-големи количества както от доброкачествената, така и от злокачествената простатна тъкан, докато при хиперплазията на простатата PSA се произвежда както от епителните, така и от стромните клетки. Следователно неговата продукция ще корелира с обема на жлезата. Затова и в зависимост от това дали имаме стромна или епителна хиперплазия ще има разлика в нивата на PSA. При карцинома на простатата PSA се продуцира изключително от епителните клетки, а те са под влияние на растежните фактори и дихидротестостерона, който директно контролира диференциацията на епителните клетки на простатата. Тази корелация между обем на простатата, серумни нова на PSA, ние също наблюдаваме в нашето проучване и доказваме чрез връзката му с експресията на NGF и BDNF.

Трябва да споменем, че хронологично най-рано са изолирани от простатата EGF (epidermal growth factor) (Hyrtata,Y et al. 1979).

През 1986 г. Mdchama S. et al. изолира (PrDGF), както и GFG (фибробластния растежен фактор), TGF (трансформиращия растежен фактор) TGF-alfa, beta. GFG – фибробластният растежен фактор стимулира клетъчното деление; TGF – трансформиращият растежен фактор инхибира

Графични методи за представяне на данните.

Данните са обработени и анализирани с помощта на програмния пакет SPSS v 07. (Statistical Package for Social Sciences) графичното им представяне с Windows Excel, 2007.

Разпределението на пациенти в терапевтични групи беше извършено на принципа на случаен подбор. Разпределението на пациентите в двете групи на извършване на лапароскопска или отворена радикална простатектомия ставаше също на случаен принцип.

Начин на действие

Всички участващи пациенти са информирани за вида на научното изследване и след изясняване на всички въпроси от страна на пациентите се включиха в него. Диагностицираният при пациентите простатен карцином бе патологично определен посредством биопсия и пациентите – класифицирани според TNM класификацията, хистопатологичния стадий и Gleason Score.

Отчасти това бе извършено в нашата клиника, но отчасти и от външни урологи/патологи, работещи в доболнични урологични практики. Бе определена стойността на простатоспецифичния антителен преди операцията.

По време на операцията бяха вземани по 3 пробы от периректалната мастна тъкан заедно с простата тип „сандвич“, перипростатната мастна тъкан супрапубично и за контрола мастна тъкан, разположена под симфизата. Радикалната простатовезикулектомия на простатния карцином се извършваше лапароскопски, преперитонеално или отворено ретропубично. Оперативният подход беше строго екстраперитонеално. След операцията в лабораторията по патология към Университетска болница „Св. Анна“ и бяха определяни големината на простатата и патологичния стадий.

Набиране на пациенти

Определянето на стационарно приети пациенти в урологичната клиника започна през 2007 г. и завърши през януари 2016 г. В този период в изследването бяха включени 231 пациенти.

Първият критерий за включване беше доброволното участие на пациентите в изследването, освен това се обърна внимание и на:

- ❖ диагностицираните тумори да съответстват на стадий pT2-pT3;
- ❖ установената посредством биопсия Gleason Score ≥ 7 ;
- ❖ хистопатологичния стадий $< G3$;
- ❖ вътрешно установената гранична (cut-off) стойност на общия простатоспецифичен антиген да е около 3.7 ng/mL (всички пациенти, при които стойността на простатоспецифичния антиген ≥ 3.7 ng/mL будят подозрение за потенциална биохимична прогресия);
- ❖ гранична (cut-off) стойност от 3.0 ng/mL за всички пациенти, които още не са навършили 50 години;
- ❖ общата стойност на простатоспецифичен антиген да е ≤ 10 ng/mL (само в отделни случаи бе допускана обща стойност на простатоспецифичния антиген до 40 ng/mL).

Тези пациенти бяха равномерно разпределени в двете групи.

Разпределянето на пациентите в лапароскопска или отворена операционна техника бе извършвано на принципа на случаен подбор.

Нямаше критерии, по които да бъдат разделени пациентите в двете от горепосочени групи. Общо бяха изследвани 231 пациенти, които бяха разпределени в две оперативни групи:

- ❖ LRPVE – Laparoscopic, Retropubic, Vesicectomy (лапароскопска радикална простатовезикулектомия).
- ❖ RRPVE – Radical, Retropubic, Prostate, Vesicectomy (радикална ретропубична, простато везикулектомия).
- ❖ Към групата, ориентирана към лапароскопска преперитонеална техника, първоначално спадаха 27 пациенти.
- ❖ При двама пациенти постоперативно се появила възпаления с неясен произход, поради което и те трябваше да бъдат изключени от изследването. Други двама пациенти бяха изключени от изследването поради диагностициран улцерозен колит (хронично чревно заболяване). Петима пациенти трябваше да бъдат изключени по време на изследването поради лезия на ректума. Така в лапароскопската група останаха 27 участници.
- ❖ Групата, ориентирана към отворена ретропубична операционна техника, се състоеше от 179 пациенти.

За първи път PSA е установлен в простатната тъкан през 1970 г. Измерен в серума през 1997 г. от Wang, през 1986 г. FDA одобрява теста за мониториране на пациенти за прогресия на вече открит карцином на простата. PSA е гликопротеин, състоящ се от 237 аминокиселини. Основната му физиологична функция е да втечи спермалния коагулум и по този начин да активира сперматозоидите от еякулата. 5% от количеството му е свободен в серума. Синтезиран от епителните клетки на простатата, попада в семенната течност, където концентрацията му е единица на милион пъти повисока. При нарушен базална мембрана PSA преминава в стромата на простатата, оттам по капилярен път и лимфните съдове достига до системното кръвообращение. Приблизително простатният карцином предизвиква 3.5 ng/ml на кубичен сантиметър тумор, докато ДПХ – 0.3 ng/mL на кубичен сантиметър хиперпластична тъкан (Stamey T, 1993). Обикновено PSA се повишава при пациенти с карцином на простатата, но неговите завишени стойности нерядко означава и увеличен обем на жлезата. Лечението с инхибитори на 5-алфа редуктазата намалява риска от развитие на карцином. Така този туморен маркер се явява важен прогностичен критерий след оперативното лечение на простатния карцином. Затова ние определихме стойност 10 nmol/mL като гранична стойност, като предполагахме, че връзката между експресията и PSA ще е достоверна.

При проследените от нас пациенти се установи че в групата със стойности на PSA < 10 nmol/mL минималната стойност беше 3.8 nmol/mL, средна – 6.5 nmol/mL, максимална стойност – 9.2 nmol/mL; изследвани бяха 28 пациенти. В групата с PSA ≥ 10 nmol/mL влязоха 21 пациенти с максимална стойност от 100 nmol/mL, средна стойност – 25 nmol/mL, минимална – 10.5 nmol/mL.

При стойности на PSA < 10 nmol/mL има експресия на NGF както в мастната тъкан, така и в карциномната тъкан. Слаба е в хиперпластичната аденоомна тъкан. Нейната плътност не се усилва и при стойности на PSA по-големи от 10 nmol/mL.

При стойности на PSA > 10 експресията на NGF се запазва, но намалява експресията на рецептора за него TrkA.

Експресия на BDNF в зависимост от стойности на PSA $< > 10$ nmol/mL: при ниски стойности на PSA плътността на експресия на BDNF е около 60% в целия изследван от нас материал; тя достига 100% при стойности над 25 nmol/mL.

периректално и вентрално, а в контролната проба е отрицателна. В простатната тъкан, разположена ректално, вентрално в карциномната тъкан, както и тази с простатна хиперплазия, експресията е изключително силна.

При 28 пациенти беше установено тегло на простата ≥ 60 g. Най малък обем беше с тегло 75 g, а максимално голям обем 117 g. Среден обем 60 g.

При 28 пациенти беше установено тегло на простата ≥ 60 g. Най малък обем беше с тегло 75 g, а максимално голям обем – 117 g. Среден обем – 60 g.

При тази група от пациенти експресията на NGF е сила в целия изследван материал, с изключение на контролата. Тази тенденция се запазва с покачване на обема на простатната жлеза. Продукцията на NGF е правопропорционална на туморните клетки $p < 0.001$.

При изследване на експресията на BDNF с тегло на простата $< > 60$ g тази зависимост се запазва и стойността на корелация е правопропорционална на обема на простатната жлеза. С увеличаване на обема, експресията на BDNF се увеличава. Това вероятно се дължи на факта, че експресията е пропорционална на продукцията на невротрофина, която пък корелира с обема на тъканта.

От получените от нас резултати за експресия на TrkA, TrkB рецепторите се установи, че при средни стойности на обем на простатата около 60 g, експресията е средна и се засилва с покачване на обема на простатната жлеза.

Вероятно, тъй като рецепторите са фактори при ДПХ, разположени основно в базалните слоеве на епителните клетки, докато при туморните клетки се нарушават лигандите, разположени странично в епителните клетки, то разрушените връзки биха освободили въздействието на невротрофините и биха стимулирали клетъчната пролиферация.

Корелационен анализ между плътността на експресия на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75 и PSA $< > 10$

Една от най-интересните зависимости би трябвало да е при различните стойности на простатно-специфичният антиген (ПСА, PSA). Туморният маркер е изключително важен и прогностичен маркер. Знаем, че неговото ниво се влияе изключително от обема на цялата простатата, както и от обема на самия тумор.

Критерии за изключване

Критерий за изключване бе наличието на мултиморбидитет или ако пациентът преди е имал повече от три различни видове карциноми. Изключени от изследването бяха и пациенти с диагноза болестта на Крон.

Изключени от проучването бяха и пациенти с положителен статус на лимфните възли или наличие на далечни метастази.

Освен това всички пациенти, които бяха с тежки възпалителни процеси, бяха оперирани в един по-късен момент след преодоляване на възпалението.

Пациенти с тежки кардинални заболявания, като напр. малигнена хипертония, сърдечно съдова недостатъчност, тежка аритмия не бяха подложени на лапароскопска оперативна техника.

Събиране на данни

Събирането на данните се извърши въз основа на документите на пациентите и на протокола за вземане на препарата.

Пациент:

Дата на раждане:

Стационар: RPWE Туморна нефректомия

Операция: отворен отворен

лапароскопски лапароскопски

Време на вземане на препарат Дата Час

Оперативно време

По отношение на гарантиране на качеството трябва да се спомене, че внимавахме да не бъдат забравени или пропуснати изследвания. Други погрешни изследвания се дължаха на неизползвани прости поради недобре изпълнена методика за включване към моноклоналните антитела или поради „неработещи“ китове.

Общо при четирима пациенти поради променена жлезиста тъкан на простатната жлеза не можа да бъде определен хистопатологичен стадий. В тази връзка от лапароскопски оперираната група отпаднаха трима пациенти, а от подлежащите на отворена операция – един пациент.

Събиране на клинични данни

Всички клинични параметри са взети от историята на заболяване на пациентите. Там са отбелязани всички данни във връзка с възрастта на пациентите, налични съществени, предишни заболявания, операции.

Измервани бяха килограмите, височината, обиколка на шия, кръст, ханш и беше определян BMI.

От досиетата на пациентите бяха взети и всички данни, които се отнасят до туморния стадий. Това се отнася до cTNM – класификацията, Gleason Score и хистопатологичния стадий pTNM. Получените данни се отнасят както към предоперативния стадий посредством биопсия на простатата, така също и до постоперативната хистологична експертиза.

Тук спадат и измерване на обема на жлезата, включително семенните мехурчета в милилитри. В досиетата присъстват и регистрираните данни от патоанатомичното изследване на статуса на отстранените лимфни възли и установяване състоянието на резекционната линия.

От оперативния протокол, който е приложен към досиетата на пациентите, може да се види продължителността на операцията.

Събиране на имунологични данни

За определяне на препаратите се вземаше материал от вече отстранената простата, като това обхващаше мастната тъкан, разположена периректално, заедно с част от простатната жлеза и по възможност обхващаща и туморни клетки, отбелязваша се с буквата R.

Другият препарат се вземаше от предната част на простатната жлеза, заедно с адипозната тъкан и се маркираше с буквата P.

За контрола се използваше мастната тъкан, разположена супрапубично, като тъканта се маркираше с буквата C.

След извършване на имунохистохимичната обработка на материала се определяше и плътността на експресия на невротрофините. В простати, при които не беше открит карцином, беше възможно да имаме и контролни препарати, при които също беше изследвана експресията на растежните фактори и техните рецептори при пациенти с доброкачествена простатна хиперплазия.

Плътността на експресия се определяше посредством броенето на клетките на произволно избрани зони от препарата и се определяше посредством

фактор със специфичния му рецептор води до конфигурационни промени в молекулата на рецептора. Тези промени засилват действието на протеин киназите и започват процеси на фосфорилиране и синтеза на клетъчни протеини, включително и в самия рецептор. Тирозин-киназното фосфорилиране е най-важният сигнализиращ процес, като този процес се потенцира както от ATP, така и GTP плюс (Mn^{2+}) и (Mg^{2+}). Ето защо стават убедителни доказателствата, че вероятната връзка между растежните фактори и неопластичния процес е посредством взаимодействието между онкогените и рецепторите на растежните фактори.

Корелационен анализ между плътността на експресия на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75 и възрастта на пациентите < > 60 г.

При проследяване експресията на рецепторите се установи: за TrkA експресията в мастната тъкан е 50%, докато в хиперплазираните клетки и клетките с карцином тя е почти 100%; обратна зависимост има при експресията на TrK. В специфичен за BDNF – те експресират силно при пациентите с възраст на 60 г.; постепенно, с увеличаване на възрастта, намалява експресията на този рецептор. Вероятно това се дължи на факта, че рецепторите в тъканите с доброкачествена хиперплазия на простатата са разположени в базалните слоеве на епителните клетки, което се потвърждава чрез имунохистохимичните методи за оцветяване, докато рецепторите за растежните фактори се разполагат странично от базалните стромни клетки и разрушаването на тези стабилни връзки индуцира неконтролираната пролиферация при карциномните клетки.

Корелационен анализ между плътността на експресия на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75 и обема на простатата $\leq \geq 60$ g

В нашата работна хипотеза, водени от общоизвестния факт, че обемът на жлезата би увеличил продукцията на изследваните от нас невротрофии, ни накара да изследваме и зависимостта между обем и плътност на експресия при оперираните от нас пациенти.

В групата с тегло на простата ≤ 60 g влязоха 24 пациенти. От тях – с минимално тегло от 58.8 g, средно 22 g, максимално 54 g. Експресията NGF е силно положителна в перипростатната мастна тъкан, разположена

периваскуларните нерви. Това играе съществена роля за увеличаване на кръвния подход към малигнените клетки. Известен факт е, че при карциномните тъкани имаме по-голяма консумация на хранителни вещества, необходими за неконтролираната клетъчна пролиферация. Ето защо контролът на NGF върху съдовия тонус би допринесла за регулацията на кръвния ток, а оттам и за контрол срещу туморния процес.

Обобщено нашите резултати показват, че спрямо обиколката на ханша и степента на Gleason score, $p < 0.005$, което е статистически значимо и ако е по-голяма извадката, тази достоверност би се потвърдила. Това означава, че ако се промени обиколката на ханша с 1 см, съответно Gleason score се променя с 0.023 при коефициента на регресия 0.313 това е слаба зависимост, но позитивна с тенденция към повишаване. При увеличаване на обиколката на шията с 1 см Gleason score се увеличава с 0.39, което също е позитивна тенденция. При направена корелация между трите антропометрични показателя обиколка на талия, шия и ханш, то Gleason score се увеличава с 0.034, което е също тенденция към увеличаване, но тази корелация ще бъде вярна само при съвместно действие на трите променливи. Поотделно тези променливи не могат да имат такава зависимост. Трите променливи заедно са значими, но всяка една поотделно не показва особена корелативна връзка с изключение на обиколката на талията. Ако обиколката на талията се промени с 1 см, Gleason score се увеличава с 0.023, при което коефициентът на регресия е 0.313 – тя също е слаба, но с тенденция към повишаване. Проверката за адекватност е нулева, което показва алтернативна значимост.

Корелационен анализ между плътността на експресия на NGF, BDNF, TrkB, TrkA и BMI ≥ 25

При средни стойности на БМИ от 25 kg/m^2 имаме най-силна експресия в простатната тъкан, разположена ректално. Колкото повече се покачва стойността на БМИ, толкова плътността на експресия на този рецептор намалява. Това колерира с митогенната активност на растежните фактори, водещи до клетъчен растеж. Клетките, които са изложени на увеличаващи се концентрации на растежните фактори постепенно изгубват съществена част от рецепторите си за тях. Тази обратна регулация зависи от концентрацията на лиганда. Когато клетката бъде отново в среда без лиганд, броят на рецептора се нормализира. Свързването на растежния

сравнение на площта на поле спрямо общата площ на препарата. Така беше извършвана и количествената експресия на невротрофините и техните рецептори.

План на изследването

В началото лапароскопски оперираната група се сравнява с отворено ретропубично оперираната група по отношение на структурната еднаквост на клиничните данни.

За тази цел се извършва сравнение на средните стойности между двете групи по отношение на възраст, общата стойност на простатоспецифичния антиген, големина на жлезата и продължителност на операцията.

Следващото сравнение е въз основа на онкологичните критерии.

Установеният статус на лимфните възли, а така също и на маргиналните срезове след отстраняване на простатата, се сравняваха чрез процентно съотношение на позитивност на срезовете между двете групи.

Тъй като в тази работа става дума за нерандомизирано проучване, пациентите са разпределени в терапевтични групи произволно. От това следва, че факторите, които оказват прогностично влияние са еднакво разпределени в двете групи. По отношение на факторите без прогностично въздействие пациентите могат да се различават. По този начин се постига съпоставимост и възможност за размяна на пациентите.

Не е извършена селекция по отношение на прогностичните фактори. Това изследване е open-label проучване, тъй като както пациентите, така и лекарите са информирани за провежданата терапия съгласно Хелзинкската спогодба за защита правата на пациента (1987).

Свързаната със стадия на развитие на болестта изразеност на експресията на невротрофините се наблюдаваше при връзката на плътността на експресия с общата стойност на простатоспецифичния антиген. Знаеики, че химическата активност на тумора се определя от стойността на PSA, с цел осъществяване на това наблюдение, пациентите, подложени на отворена и лапароскопска оперативна техника, се разделяха в две подгрупи.

1. Пациентите с обща стойност на PSA $\leq 6.9 \text{ ng/mL}$ са разпределени в първата подгрупа, а пациентите с обща стойност на PSA $> 6.9 \text{ ng/mL}$ бяха разпределени във втората подгрупа и се сравняваше ходът на

имунохистохимичните параметри между така получените четири групи

2. За да може да бъде извършена преценка в зависимост от стадия на болестта, пациентите и в двете оперативни групи се разделяха в две подгрупи (Фиг. 5).

В първата подгрупа влизат всички пациенти с TNM стадий \leq III от развитие на болестта.

Втората подгрупа от пациенти е с TNM стадий $>$ III. След това експресията се наблюдаваше и сравняваше в така дефинираните четири групи.

3. Степента на експресия се разглеждаше и в зависимост от БМИ. Оформиха се две групи с боди мас индекс $< > 25 \text{ kg/m}^2$, тъй като това е границата, насочваща към обеситас.
4. Накрая степента на експресия се разглеждаше и в зависимост от големината на простатната жлеза, тъй като производството на PSA зависи от обема на простатната тъкан, а тя пък определя онкогенната му активност.

За тази цел пациентите както от лапароскопската група, така и конвенционално оперирани, се разпределят в подгрупи с големина на жлезата $\leq 49 \text{ g}$ и в подгрупа с големина на жлезата $> 49 \text{ g}$.

Наблюдението на пациентите в двете групи трябваше да опровергае или докаже зависимостта на експресията на невротрофините от обема на простатната жлезата.

6. Обсъждане

В работната ни хипотеза беше посочено, че в настоящото проучване ние ще проучим експресията на горепосочените невротрофии и техните рецептори, въз основа на което ще докажем категоричната им роля в патогенезата при развитие на простатния карцином.

Обсъдени са двете основни групи параметри, които бяха проследявани по време на проучването: *клинични и имунохистохимични*.

Корелационен анализ между антропометрични и онкологични параметри

Простото измерване на елементарни антропометрични параметри би допринесло за минимална представа за бъдещо развитие на тази коварна болест при комбинирана зависимост между обиколка на шията, обиколка на талия, BMI, Gleason score, $p < 0.05$, което е статистически достоверно. Същото се отнася и за проследените комбинирани зависимости между посочените антропометрични параметри, спрямо pTNM и серумните нива на PSA при изследваните пациенти. Поотделно проследените антропометрични параметри не показваха корелация, но разгледани заедно – връзката е достоверна. Така антропометричните параметри, отнесени към онкологичните, могат бъдат използвани за предвиждане развитието на простатния карцином. Адипокините вероятно медиират връзката между стромните и епителните клетки в простатната тъкан и това се свързва с обеситас при някой пациенти. Ние доказваме, че обемът на простатата, отнесен към хистологичният грейдинг, асоциира със степента на експресия на невротрофините.

Лептините стимулират пролиферацията и инхибират апоптозата на простатно-карциномните клетки. Оттук предполагаме, че при високи стойности на БМИ ще се произвежда по-голямо количество лептин от перипростатно разположените адипоцити. Пролиферативният и антиапоптотичен ефект на изследваните от нас невротрофии най-вероятно действа като отключващ фактор в патогенетичния път при развитие на простатния карцином.

NGF контролира пролиферацията както на нормалните, така и на карциномните клетки. Освен това, той е в основата и на реиннервацията на

С покачване на Gleason score до 4 експресията на BDNF става (3+) в простатния карцином. Експресия на BDNF е (2+) в съдовете и нервното влакно и (3+) и в ДПХ). Експресията на BDNF е (2+) при Gleason score 4 в адипозната перипростатна тъкан.

Експресията на NGF в перипростатна мастна тъкан (R) е в 100% от материала (2+). Експресията на TrkA е негативна в карциномната простатна тъкан. Експресията на TrkA е също негативна в перипростатна адипозна тъкан.

Експресия на BDNF в нормалната тъкан е по-интензивна в сравнение с експресията на невротрофин в карциномната тъкан.

При BDNF, колкото експресията на невротрофин намалява с увеличаване на степента на недиференциация (Grading), експресията е по-малка в сравнение с нормалните клетки.

Загубата на невротрофин вероятно води до намаляване на диференциацията в карциномните клетки. Колкото е по-голям Gleason score, толкова експресията е по-малка.

Множество фактори от заобикалящата среда стимулират експресията на невротрофините. Такива са: хипоксия, хормони, ангиогенни фактори, епидермални растежни фактори цитокини, които имат основна роля при възпалителните процеси. Всички те водят до стимулиране на експресията на различни невротрофии.

Комбинираната оценка би допринесла за активното мониториране на пациентите, при които имаме консервативно поведение. Това означава да не се започне моментално лечение след установяване на хистологичната диагноза, особено в случаите, когато карциномът е наличен в под 5% от взетия материал. Ние предполагаме, че избързването с лечението, особено при пациенти с голяма коморбидност, би влошило качеството на живот, особено при такива с нисък риск от прогресия на болестта и кратка очаквана продължителност на живот.

5. Резултати

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи в зависимост от клиничните параметри.

Изследваните пациенти бяха разпределени в две групи в зависимост от вида на процедурата както следва: 27 пациенти в лапароскопската група и 157 пациенти в групата на отворената радикална простатектомия. Сравнението е представено в Табл. 2.

Табл. 2 Сравнение на пациентите в двете оперативни групи в зависимост от клиничните параметри

| 184 изследвани пациенти | | |
|--|---------------------------------------|---|
| 27 пациенти с лапароскопска преперитонеална и простатектомия | | 157 пациенти с извършена отворена ретропубична простатектомия |
| Брой пациенти | | Брой пациенти |
| -2 | Конверсия | |
| -15 | Стадиране на Тумор | -20 |
| -3 | Вземане кръв | -1 |
| -2 | Чисти възпаления | |
| -1 | Лезия на Ректум | 1 |
| -2 | Хронично възпаление на дебелото черво | |
| | Автоимунно заболяване | -1 |
| | Мултиплен карцином | |
| 96 пациенти | | 83 пациенти |
| | 179 общо изследвани пациенти | |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи по възраст

Табл. 3. Сравнение по възраст

| Сравнение в години | Лапароскопски оперирани (n=27) | Отворена оперативна намеса (n=157) |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| -50 | 0 | 0 |
| 51 – 55 | 7.00 | 8.00 |
| 56 – 60 | 2.00 | 13.00 |
| 61 – 65 | 7.00 | 31.00 |
| 66 – 70 | 7.00 | 99.00 |
| 71 – 75 | 6.00 | 13.00 |
| 76 – 80 | 1.00 | - |
| Средни стойности | 63.35 (5.48) | 63.35 (5.67) |
| Минимум | 46 | 49 |
| Максимум | 76 | 75 |

National Comprehensive Cancer Network (NCCN), при който се определят рисковите групи, бихме могли да направим по-точна прогноза за изхода от заболяването след извършено вече оперативно лечение, като добавим и имуноистохимична оценка.

Очакваната продължителност на живот, както и смъртност в следващите години след като пациентът е в определена рискова група, биха ни позволили да изберем съответно поведение в следоперативния период при всеки отделен случай. Според Social Security Administration Tables (www.ssa.gov) очакваната продължителност на живот при мъже на 50 г. определя срок 28.99 години, при тези на 60 г. – 20.92 години, а за тези над 70 г. – 11.21 години.

Да не забравяме, че при 70% от починалите по други причини се открива така нареченият латентен карцином. По правило ПК се диагностицира при 15 – 20 % от мъжете, но само 3% имат карцином-свързан риск за живота (Jemal A. et al. 2006). Това предполага, че болестта не се е развила при тези пациенти, въпреки наличието на неоплазия в простатната жлеза. Оттук следва изводът, че въпреки промените на ПСА, промените в биопсичния материал и определения патологичен стадий, процесът е останал латентен без клинична изява. Точно поради тези доказателства се налага у нас мнението, че има други фактори, които отключват различни процеси и водят към клинична изява на простатния карцином. Ние сме убедени, че растежните фактори индуцират патологичен път, посредством нарушение на междуклетъчната регулация въпреки ендокринното влияние върху ПК. Затова и комбинацията на досега прилагашите се параметри с имуноистохимичната оценка от трайния препарат ще внесат допълнителна яснота за предвиждане на прогресия на болестта и това може да се извърши още при обработка на TRU-CUT биопсичния материал.

Основен недостатък на този начин на поведение при новооткритите случаи би било осъществяването на диагностиката. Втори по-важен недостатък е удължаване на продължителността във времето на диагностичния процес, тъй като веднъж е необходима хистологична оценка, извършване на повторен оглед от хистолог, в случаите на разминаване в мнението на патолозите, след което имуноистохимична обработка на препаратите и трета патоанатомична експертна оценка.

Комбинираната оценка според нас би допринесла за намаляване риска от свръхлечението, свързана с хипердиагностика.

обратна. Нашето изследване се опита да потърси връзка между експресията на невротрофина и рецепторите им. В някои случаи нивата им са по-високи при злокачествените тъкани в сравнение с нормалните. Вероятно концентрацията на рецепторите зависи от клетъчния вид и от степента на диференциация на тумора.

Колкото по-злокачествен е процесът, толкова експресията на специфичните им рецептори намалява. При Gleason score 3+3=6, V-50 ml. pT2N0M0, G2.

С увеличение на диференциацията се засилва експресията на BDNF както в ДПХ, така и в карциномните простатни структури. Същата тенденция се забелязва и с експресията на невротрофините в мастната тъкан. При по-диференцирани тумори с нисък Gleason score се засилва експресията на BDNF както в адипозните, така и в глиалните простатни структури.

В глиалната тъкан също имаме експресия (++) . Това е особено важно за сигналите, които се отправят към променените епителни клетки от нервните клетки.

При другия изследван от нас невротрофин NGF, със запазване на диференциацията се засилва експресията на NGF както в адипозните, така и в глиалните простатни структури.

С увеличение на диференциацията се засилва експресията на TrkB както в ДПХ, така и в карциномните простатни структури.

С увеличение на диференциацията се засилва експресията на TrkB в перипростатната мастна тъкан липсва, а в ганглийната – намалява.

С увеличение на диференциацията се засилва експресията на TrkA в доброкачествената и малигнена тъкан. С увеличение на диференциацията се засилва експресията на TrkA в перипростатната мастна тъкан.

Комбинирана имуноистохимична оценка на експресията на BDNF и NGF в зависимост от стойности на PSA > 25 + Gleason score 8 + cTNM

По настоящем близо 90% от случаите се диагностицират в стадий на клинично локализиран простатен карцином. Въпреки тази тенденция, все още новооткритите пациенти се класифицират в група с висок риск (Makarov et al. 2007). При тези пациенти съществува рисък от биохимична прогресия с метастази и летален изход. Това предполага стадирането на заболяването да бъде проблемно. От направеното от нас проучване достигаме до мнението, че към предложения през 2012 г. консенсус

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи в зависимост от общата стойност на простатоспецифичния антиген (Табл. 4 и 5).

Табл. 4. Разпределение на пациентите в двете оперативни групи в зависимост от стойностите на PSA според възрастта

| | |
|--------------------|-------------|
| < 50 г. възраст | < 2.5 ng/mL |
| 50 – 59 г. възраст | < 3.4 ng/mL |
| 60 – 69 г. възраст | < 4.0 ng/mL |
| > 70 г. възраст | < 6.0 ng/mL |

Табл. 5. Сравнение на общия PSA между двете оперативни групи

| <i>Общ PSA в ng/mL</i> | <i>Лапароскопски оперирани (n=27)</i> | <i>Отворени операции (n=157)</i> |
|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| 0.1 – 2 | 3.00 | 5.00 |
| 2.1 – 4 | 9.00 | 7.00 |
| 4.1 – 6 | 00 | 17.00 |
| 6.1 – 8 | 00 | 13.00 |
| 8.1 – 10 | 00 | 23.00 |
| 10.1 – 20 | 15.00 | 31.00 |
| 20.1 – 30 | 00 | 5.00 |
| 30.1 – 40 | 00 | 21.00 |
| Отпаднали | 3.00 | 8.00 |
| Средно | 6.8 (6.28) ng/mL | 7.0 (7.44) ng/mL |
| Минимум | 0.61 | 0.43 |
| Максимум | 37 | 38.30 |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи в зависимост от масата на простатната жлеза (Табл. 6)

Табл. 6. Сравнение в зависимост от масата на простатна жлеза между пациентите в двете оперативни процедури

| <i>Маса в грамове</i> | <i>Лапароскопски оперирани (n=27)</i> | <i>Отворени RpVE (n=157)</i> |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| 20 – 39 | 17.00 | 19.00 |
| 40 – 59 | 5.00 | 50.00 |
| 60 – 79 | 3.00 | 31.00 |
| 80 – 99 | 3.00 | 54.00 |
| 100 – 119 | . | 2.00 |
| 120 – 139 | . | 1.00 |
| Отпаднали | 00 | 00 |
| Средно | 48 (14.09) g | 50 (21,82) g |
| Минимум | 21 | 22 |
| Максимум | 93 | 135 |

Табл. 41. Експресия на TrkA и TrkB в зависимост от Grading < G2; BDNF Grading <> G2. При тази зависимост стойността на корелация е умерена при < G2 и силна при > G2, 3

| <i>TrkA</i> | | | | | | | | | |
|---------------|---------------------|---------------------------------|------|-----|-----------------------------|------|------|-----|--|
| Брой пациенти | <i>Grading ≤ G2</i> | <i>Екс. TrkA в мастна тъкан</i> | | | <i>Екс. TrkA в простата</i> | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| 43 | 43 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 19 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | G1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 34 | | | | | | | | |
| 17 | 17 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | G3 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 17 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | . | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| <i>TrkB</i> | | | | | | | | | |
| Брой пациенти | <i>Grading ≤ G2</i> | <i>Екс. TrkB в мастна тъкан</i> | | | <i>Екс. TrkB в простата</i> | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| 43 | 43 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | |
| | 19 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | G1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 34 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 17 | 17 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | G3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | 17 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | . | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

Комбинирана имунохистохимична оценка на експресията на BDNF и NGF в зависимост от стойности на PSA ≤ 10 + Gleason score ≤ 6 + cTNM

Комбинираната оценка на трите фактора показва, че експресията на невротрофините се засилва с покачване на серумните нива на PSA, Gleason score и патоанатомичния стадий. Експресията на рецепторите обаче е различна. За NGF запазва тенденцията си към повишаване, а за BDNF тя е

Същата тенденция се наблюдава и при експресията на невротрофина в простатно-епителните клетки. Тя е слаба при високо диференцираните туморни клетки, засилва се до умерена при G2 и е силно положителна в стадий G2, G3 (Табл. 40 и 41).

Табл. 39. Експресия на NGF в зависимост от Grading < > G2

| Брой пациенти | <i>Grading</i> ≤ G2 | Екс. NGF в мастина тъкан | | | Екс NGF в простата | | | |
|---------------|---------------------|--------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 43 | 43 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 19 | G1 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | |
| 34 | G2 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | <i>Grading</i> > G2 | Екс. NGF в мастина тъкан | | | Екс. NGF в простата | | | |
| | G3 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 17 | | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Табл. 40. Експресия на BDNF в зависимост от Grading < > G2, TrkB и TrkA Grading < > G2 При тази зависимост стойността на корелация е слаба и обратна. При BDNF Grading < > G2 стойността на корелация е умерена при < G2 и силна при > G2, 3

| Брой пациенти | <i>Grading</i> ≤ G2 | Екс. BDNF в мастина тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
|---------------|---------------------|---------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 43 | | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| 19 | G1 | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| 34 | G2 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | <i>Grading</i> > G2 | Екс. BDNF в мастина тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
| | G3 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 17 | . | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | . | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според хирургични критерии

Табл. 7. Сравнение на пациентите според средното оперативно време

| Продължителност на процедурата в min | Лапароскопски оперирани (n=27) | Отворени RpVE (n=157) |
|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 5 – 100 | . | 00 |
| 101 – 150 | 00 | 38.00 |
| 151 – 200 | 00 | 23.00 |
| 201 – 250 | 25.00 | 96.00 |
| 251 – 300 | 00 | 1.00 |
| 301 – 350 | 3.00 | . |
| 351 – 400 | 00 | . |
| 401 – 450 | 1.00 | . |
| отпаднали | 00 | 00 |
| Средно | 205.0 (59.8) min | 135 (35.87) min |
| Минимум | 112 | 70 |
| Максимум | 450 | 272 |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи в зависимост от интраоперативната кръвзагуба.

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според необходимостта от хемотрансфузия.

| | | | |
|----------------|--------------------|---------------------|--------|
| Брой пациенти | 27 | 157 | p |
| Загуба на кръв | 200 (100 - 700) | 550 (200 - 1900) | < 0.05 |
| Трансфузии в% | 3% | 9% | |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според пери- и постоперативните усложнения.

| Усложнения в% | eLRP | RRP | p |
|-----------------|-------|------|---|
| лезия на ректум | 1.8% | 1.6% | |
| лимфоцеле | 3.2% | 2.9% | |
| супорация | 3.1% | 3.4% | |
| ревизия | 1.25% | 2.5% | |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според продължителността на уретралната катетеризация.

| | eLRP | RRP | p |
|--|------|------|--------|
| Продължителност на катетеризация в дни | 8.9 | 10.2 | < 0.05 |

Табл. 38. Експресия на TrkA и TrkB в зависимост от Стадий < > T2M0N0

| TrkA | | | | | | | | | |
|---------------|-------------------|--------------------------|------|-----|----------------------|------|------|-----|--|
| Брой пациенти | Стадий под T2M0N0 | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | DПХ | |
| 49 | 49 | | | | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| 18 | cT1cN0M0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| 17 | cT2aN0M0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 14 | cT2bN0M0 | 2 | 2 | 2 | | | | | |
| Брой пациенти | Стадий над T2M0N0 | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | | |
| 26 | 26 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | DПХ | |
| 17 | cT3aN0M0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| 9 | cT3bN0M0 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| TrkB | | | | | | | | | |
| Брой пациенти | Стадий под T2M0N0 | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| 49 | 49 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | DПХ | |
| 18 | cT1cN0M0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 | |
| 17 | cT2aN0M0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| 14 | cT2bN0M0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| Брой пациенти | Стадий над T2M0N0 | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| 26 | 26 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | DПХ | |
| 17 | cT3aN0M0 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 9 | cT3bN0M0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и патологичен стадий Grading $\leq \geq$ GII

Експресия на NGF при Grading < G2: попаднаха 43 пациенти, от които 19 с Grading G1, 34 пациенти с G2. В групата с Grading > G2 попаднаха 17 със стадий G3. От направения анализ, представен в таблица Табл. 39, се вижда, че NGF има слаба експресия в мастната тъкан в областите, разположени периректално и вентрално в патоанатомичен стадий G1, като тя става умерено положителна с напредване на недиференцираността на процеса.

При BDNF в зависимост от промяната стадий < > T2M0N0 зависимостта на корелация е обратна.

За TrkA експресира силно при диференцираните процеси, а намалява при недиференцираните пациенти. TrkB Стадий < > T2M0N0. При тази зависимост стойността на корелация е обратна, при недиференцираните тумори липсва експресия на TrkB.

Табл. 36. Експресия на NGF в зависимост от Стадий < > T2M0N0

| Брой пациенти | <i>Стадий под T2M0N0</i> | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс NGF в простата | | | |
|---------------|--------------------------|-------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 49 | 49 | | | | 2 | 3 | 3 | 3 |
| 18 | cT1cN0M0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 3 | |
| 17 | cT2aN0M0 | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 3 | |
| 14 | cT2bN0M0 | 3 | 3 | 0 | 2 | 3 | 3 | |
| Брой пациенти | <i>Стадий над T2M0N0</i> | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс. NGF в простата | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 26 | 26 | | | | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 17 | cT3aN0M0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | |
| 9 | cT3bN0M0 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | |

Табл. 37. Експресия на BDNF в зависимост от Стадий < > T2M0N0

| Брой пациенти | <i>Стадий под T2M0N0</i> | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 49 | 49 | | | | 3 | 3 | 3 | 2 |
| 18 | cT1cN0M0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | |
| 19 | cT2aN0M0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | |
| 14 | cT2bN0M0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | <i>Стадий над T2M0N0</i> | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 26 | 26 | | | | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 17 | cT3aN0M0 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 9 | cT3bN0M0 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според средния болничен престой.

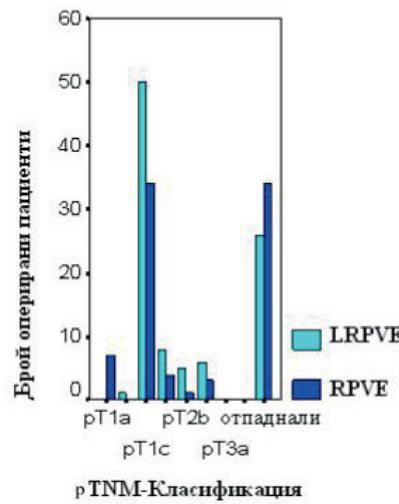
| | eLRP | RRP | p |
|-------------------------|------|------|---|
| Среден болничен престой | 9.4 | 11.2 | |

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според онкологичните параметри.

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според pTNM стадия (Табл. 8 и Фиг. 4)

Табл. 8. Сравнение в зависимост от pTNM класификацията между отворените и лапароскопски оперирани пре- и постоперативно

| TNM-Класификация | Лапароскоп-ски преоператив (n=7) | Лапароскоп-ски постоператив (n=21) | Отворена преоператив (n=49) | Отворена постоператив (n=108) |
|------------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| pT1a | . | . | 7.00 | 1.00 |
| pT1b | 1.00 | . | | 1.00 |
| pT1c | 50.00 | 1.00 | 34.00 | 1.00 |
| pT2a | 8.00 | 9.00 | 4.00 | 11.00 |
| pT2b | 5.00 | 6.00 | 1.00 | 7.00 |
| pT2c | 6.00 | 74.00 | 3.00 | 49.00 |
| pT3a | . | 3.00 | | 7.00 |
| pT3b | . | 2.00 | | 5.00 |
| Отпаднали | 00 | 00 | 00 | 00 |
| Средно | 3.00 (1.37) -> pT1c | 7.00 (0.95) -> pT2c | 3.00 (1.24) -> pT1c | 7.00 (1.42) -> pT2c |

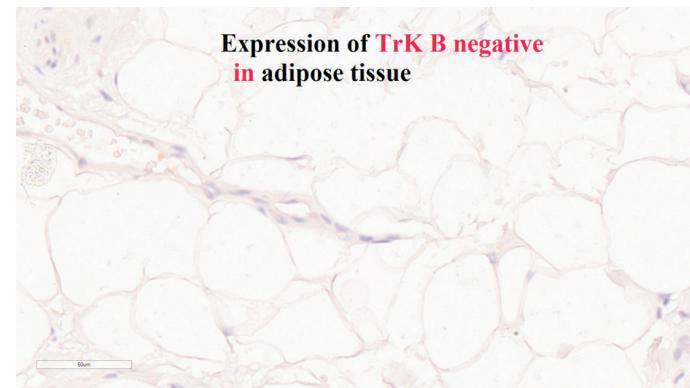


Фиг. 4. Предоперативно представяна на пациентите в двете групи в зависимост от клиничния стадий

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според хистопатологична оценка на препарата (Табл. 9 и Фиг. 5).

Табл. 9. Сравнение между лапароскопските и отворените групи в зависимост от Grading

| Grading | Лапароскоп-ски преоператив (n=27) | Лапароскоп-ски постоператив (n=27) | Отворена преоператив (n=157) | Отворена постоператив (n=157) |
|-----------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| G1a | 10.00 | . | 8.00 | |
| G1b | 1.00 | 1.00 | 6.00 | 2.00 |
| G2a | 16.00 | 3.00 | 131.00 | 125.00 |
| G2b | 5.00 | 23.00 | 16.00 | 30.00 |
| Отпаднали | 00 | 00 | 00 | 00 |
| Средно | 4.00 (1,19) -> G2a | 4.00 (0.55) -> G2a | 4.00 (1.2) -> G2a | 4.00 (0.56) -> G2a |



Фиг. 24. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 28.9, PSA-15 nmol/mL, Gleason score 3+4=7, V-75ml, pT2N0M0, G2, 66 г.

Демонстрира се експресията на TrkB – негативна, в адипозна тъкан, Gleason score 4+3=7, негативна.

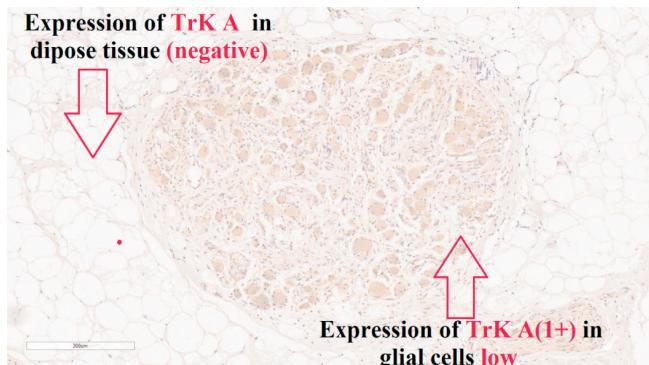
С увеличение на диференциация намалява или липсва експресията както в мастната тъкан, така и в карциномните простатни структури. Имунохистохимична микрография на пациент Т.М. ИЗ №20025.09-16.12.2012. хистологичен резултат № 18551/60 от 13.12.2012. pT2N0M0; G2; Gleason score (4+3)=7 PSA 10.51 nmol/ml.

Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и клиничен стадий pTNM <> II

Следваща зависимост, която беше проследена, е между патоанатомичния стадий и плътността на експресия на изследваните от нас невротрофии и специфичните им рецептори. Резултатите са представени в Табл. 36, 37 и 38.

Проследени бяха 49 пациенти в Стадий < T2M0N0, от които: 18 в Стадий < T1cM0N0; 17 в Стадий < T2aM0N0; 14 в Стадий < T2bM0N0. В другата група бяха общо 26 пациенти: 17 в Стадий < cT3aM0N0; 9 в Стадий < cT3bM0N0.

Експресия на NGF при Стадий < T2M0N0 се засилва с промяна на патоанатомичния стадий. Отчетлива е плътността на експресия в периуретралната простатна тъкан спрямо перивентралната. Обратна е зависимостта на експресия на BDNF и неговия специфичен receptor TrkB.

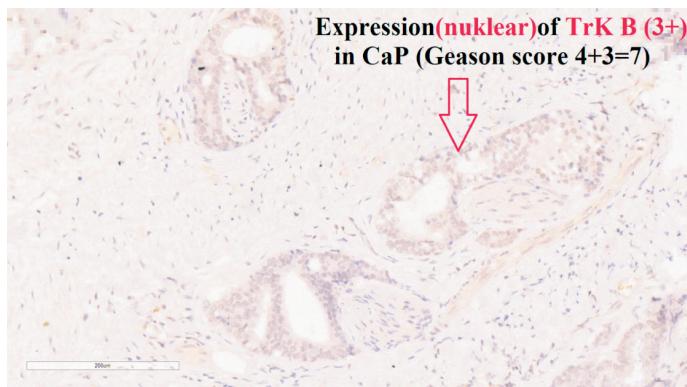


Фиг. 22. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 28.9, PSA-15 nmol/mL, Gleason score 3+4=8, V-75ml.pT2N0M0, G2, 66 г.

Демонстрира се експресията на Trk A (негативна) в перипростатна адипозна тъкан, Gleason score 4+3=7.

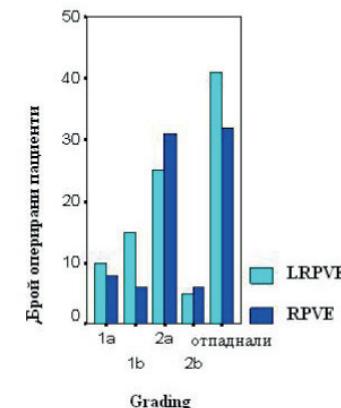
Демонстрира се експресията на Trk A (1+) в глиална тъкан, Gleason score 4+3=7.

С увеличение на диференциацията намалява експресията на TrkA както в мастната и нервната тъкан, така и в карциномните простатни структури



Фиг. 23. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 28.9, PSA-15 nmol/mL, Gleason score 3+4=7, V-75ml.pT2N0M0, G2, 66 г.

Демонстрира се експресията на TrkB(3+) в карциномна тъкан, Gleason score 4+3=7, (3+). С увеличение на диференциацията се засилва експресията както в мастната тъкан, така и в карциномните простатни структури. Имунохистохимична микрография на пациент Т.М. ИЗ №20025.09-16.12.2012. хистологичен резултат № 18551/60 от 13.12.2012. pT2N0M0; G2; Gleason score (3+4)=7PSA 10.51 nmol/ml.

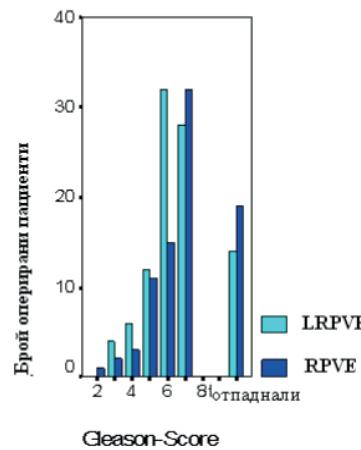


Фиг. 5. Предоперативно сравнение на оперираните пациенти в зависимост от хистологичния Grading

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според Gleason score (Табл. 10 и Фиг. 6)

Табл. 10. Сравнение според Gleason Score между конвенционално и лапароскопски оперираните пациенти

| Gleason-Score | Лапароскоп-ски преоператив (n=27) | Лапароскоп-ски постоператив (n=27) | Отворена преоператив (n=157) | Отворена постоператив (n=157) |
|---------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 2 | . | . | 1.00 | . |
| 3 | 4.00 | . | 2.00 | . |
| 4 | 6.00 | 2.00 | 3.00 | 1.00 |
| 5 | 12.00 | 8.00 | 111.00 | 9.00 |
| 6 | 3.00 | 9.00 | 15.00 | 6.00 |
| 7 | 4.00 | 7.00 | 32.00 | 154.00 |
| 8 | . | 00 | | 00 |
| 9 | . | 1,00 | | 00 |
| Отпаднали | 00 | 00 | 00 | 00 |
| Средно | 6.0 (1.1) | 7.0 (0.87) | 6.5 (1.19) | 7.00 (0.9) |



Фиг.6. Предоперативно сравнение на пациентите в двете оперативни групи в зависимост от Gleason score

Сравнение между двете оперативни групи според статуса на резекционната линия (Табл. 11)

Табл. 11. Сравнение в зависимост от статуса на резекционната линия между двете оперативни групи

| Резекционна линия | Лапароскопски оперирани (n=27) | Отворени (n=157) | RpWE |
|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|------|
| До здрава тъкан | 67.7% | 62.7% | |
| Патологично променена | 32.3% | 33.7% | |
| Отпаднали | | 3.6% | |

Демонстрира се експресията на BDNF(2+) в карциномна простатна тъкан, Gleason score 3, (2+) в нервна тъкан. Имуноhistохимична микрография на пациент В.С. ИЗ №1867.08-15.11.2012. хистологичен резултат № 16842/51 от 14.11.2012. pT3N0M0; G3; Gleason score (3+4)=7

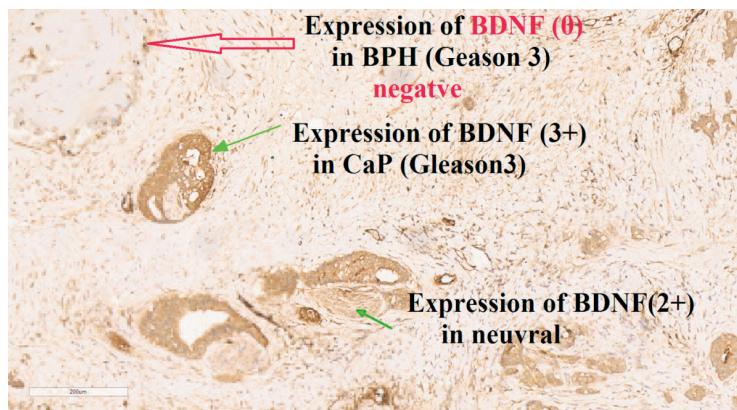
Табл. 35. Експресия на TrkA и TrkB в зависимост от Gleason score <>7 TrkA и TrkB. При тази зависимост стойността на корелация е слаба и обратна

| TrkA | | | | | | | | | |
|---------------|-------------------|--------------------------|------|-----|----------------------|------|------|-----|---|
| Брой пациенти | Gleason score < 7 | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| 44 | 13 2+2=4 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 12 2+3=5 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | 19 3+3=6 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | | | | | | | | |
| 38 | Gleason score >7 | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | | 21 4+3=7 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | 10 4+4=8 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | 7 4+5=9 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| TrkB | | | | | | | | | |
| 44 | Gleason score < 7 | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | | 13 2+2=4 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| | | 12 2+3=5 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | 19 3+3=6 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 38 | Gleason score >7 | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | | 21 4+3=7 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | 10 4+4=8 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | 7 4+5=9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

15.11.2012. хистологичен резултат № 16842/51 от 14.11.2012.
 pT3N0M0; G3; Gleason score (3+3)=6F както в адипозните, така и в карциномните простатни структури

Табл. 34. Експресия на BDNF в зависимост от Gleason score <>7 BDNF.
 При тази зависимост стойността на корелация е слаба и обратна

| Брой пациенти | Gleason score < 7 | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
|---------------|-----------------------------|--------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 44 | 13 2+2=4 | 2 | 2 | 0 | | 2 | 3 | 2 |
| | 12 2+3=5 | 2 | 2 | 0 | | 2 | 3 | 2 |
| | 19 3+3=6 | 2 | 2 | 0 | | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | Gleason score > 7 | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
| 38 | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | 21 4+3=7 | 2 | 2 | 0 | | 2 | 2 | 2 |
| | 10 4+4=8 | 2 | 2 | 0 | | 3 | 3 | 3 |
| | 7 4+5=9 | 3 | 3 | 0 | | 3 | 3 | 3 |



Фиг. 21. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 28.9, PSA-15 nmol/mL, Gleason score 3+4=7, V-75ml.pT2N0M0, G2, 66 г. Демонстрира се експресията на BDNF(0) в доброкачествено хиперплазирал простатни жлези, негативна. Демонстрира се експресията на BDNF(3+) в карциномна простатна тъкан (Gleason score 3) (3+).

Статус на регионалните лимфни възли (Табл. 12)

Табл. 12. Сравнение в зависимост от статуса на сентинелните лимфни възли между двете оперативни групи

| Статус на Лимфните възли | Лапароскопски оперирани (n=27) | Отворени RpWE (n=157) |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Свободни от тумор лимфни възли | 93.8% | 90.4% |
| Метастази | | 2.4% |
| Липса на метастази | 6.2% | 7.2% |

Цялостното разпределение на данните на оперираните пациенти в двете оперативни групи, сравнени в зависимост от клиничните предоперативни и постоперативни хирургични и онкологични критерии, е представено в Табл. 13 и 14.

Табл. 13. Брой пациенти разпределени по стадий, оперативни и постоперативни усложнения

| Брой пациенти | 27 | 157 | p |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------|---|
| Средни стойности години | 62.9 (42 – 74) | 64.8 (52 – 76) | |
| Средна стойност и преоперативно PSA | 7.9 (2.4 – 10.2) | 7.25 (4.4 – 11.3) | |
| Gleason score (биопсична) | 5.7 | 5.3 | |
| Преоперативен клинически стадий | | | |
| T1a | 0 | 6 | |
| T1c | 79 | 75 | |
| T2a | 14 | 12 | |
| T2b | 7 | 7 | |

| | | | |
|---|--------------------|---------------------|--------|
| Средни стойности на продължителност в min | 180 (120 – 240) | 120 (80 – 190) | < 0.05 |
| Загуба на кръв | 200 (100 – 700) | 550 (200 – 1900) | < 0.05 |
| Трансфузии в% | 3% | 9% | |

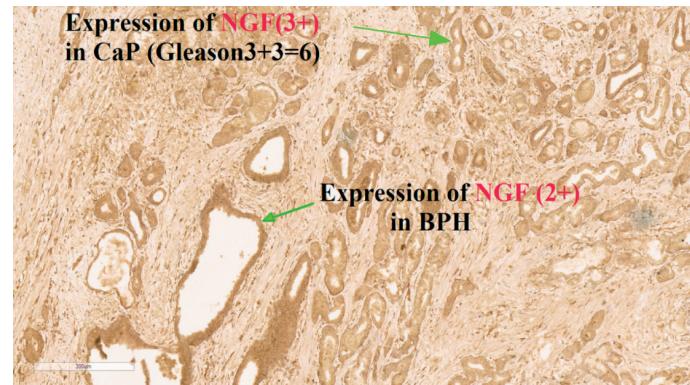
Табл. 14. Разпределение на пациентите по усложнения и хирургични критерии в хода на операциите

| Усложнения в% | | eLRP | RRP | p |
|--|--|-------------------|----------------------|--------|
| лезия на ректум | | 1.8 | 1.6 | |
| лимфоцеле | | 3.2 | 2.9 | |
| супорация | | 3.1 | 3.4 | |
| ревизия | | 1,25 | 2.5 | |
| Продължителност на катетеризация в дни | | 8.9 | 10.2 | < 0.05 |
| Употреба на еквиваленти на Морфина | | 33 | 35 | |
| Среден болничен престой | | 9.4 | 11.2 | |
| Хистологични параметри | | | | |
| Средна тегло на простатата | | 37 (18 - 72) g | 42,3 (20 - 120) g | |
| Стойности на Gleason score | | 6.4 | 5.7 | |

на рецептора му TrkA намалява. Експресията на BDNF-TrkB комплекса е най-слаба при повишаване на малигнеността. Колкото туморът е по-недиференциран, толкова намалява експресията на TrkA и липсва експресия на TrkB. В хиперплазиралите простатни клетки тези рецептори експресират слабо (Табл. 33, 34 и 35 и Фиг. 20, 21, 22, 23 и 24).

Табл. 33. Експресия на NGF в зависимост от Gleason score <>7

| Брой пациенти | <i>Gleason score < 7</i> | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс NGF в простата | | | |
|---------------|-----------------------------|----------------------------|------|-----|------------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 44 | 13 2+2=4 | 1 | 1 | 0 | | | | |
| | 12 2+3=5 | 2 | 2 | 0 | | | | |
| | 19 3+3=6 | 2 | 2 | 0 | | | | |
| 38 | Грейсон score > 7 | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс. NGF в простата | | | |
| | 21 4+3=7 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | 10 4+4=8 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | 7 4+5=9 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |



Фиг. 20. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 28, PSA-10 nmol/mL, Gleason score 3+3=6, V-50ml.pT2N0M0, G2, 65 г. Демонстрира се експресията на NGF (3+) в карциномна простатна тъкан, Gleason score 3+3=6. Демонстрира се експресията на NGF (3+) в ДПХ. С увеличение на диференциацията се засилва експресията на NGF. Имунохистохимична микрография на пациент В.С. ИЗ №1867.08-

Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и Gleason score $\leq \geq 7$

Класификационната система е създадена от Доналд Глийсън заедно с VACURG (Veterans Administration Cooperative Urological Research Group). Системата е разработвана от 1960 of 1975 г. и вече 40 г. е „златен стандарт“ за стадиране в онкологичната патология с клинично и прогностично значение (Gleason 1977).

От 2005 г. е приет консенсус с редица промени в използваната скала от (International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma, 2014 г.)

Стадирането по Gleason score представлява важен прогностичен фактор и е задължително при вземане на решение за диагностика, оперативно лечение, стадиране и консервативно лечение при карцинома на простатата. Биологичното поведение на тумора корелира със средноаритметичното на двете степени по-добре, отколкото само с по-доброя или понедиференцирания модел.

Логично е наличие на връзка между плътността на експресия на пролиферативните невротрофии и Gleason score. Като доказани участници BDNF и NGF в паракринната междуклетъчна регулация, ние предполагахме, че ще има определена връзка между клиничния стадий и експресията на проследените от нас невротрофии.

При проследяване на тази зависимост имахме най-големи очаквания, които се потвърдиха и от нашите резултати. Проследени бяха 44 пациенти с Gleason score < 7, от които 13 със Gleason score (2+2) = 4; 12 с Gleason score (2+3) = 5; 19 с Gleason score (3+3) = 6, а в другата група с Gleason score > 7 влязоха 38 пациенти съответно: 21 с Gleason score (4+3) = 7; 10 с Gleason score (4+4) = 8; 7 с Gleason score (4+5) = 9.

При пациентите с Gleason score < 7 експресията на NGF в мастната тъкан е под 30% при пациентите със сбор (2+2) = 4 и се засилва до 60% при пациентите със сбор 7. При пациенти с висок Gleason score > 7 експресията в мастната тъкан на този невротрофин е най-висока, при Gleason score 9 достига 100% плътност на експресия както в епителните клетки с хиперплазия, така и в карциномно променените епителни туморни клетки. При Gleason score < 7 експресията на NGF-TrkA и BDNF-TrkB се запазва с покачване на Gleason score. Експресията на NGF се запазва, но експресията

Табл. 15. Разпределение на пациентите по хистологични и онкологични критерии в зависимост от вида на операциите

| Патологичен стадий в% | eLRP | RRP |
|--------------------------------------|----------|-------------|
| pT2a | 16% | 19% |
| pT2b | 27% | 22% |
| pT2c | 23% | 25% |
| pT3/a/b | 33% | 34% |
| Позитивни лимфни възли % | 0 | 1,67 |
| Позитивна резекционна линия % | | |
| pT2 a/b/c | 9.8 | 12.6 |
| pT3a/b | 29 | 31 |

Пациентите са разпределени в две групи в зависимост от вида на оперативната процедура. В ЕЛРП са 27 пациенти, а в РРП – 157 пациенти. В първата група пациентите са със средна възраст 62.9г., а в другата – 64.8г. Средно тегло на пациентите е 86 kg, съответно – 76 kg. Среден ръст – 174.8 см срещу 173 см. Обиколка на шията – 40.9 см, съответно в другата група – 40 см. Обиколка на ханша – 104.2 см, спрямо 102 см. Обиколка на талията – 99 см, съответно – 90 см. Средни стойности на преоперативно PSA – 7.9 (2.4 – 10.2), спрямо 7.25 (4.4 – 11.3).

Сравнение на пациентите в двете оперативни групи според имуноистохимични параметри

За целта изследваните от нас пациенти бяха разпределени в две групи в зависимост от основните променливи. Това беше и основната цел на нашето проучване – да установим има ли зависимост между избраните от нас параметри и степента на експресия на невротрофините.

От общо изследвани 257 пациенти с доказан локализиран карцином на простатата, пациентите бяха разпределени в две групи в зависимост от Gleason score, стойността на PSA, клиничния стадий, възрастта на пациента и БМИ.

В първата група се включиха 179 пациенти с Gleason score ≤ 7 , PSA ≤ 20 , G I-II, с TNM 2b-, възраст ≤ 60 г., BMI ≤ 25 , обем на простатата под 59 g.

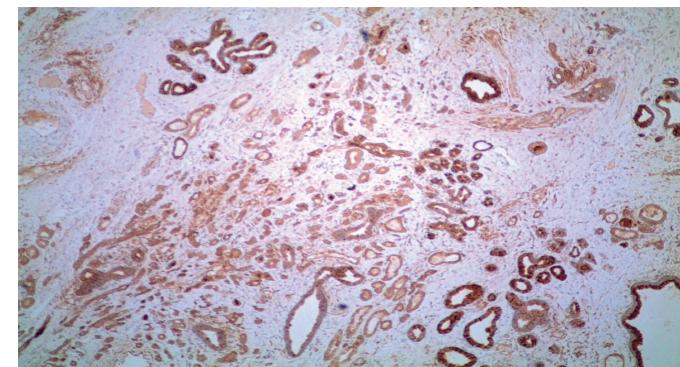
Във втората група бяха включени 78 пациенти с Gleason score ≥ 7 , PSA ≥ 20 , G III-IV, с TNM ≥ 2 , възраст ≥ 60 г., BMI ≥ 25 , обем на простатата над 59 g.

При разглеждане на имуноистохимичните данни се сравняваха промените на дадените невротрофин, като се правеше сравнение на промените в експресията му в мастната перипростатната тъкан, в епителните туморни клетки на жлезата и в хиперплазираните жлези.

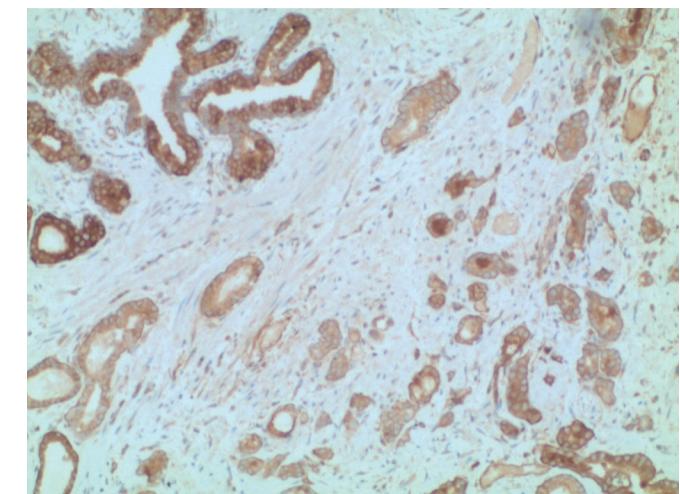
Ние определихме тези пациентски групи на базата на случаен избор въз основа на наличните данни от историята на заболяването и извършените периоперативно TRU-CUT биопсии. Впоследствие на базата на извършената хистологична оценка се определяше окончателният клиничен стадий. Всички препарати предварително бяха оцветявани стандартно с H&E, а впоследствие се обработваха с моноклонални антитела за имуноистохимична оценка.

Разпределението на пациентите в тези групи беше извършено въз основа на нашата работна хипотеза, че вероятно очакваме зависимост между експресията на изследваните от нас параметри, а техните промени определено биха се влияли от възраст, БМИ, патологичен стадий на болестта и степен на диференциация на процеса, обем на простатната жлеза.

В първата група бяха представени 179 пациенти, а във втората – 78. Средно тегло при едните беше 86 kg, а при другите – 76 kg. Ръстът на изследваните от нас пациенти беше средно установен съответно: 174.7 см



Фиг. 18. Експресия на BDNF при PSA $< 10 \text{ nmol/ml}$



Фиг. 19. Експресия на BDNF при PSA $> 10 \text{ nmol/ml}$, Gleason score 3+3=6

При по-голямо PSA $> 10 \text{ nmol/mL}$ се увеличава експресията само на BDNF. При по-високи стойности на PSA експресията на невротрофин е по-малка.

В ляво Имуноистохимична микрография на пациент В.С. ИЗ №1867.08-15.11.2012.хистологичен резултат № 16842/51 от 14.11.2012. pT3N0M0;G3;Gleason score (3+3)=6 В дясно Имуноистохимична микрография на пациент Д.Р. ИЗ №18993.19-26.11.2013.хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013. pT3N0M0;G3;Gleason score (5+4)=9

При стойности на PSA > 10 Експресията на TrkA в липсва при ниско диференцираните тумори (Табл. 32).

Табл. 32. Експресия на TrkA и TrkB в зависимост от стойности на PSA

| TrkA | | | | | | | | | |
|---------------|---------------|--------------------------|------|-----|--------------------------|------|------|-----|----------------------|
| Брой пациенти | PSA < 10 | Екс. TrkA в Мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| 28 | Min - 3.8 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 | 3 | 2 | |
| | Med - 6.5 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | |
| | Max - 9.2 | 2 | 2 | 0 | 1 | 3 | 3 | 2 | |
| | Брой пациенти | PSA > 10 | | | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | | Екс. TrkA в простата |
| 31 | Min - 0.5 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | Med - 25.0 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | Max - 100 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | | TrkB | | | | | | | |
| Брой пациенти | PSA < 10 | Екс. TrkB в Мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| 28 | Min - 3.8 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | Med - 6.5 | 3 | 3 | 0 | 3 | 2 | 3 | 3 | |
| | Max - 9.2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| Брой пациенти | PSA > 10 | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| 31 | Min - 10.5 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | Med - 25.0 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | Max - 100 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

в едната група спрямо 173 см в другата. Обиколка на шията – 40.9 см, а в другата група – 40.0 см. Обиколка на ханша средно – 104.2 см, съответно 102 см. Обиколка на талията средно – 99 см, съответно 90 см в другата група. Относно БМИ в първата група минималната стойност беше 17.2, средно – 22, максимално – 24. В другата група минималните стойностите бяха 25, средно – 28.2, а максималната стойност на БМИ достигаше до 34.

Средна стойност и преоперативно PSA беше 6.5 (3.8 – 9.2), съответно в другата група – 25 (10.5 – 100).

Относно Gleason score: средна стойност – 5 (4 – 6), съответно 8 (7 – 9) при другата оперативна група. Тегло на простатата под 60 g – минимум 22 g, средно 50.8 g, максимално 54 g. В другата оперативна група – над 60 g, средни стойности в грамове – 60 (75 – 117).

Имунохистохимични параметри

Всички пациенти бяха разпределени в две групи в зависимост от възрастта < > 60 г. БМИ < > 25, обема на простатата < > 59 g, патоанатомичния pTNM < > II стадий, стойности на ПСА < > 20 nmol/ml и Grading G < > II. След това се извърши анализ на следните зависимости:

- 2.1. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и антропометрични параметри.
- 2.2. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и БМИ.
- 2.3. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и възрастта на пациентите < > 60 г.
- 2.4. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и обема на простатата < > 60 g.
- 2.5. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и PSA < > 10.
- 2.6. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и Gleason score < > 7.
- 2.7. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и клиничният стадий pTNM < > II.
- 2.8. Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и G < > II.

2.9. Комбинирана оценка между имунохистохимична експресия на BDNF и NGF в зависимост от стойности на PSA + Gleason score + cTNM.

Пациентите бяха разделени в следните групи: в зависимост от стойности на PSA ≤ 10 PSA 10-20 PSA ≥ 20 , Gleason score $\leq \geq 7$, с TNM $\leq \geq$ T2M0N0.

Корелационен анализ между антропометрични и онкологични параметри

През последните 20 години обеситас придобива пандемичен характер – както в развитите страни, така и в България. По тази причина считаме за важно да определим връзката между обеситас и рак на простатата. Както е известно, адипозната тъкан е разпределена в две депа – субкутанно и абдоминално и множество малки депа, локализирани около вътрешните органи.

Фундаментални изследвания от последните 15 години показват, че мастната тъкан, освен склад на липиди, е и най-големият ендокринен и паракринен орган. Те контролират апетита, възпалението, имунитета, липидния метаболизъм, хемостаза, канцерогенеза.

Адипонектините се намират под следните форми:

- ❖ f-adiponectin – дълго верижни молекули;
- ❖ Globular adiponectin – кръгли вериги;
- ❖ Oligomeric-states (тетра, хекса, много тежки вериги).

Адипонектин – инхибира пролиферацията на епителни клетки, а лептин и NGF стимулират пролиферацията на епителни клетки. По антропометрични и онкологични параметри пациентите са представени на Табл. 15.

Табл. 30. Експресия на NGF в зависимост от стойности на PSA <10 nmol/mL

| Брой пациенти | PSA < 10 | Екс. NGF в Мастна тъкан | | | Екс NGF в простата | | | |
|---------------|---------------|-------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 28 | Min - 3.8 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| | Med - 6.5 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max - 9.2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Брой пациенти | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс. NGF в простата | | | |
| 21 | PSA > 10 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | Min - 10.5 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Med - 25 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max - 100 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |

При стойности на PSA <10 има експресия на BDNF в мастната тъкан така е най-слаба в карциномната тъкан е умерена.

При стойности на PSA >10 експресията на BDNF намалява, като най-слаба е при ниско диференцираните тумори. Експресията на TrK В липсва при ниско диференцираните тумори (Табл. 31, Фиг. 18 и 19).

Табл. 31. Експресия на BDNF в зависимост от стойности на PSA <10 nmol/mL

| Брой пациенти | PSA < 10 | Екс. BDNF в Мастна тъкан | | | Екс BDNF В простата | | | |
|---------------|---------------|--------------------------|------|-----|----------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 28 | Min - 3.8 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Med - 6.5 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | Max - 9.2 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| | Брой пациенти | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF. в простата | | | |
| 21 | PSA > 10 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | Min - 10.5 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Med - 25 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max - 100 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Експресия на TrkA намалява, но е налична при стойности на PSA < 10

| | | | | | | | | |
|---------------|--|---------------------------------|------|-----|-----------------------------|------|------|-----|
| 26 | Min - 60 g Med - 75g Max - 117g | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| | | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| TrkB | | | | | | | | |
| Брой пациенти | Тегло на простата под < 60 g | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | |
| 24 | Min - 35 g Med - 50.8 g Max - 59 g | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| | | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | Тегло на простата над < 60 g | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | |
| 26 | Min - 60 g Med - 75 g Max - 117 g | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и PSA<>10 mmol/mL

Една от най-интересните зависимости би трябвало да е при различните стойности на ПСА

При изследваните от нас пациенти се установи, че в групата със стойности на ПСА < 10 mmol/mL минималното е 3.8 nmol/mL, средно 6.5 nmol/mL, максимална стойност 9.2 nmol/mL. Изследвани бяха 28 пациенти.

При стойности на PSA <10 mmol/mL има експресия на NGF както в мастната тъкан, така и в карциномната тъкан. Слаба е в хиперпластичната аденоомна тъкан.

При стойности на PSA>10 mmol/mL експресията на NGF се запазва, но намалява експресията на рецептора за него TrkA (Табл. 30).

Табл. 16. Антропометричните параметри и онкологични резултати

| Групи пациенти | Gleason score < 7, PSA<20, G I-II, cTNM2bc, възраст<60 | Gleason score 7, PSA<20, G I-II, cTNM 2b-c, възраст<60 | P 179 |
|--|--|---|----------|
| І. Група Gleason score >7, PSA>20, G III-IV, cTNM>2c, възраст > 60 | | | 78 |
| Брой пациенти | 179 | 78 | 257 |
| Средни стойности години | 62.9 (42 - 74) | 64.8 (52 - 76) | |
| Тегло | 86 | 76 | |
| Ръст | 174.7 | 173 | |
| Обиколка на шията | 40.9 | 40.0 | |
| Обиколка на ханша | 104.2 | 102 | |
| Обиколка на талията | 99 | 90 | |
| Средна стойност и преоперативно PSA | 7.9 (2.4 – 10.2) | 7.25 (4.4 - 11.3) | |
| Gleason score (биопсична) | 5,7 | 8 | |
| Преоперативен клиничен стадий | | | |
| T1a | 0 | 6 | |
| T1c | 79 | 75 | |
| T2a | 14 | 12 | |
| T2b | 7 | 7 | |
| Средни стойности на продължителността на операцията в min | 180 (120 – 240) | 120 (80 – 190) | < 0.05 |
| Загуба на кръв в ml | 200 (100 – 700) | 550 (200 – 1900) | < 0.05 |
| Трансфузии в % | 3 % | 9 % | |
| Усложнения в % | | | |
| лезия на ректум | 1.8 | 1.6 | |

| | | | |
|--|--------------|-----------------|--------|
| лимфоцеле | 3.2 | 2.9 | |
| супорация | 3.1 | 3.4 | |
| ревизия | 1.25 | 2.5 | |
| Продължителност на катетеризация в дни | 8.9 | 10.2 | < 0.05 |
| Обезболяване | 33 | 35 | |
| Среден болничен престой | 9.4 | 11.2 | |
| Хистологични параметри | | | |
| Средна тегло на простатата в g | 37 (18 – 72) | 42.3 (20 – 120) | |
| Средни стойности на Gleason score | 6.4 | 5.7 | |
| Патологичен стадий в % | | | |
| pT2a | 16 % | 19 % | |
| pT2b | 27 % | 22 % | |
| pT2c | 23 % | 25 % | |
| pT3/a/b | 33 % | 34 % | |
| Позитивни лимфни възли % | 0 | 1.67 | |
| Позитивна резекционна линия % | | | |
| pT2 a/b/c | 9.8 | 12.6 | |
| pT3a/b | 29 | 31 | |

Направен е корелационен анализ между антропометричните параметри (БМИ, обиколка на талия, обиколка на ханш, обиколка на врат) и онкологични параметри (Gleason score, pTNM, PSA) на пациентите с диагностициран простатен тумор, съответстващи на стадий pT2- pT3a по TNM класификацията Gleason Score ≤ 7 , хистологичен стадий < G3, общ PSA да е ≤ 10 mg/mL, в отделни случаи беше допускано и стойности до 40 mg/mL.

Първо беше изследвана зависимостта между антропометрични и онкологични параметри при оперирани пациенти. Идеята беше да се

Табл. 28. Експресия на BDNF в зависимост от тегло на простата < > 60 g

| Брой пациенти | Тегло на простата под < 60 g | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF В простата | | | |
|---------------|------------------------------|--------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 24 | Min – 50.8 g | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| | Med – 35 g | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| | Max – 59 g | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | Тегло на простата над < 60 g | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | Min – 60 g | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Med – 75 g | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max - 117g | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Както е представено на Табл. 29, съответно и зависимостта между обема и десните на експресия при специфичните рецептори е правопропорционално на обема на простатната жлеза. Колкото е с по-малък обем тя е около 50% и се засилва с увеличаването на обема на простатната жлеза.

Табл. 29. Експресия на TrkA и TrkB в зависимост от обема на простата < > 60g. TrkA и TrkB обем на простата < > 60g. При TrkA експресията е право пропорционална на обема. При TrkB стойността на корелация е слаба и обратна

| Брой пациенти | Тегло на простата под < 60 g | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс TrkA в простата | | | |
|---------------|------------------------------|--------------------------|------|-----|----------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 24 | Min - 35g | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Med - 50.8 g | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Max -59 g | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | Тегло на простата над < 60 g | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |

Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и обема на простатата $\leq \geq 60$ g

В нашата работна хипотеза, водени от общоизвестния факт, че обемът на жлезата би увеличил продукцията на изследваните от нас невротрофини, решихме да изследваме и зависимостта между обем на жлезата и експресията на невротрофините при оперираните от нас пациенти.

Експресия на NGF при обем на простата < 60 g е силна в целия изследван материал с изключение на контролата. Тази тенденция се запазва с покачване на обема на простатната жлеза. Продукцията на NGF е правопропорционална на туморните клетки $p < 0.001$ (Табл. 27).

Табл. 27. Експресия на NGF в зависимост от тегло на простата $< > 60$ g

| Брой пациенти | Тегло на простата под < 60 g | Екс. NGF в Мастна тъкан | | | Екс NGF В простата | | | |
|---------------|--------------------------------|-------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 24 | Min -50.8 g | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Med - 22 g | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max - 54 g | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | | | | | | | |
| Брой пациенти | Тегло простата над > 60 g | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс. NGF в простата | | | |
| 28 | Min - 75 g | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | Med - 60 g | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max - 117 g | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | | | | | | | |

Експресията на BDNF с тегло на простата $< > 60$ g. При тази зависимост стойността на корелация е правопропорционална на обема на простатната жлеза. С увеличаване на обема експресията на BDNF се увеличава (Табл. 28).

проучи дали е възможно предвиждане на развитие на болестта и предлагане на някаква прогноза чрез антропометричен анализ на пациентите, посредством елементарни измервания, достъпни и неизискващи никакви средства. Резултатите от направения анализ са представени в Табл. 17, 18, 19 и 20.

Табл. 17. Представя зависимостта между BMI и GLEASON SCORE, pTNM, PSA

| КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ НА | ОНКОЛОГИЧНИ ПАРАМЕТРИ | P |
|------------------------|-----------------------|------------|
| BMI | GLEASON SCORE | $P > 0.05$ |
| BMI | pTNM | $P > 0.05$ |
| BMI | PSA | $P > 0.05$ |

Табл. 18. Представя зависимостта между обиколка на талията в см и GLEASON SCORE, pTNM, PSA. Зависимостта е умерена с тенденция към увеличаване при промяна на стадия

| КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ НА | ОНКОЛОГИЧНИ ПАРАМЕТРИ | P |
|------------------------|-----------------------|-------------|
| ОБИКОЛКА ТАЛИЯ | GLEASON SCORE | $P < 0.313$ |
| ОБИКОЛКА ТАЛИЯ | pTNM | $P < 0.313$ |
| ОБИКОЛКА ТАЛИЯ | PSA | $P < 0.313$ |

Табл. 19. Представя зависимостта между обиколка на шия в см и GLEASON SCORE, pTNM, PSA, с увеличаване на обиколката на шията с 1 см, Gleason score се увеличава с 0.39; тенденцията е към повишаване

| КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ НА | ОНКОЛОГИЧНИ ПАРАМЕТРИ | P |
|------------------------|-----------------------|-----------|
| ОБИКОЛКА ШИЯ | GLEASON SCORE | P > 0.05 |
| ОБИКОЛКА ШИЯ | pTNM | P > 0.05 |
| ОБИКОЛКА ШИЯ | PSA | P < 0.517 |

Табл. 20. Представя зависимостта между обиколка на талия, шия, BMI и GLEASON SCORE, pTNM, PSA. Поотделно при тези променливи не може да има такава зависимост. Трите заедно са значими, но всяка една не показва особена корелативна връзка с изключение на обиколката на талията

| КОРЕЛАЦИОНЕН АНАЛИЗ НА | ОНКОЛОГИЧНИ ПАРАМЕТРИ | P |
|-----------------------------------|-----------------------|----------|
| ОБИКОЛКА ШИЯ, ОБИКОЛКА ТАЛИЯ, BMI | GLEASON SCORE | P < 0.05 |
| ОБИКОЛКА ШИЯ, ОБИКОЛКА ТАЛИЯ, BMI | pTNM | P < 0.05 |
| ОБИКОЛКА ШИЯ, ОБИКОЛКА ТАЛИЯ, BMI | PSA | P < 0.05 |

Установи се че, корелационна зависимост има единствено при стойностите на PSA спрямо обиколката на шията. Взети заедно обаче трите променливи антропометрични величини, отнесени към онкологичните параметри, представляват установена зависимост, която е статистически достоверна. Предполагаме, че това се дължи на отделянето на адипокини като f-adiponectin, чиято молекула медиира връзката между простатния карцином и обеситас. Този факт би могъл да се използва и като терапевтически при-

потвърждава чрез имунохистохимичните методи за оцветяване, докато рецепторите за растежните фактори се разполагат странично от базалните стромни клетки и разрушаването на тези стабилни връзки индуцира неконтролираната пролиферация при карциномните клетки (Табл. 26 и 27).

Табл. 26. Експресия на TrkA и TrkB в зависимост от възрастта на пациентите < > 60 г. TrkA експресира силно в групата на пациенти под 60 г. Над 80 г. експресията е слаба. Експресия на TrkB при млади пациенти липсва, засилва се с напредването на възрастта

| TrkA | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-------------|--------------------------|------|-----|----------------------|------|------|-----|------|------|------|-----|
| Брой пациенти | < 60 г. | Екс. TrkA в Мастна тъкан | | | Екс. TrkA В простата | | | | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | | | | |
| 21 | Min – 49 г. | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | Med – 57 г. | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | | | | |
| | Max – 59 г. | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 28 | > 60 г. | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | Min – 61 г. | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | | | | |
| | Med – 67 г. | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | | | | |
| | Max – 81 г. | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | | | | |
| TrkB | | | | | | | | | | | | |
| 21 | < 60 г. | Екс. TrkB в Мастна тъкан | | | Екс. TrkB В простата | | | | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | | | | |
| | | Min – 49 г. | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | | | | |
| | | Med – 57 г. | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | | | | |
| 28 | > 60 г. | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | | Min – 61 г. | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | | | | |
| | | Med – 67 г. | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| | | Max – 81 г. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | |

повишаване на възрастта на оперираните от нас пациенти започва отслабване на експресията и тя е най-слаба при най-възрастните пациенти. Няма разлика в експресията на NGF в изследваните от нас сегменти от простатната жлеза. Тя е еднаква и в епителните клетки с хиперплазия (Табл. 25).

При проследяване на експресията на BDNF при същите пациенти в групата под 60 г., експресията на невротрофините в мастната тъкан е със средни стойности около 60% при най-младите, а най-висока е в групата със средна възраст между 57 – 67 г.

Пътността на експресия в простатните жлези показва същата тенденция. Тя е средна при най-младите и най-възрастните и висока при тези между 57 – 67 г. (Табл. 25).

Табл. 25. Експресия на BDNF в зависимост от възрастта на пациентите < > 60 г. С напредване на възрастта експресията на BDNF е най- силна в групата между 67 – 70 г.

| Брой пациенти | < 60 г. | Екс. BDNF в Мастна тъкан | | | Екс BDNF В простата | | | |
|---------------|-------------|--------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 21 | Min – 49 г. | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | |
| | Med – 57 г. | 3 | 3 | 0 | 2 | 2 | 2 | |
| | Max – 59 г. | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | |
| Брой пациенти | > 60 г. | Екс. BDNF в Мастна тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
| 28 | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| | Min – 61 г. | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | |
| | Med – 67 г. | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | |
| | Max – 81 г. | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 |

При проследяване експресията на рецепторите се установи: за TrkA експресията в мастната тъкан е 50%, докато в хиперплазираните и клетките с карцином тя е почти 100%. Обратна е зависимостта при експресията на TrkB, специфичен за BDNF; те експресират силно при пациентите на възраст 60 г. и постепенно с увеличаване на възрастта намалява експресията на този рецептор. Вероятно това се дължи на факта, че рецепторите в тъканите с доброкачествена хиперплазия на простатата са разположени в базалните слоеве на епителните клетки, което се

лечението на простатния карцином, което вече е установено от колектив Miyazaki et al. в Institute of the City of Hope, Duarte, (Miyazaki T, Iwamoto Y. Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cell. Bub CD, 2011: Epub ahead of print, Departament of Surgical Research Institute of the City of Hope, Duarte, CA 91010-3000, USA).

Ние се надяваме, че елементарното измерване на антропометричните параметри би допринесло при определяне на риска от развитие на простатен карцином, както и за предвиждане на степента на малигненост на неоплазмени процеси в простатната жлеза. При пациент с това заболяване в серума са налични увеличаване на концентрацията на лептин. Наши и други изследвания показват, че серумното ниво на адipoцитокина лептина асоциира с обема на простатния карцином, хистологичния грейдинг и биохимичната активност на тумора, което определя метастазирането му. Това предполага възможност за прогнозиране на развитие на метастази в последващ период, както и предвиждане на морталитета при такива пациенти.

Определено в проучванията от много автори, както и от нашите резултати, се установява корелационна връзка между серумните нива на лептина и серумните нива на простатоспецифичния антиген. Лептинът стимулира инвитро пролиферацията и инхибира апоптозата на простатните карциномни клетки. Тази корелация е ясно изразена при андроген-резистентните простатни тумори. На молекулярно ниво адipo-цитокините се свързват с тирозин-киназните рецептори и потискат митозите в епителните клетки, оттам и апоптотичния ефект на карциномните клетки в простатата. В този процес се включва каскаден трансмембранен процес MAPK/P13. Те се активират посредством свързването на лептина с рецепторите в мембрата на карциномните клетки. Адipoцитокините, и в частност лептинът, играят ролята на прогностичен параметър при лечение със специфична терапия върху метастазите при хормонорефрактерните тумори, което се дължи на потискане на митозите. Ние изследваме пролифериращия ефект на лептина в простатния карцином, както и ролята върху тирозин-киназните рецептори като медиатори на този процес. Инвитро при андроген-резистентни пациенти и при сензитивни пациенти, третирани с лептин, би довело до инхибиране на рецептора PD 98059, което намалява митогенната активност и това предполага асоциирането с обеситас – респективно хиперлипидемия и риск от развитието на простатен карцином.

Пролиферативният и антиапоптотичен ефект на лептина върху човешките простатно-карциномни клетки – следствие на затъняването, води до високи стойности на лептин, произведен от адипоцитите, и е вероятният патогенетичен път, отключващ карциногенезата.

NGF контролира растежа на простатния тумор

NGF съдейства за реиннервацията на периваскуларните нерви, което пък регулира тонуса на съдовете и кръвотока. NGF въздейства на туморния растеж чрез повишаване невроналната регулация и повишаване на кръвотока през тумора.

Поставен субкутанно DU145 при голи мишки сигнификантно супресира NGF. Това увеличава васкуларизацията на гладката мускулатура в туморната тъкан, но няма цитотоксично действие върху туморните клетки ин витро.

Това показва, че NGF предпазва от увеличаване на простатните туморни клетки ин витро по индиректен път. Най-вероятно чрез промяна на иннервацията, водеща до получаване на антигени срещу NGF инхибиращи инвитро простатните метастази.

От представените по-горе резултати установяваме, че при съотношението тегло на пациента и Gleason score зависимостта е слаба, но положителна. Оттук следва, че идеята за корелация между БМИ и онкологични показатели трябва да отпадне.

По отношение на другите антропометрични променливи се установиха следните зависимости:

- Спрямо обиколката на ханша и степента на Gleason score $p > 0.005$, което е статистически значима зависимост и при по-голяма извадка тази достоверност би се потвърдила. Това означава, че ако обиколката на ханша се промени с 1 см, съответно Gleason score се променя с 0.023, при коефициент на регресия 0.313 – това е слаба, но позитивна тенденция.
- При увеличаване на обиколката на шията с 1 см, Gleason score се увеличава с 0.39, която също е позитивна тенденция.
- При направената корелация между трите антропометрични показателя – обиколка на талия, шия и ханш, то Gleason score се увеличава с 0.034,

В епителните клетки на хиперплазираните жлези има слаба експресия на BDNF, но липсва идентификация на рецептора му TrkB

Корелационен анализ между плътността на експресия на BDNF, NGF, TrkA, TrkB, p75 и възрастта на пациентите $< > 60$ г.

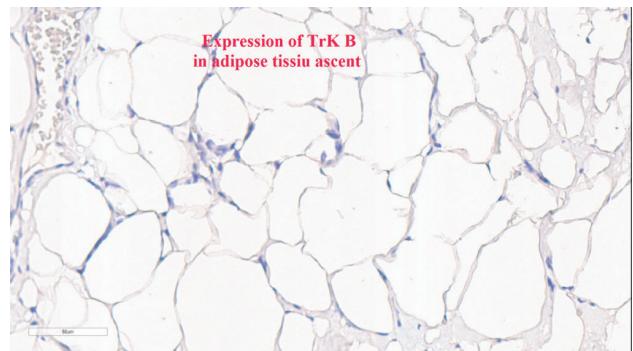
Табл. 24. Експресия на NGF в зависимост от възрастта на пациентите $< > 60$ г. С напредване на възрастта експресията на NGF се засилва

| Брой пациенти | < 60 г. | Екс. NGF в Мастна тъкан | | | Екс NGF В простата | | | |
|---------------|---------------|-------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 21 | Min - 49 г. | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Med - 57 г. | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max - 59 г. | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | | | | | | | |
| Брой пациенти | > 60 г. | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс. NGF в простата | | | |
| 28 | Min - 61 г. | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Med - 67.7 г. | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max – 81 г. | 3 | 3 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | | | | | | | | |

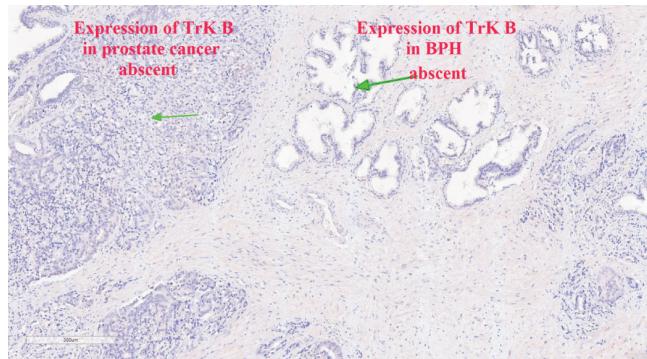
Следваща зависимост, която беше обект в настоящето проучване, е въз основа на разпределение на пациентите в две групи в зависимост от възрастта $< > 60$ г.

В първата група от 21 пациенти с възраст < 60 г. от извършения хистохимичен анализ на проследяваните от нас растежни фактори и техните рецептори, болните бяха с минимална възраст 49 г. и максимална 59 г. Средна възраст – 57 г.

Във втората група влязоха 28 пациенти на средна възраст от 67 г. (минимална – 61 г.; максимална – 81 г.) (Табл. 24). От направения анализ се установи, че плътността на експресия на невротрофина NGF в мастната тъкан в изследваните от нас региони на простатата е около 60% в групата от по-млади пациенти. Във възрастта между 60 – 65 г. тази експресия се засилва и достига най-голяма плътност на експресия при пациенти с възраст над 80 г. В контролите тя е отрицателна. Плътността на експресията в простатния епител е най-силна при по-младите пациенти, а с



Фиг. 16. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score 5+4=9, V-52ml.pT3N0M0, G3. Демонстрира се експресията на TrkB(0+) в адипозната тъкан, разположена перипростатно както супрапубично, така и периректално липсва. Тъй като това е специфичен рецептор за BDNF, корелира с липсата на експресията на този невротрофин в по-горе представените препарати. Тази зависимост демонстрира, че BDNF не е наличен в контролата и в перипростатната адипозна тъкан, както и съответният му рецептор Имунохистохимична микрография на пациент Д.Р. ИЗ №18993.19-26.11.2013. хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013. pT3N0M0;G3; Gleason score (5+4)=9



Фиг. 17. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score 5+4=9, V-52ml.pT3N0M0, G3. Демонстрира се експресията на TrkB (0+) в карциномна простатна тъкан. Тъй като това е специфичният рецептор за BDNF, корелира с липсата и на експресия на този невротрофин в по-горе представените препарати. Липсва експресия на TrkB рецептора и в тъканта с доброкачествена хиперплазия. Тази зависимост демонстрира, че BDNF не е наличен в неопластичните клетки, както и съответният му рецептор.

което е също положителна тенденция. Тази корелация ще бъде вярна само при съвместно действие на трите променливи. Поотделно тези променливи не показват корелация. Трите променливи заедно са значими, но всяка една поотделно не показва особена корелативна връзка, с изключение на обиколката на талията.

4. Ако обиколката на талията се промени с 1 cm, Gleason score се увеличава с 0.023, при което коефициентът на регресия е 0.313; тя също е слаба, но с тенденция към повишаване. Проверката за адекватност е нулева, което показва алтернативна значимост.
5. Корелацията между тегло на пациента, обиколка на шия, ханш и TNM стадия показва следната зависимост: при повишаване на показателите с 1 см, се стига до промяна на стадия на болестта; това изразява промяна в степента на злокачественост. Тъй като стадият е прекъсната променлива (не може да се каже каква част от стадия се променя), определяме само тенденцията.

Корелационен анализ между плътността на експресия на NGF, BDNF, TrkA, TrkB, p75 и $BMI \geq 25$

Още в работната си хипотеза споменахме, че ще обърнем съществено внимание на адипозната тъкан като основен паракринен орган в човешкото тяло. Затова и $BMI \geq 25$ беше и първото измерване, направено предварително при всеки пациент в това проучване, както и уточняването на антропометричните данни, чиито резултати вече бяха разгледани в предходния раздел.

Водени от факта, че лептинът стимулира ин витро пролиферацията и инхибира апоптозата на простатните карциномни клетки, зависимостта е ясно изразена при андроген-резистентните простатни тумори. На молекуларно ниво адипоцитокините се свързват с тирозин-киназните рецептори и потискат митозите и деленето на клетките, което предполага засилване на апоптотичния ефект в карциномните клетки на простатата. От нашите проучвания, показвани в Табл. 21 и Фиг. 14, се установи, че при 26 пациенти с боди мас индекс под 25 (минимален 17.2, максимален 24, средно 22), експресията на NGF в мастната тъкан, разположена периректално и вентрално е 1+, а в контролната проба липсва. С покачване на БМИ започва да се засилва експресията както в перипростатната мастна тъкан, разположена периректално, така и в мастната тъкан, разположена вентрално, докато в контролната проба липсва експресия.

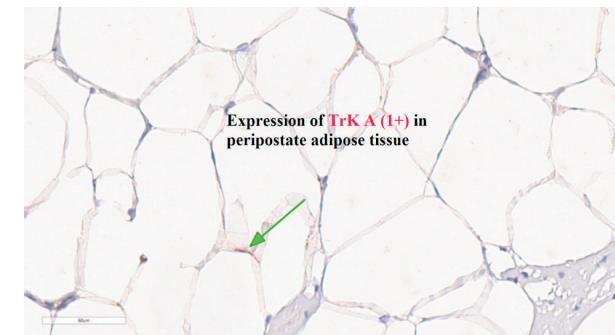
Що се отнася до експресията на NGF в простатната тъкан, тази, която е разположена вентрално е 1+, съответно както в простатната тъкан, така и в карциномната такава. В жлезите с доброкачествена хиперплазия експресия липсва.

С покачване на стойностите на БМИ се засилва експресията на този невротрофин, като при 25 пациенти тя е три плюса, както в тъканите, разположени вентрално, така и в тъканите, разположени периректално; забелязва се и слаба експресия в контролната проба на мастната тъкан.

При стойности на БМИ > 25 kg/m² при общо 24 пациенти (Min – 25 kg/m²; Max – 34 kg/m²; Med – 28.2 kg/m²). При тези пациенти експресията на NGF е силно положителна. Тя е два плюса (++) при стойности между 25 – 28 (Фиг. 15, 16) и три плюса (+++) при стойности на БМИ над 28. При високи стойности на боди мас индекса имаме силно положителна експресия както в карциномната тъкан, така и в клетките само с доброкачествена простатна хиперплазия (Фиг. 17).

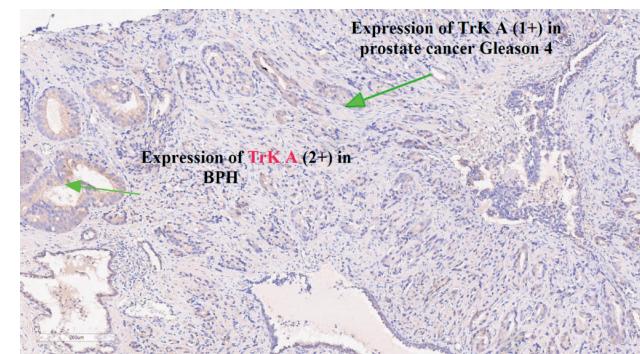
Табл. 21. Експресия на NGF в зависимост от BMI <> 25. Експресия на NGF при BMI < 25 е слаба; засилва се при BMI > 25

| Брой пациенти | BMI < 25 | Екс. NGF в Мастна тъкан | | | Екс NGF В простата | | | |
|---------------|------------|-------------------------|------|------|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 26 | Min - 17.2 | 1 | 1 | 0 | | | | |
| | Med - 22 | 2 | 2 | 0 | | | | |
| | Max - 24 | 2 | 2 | 0 | | | | |
| Брой пациенти | BMI > 25 | Екс. NGF в мастна тъкан | | | Екс. NGF в простата | | | |
| 24 | Min - 25 | 2 | 2 | 0 | | | | |
| | Med - 28.2 | 2 | 2 | 0 | | | | |
| | Max - 34 | 3 | 3 | 0 | | | | |
| | | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | | | |
| | | 3 | 3 | 3 | 3 | | | |
| | | 3 | 3 | 3 | 3 | | | |
| | | 3 | 3 | 3 | 3 | | | |



Фиг. 14. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score 5+4=9, V-52ml.pT3N0M0, G3.

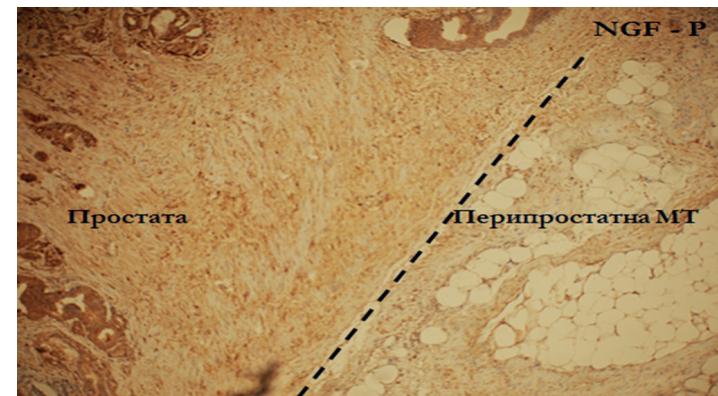
Демонстрира се експресията на TrkA(1+) рецептора в перипростатна адипозна тъкан в простатен карцином с (Gleason score 4. Този рецептор е специфичен за NGF, който също експресира в тумора. Имунохистохимична микрография на пациент Д.Р. ИЗ №18993.19-26.11.2013.хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013. pT3N0M0;G3; Gleason score (5+4)=9. Демонстрира се слаба експресия на рецептора в перипростатната мастна тъкан



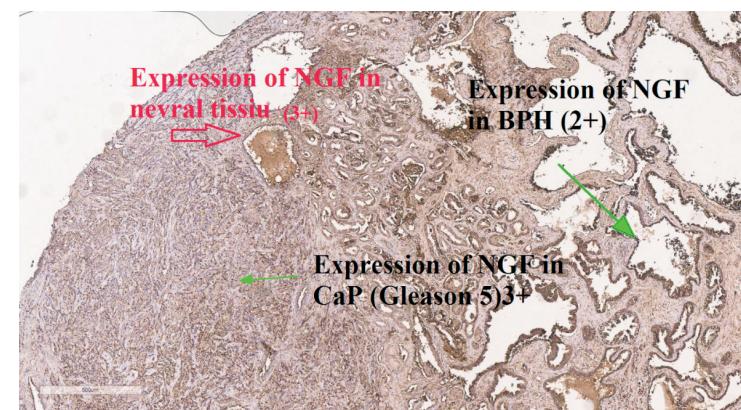
Фиг. 15. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score 5+4=9, V-52ml.pT3N0M0, G3. Демонстрира се експресията на TrkA (1+) рецептора в простатен карцином с Gleason score 4. Този рецептор е специфичен за NGF, който също експресира в тумора; експресия на TrkA (2+) в ДПХ. Демонстрира се корелация между рецепторна и невротрофна експресия. Имунохистохимична микрография на пациент Д.Р. ИЗ №18993.19-26.11.2013.хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013. pT3N0M0;G3; Gleason score (5+4)=9

Табл. 23. Експресия на TrkA и TrkB в зависимост от BMI < > 25. При тази зависимост стойността на корелация е слаба и обратна.

| TrkA | | | | | | | | | |
|---------------|------------|--------------------------|--------------------------|------|----------------------|----------------------|------|-----|--|
| Брой пациенти | BMI < 25 | | Екс. TrkA в Мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | |
| | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | | |
| 26 | Min - 17.2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | Med - 22 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | Max - 24 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | BMI >25 | Екс. TrkA в мастна тъкан | | | Екс. TrkA в простата | | | | |
| 24 | Min - 25 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | Med - 28.2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | Max - 34 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | | TrkB | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| 24 | BMI < 25 | Екс. TrkB в Мастна тъкан | | | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | Min - 17.2 | M.PV | M.PR | M.K | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | Med - 22 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | Max - 24 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| 26 | BMI >25 | Екс. TrkB в мастна тъкан | | | Екс. TrkB в простата | | | | |
| | Min - 25 | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | Med - 28.2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| | Max - 34 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | Екс. TrkB в простата | | | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ | |
| | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |



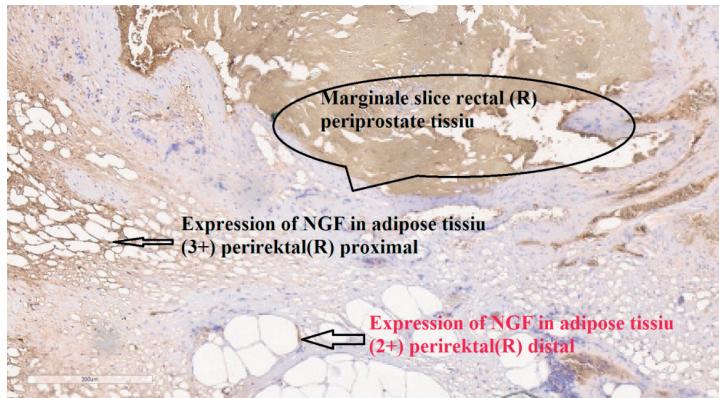
Фиг. 7. Експресия на NGF в простатна карциномна тъкан и перипростатна мастна тъкан (Имунохистохимична микрография на пациент Д.Р., ИЗ №18993.19-26.11.2013, хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013, pT3N0M0;G3; Gleason score (5+4)=9)



Фиг. 8. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score(5+4)=9, V-52mL, pT3N0M0, G3. Демонстрира се експресията на NGF(2+) в карциномна тъкан с (Gleason score 5) вижда се налична експресия под 60% или 2+. Експресията на NGF в доброкачествената хиперпластична тъкан е 100%, сравнено с експресията в малигнената тъкан; тя е по-силна. Изключително силна е експресията на NGF (3+) в нервните и периневралните пространства 3+, корелира с високата степен на патоанатомична недиференциация на простатния карцином.

Препаратът демонстрира, че при намалена диференциация на туморните клетки липсва експресия на BDNF; обратната експресия на NGF е силно положителна.

(Имунохистохимична микрография на пациент Д.Р., ИЗ №18993.19-26.11.2013, хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013, pT3N0M0;G3; Gleason score (5+4)=9)



Фиг. 9. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score 5+4=9, V-52ml, pT3N0M0, G3.

Демонстрира се експресията на NGF(3+) в перипростатна периректално разположена мастна тъкан проксимален участък, при пациент с Gleason score 5, вижда се налична експресия 100% или (3+). В дистална посока експресията на NGF в перипростатната мастна тъкан намалява с около 30% и става (2+) 60%.

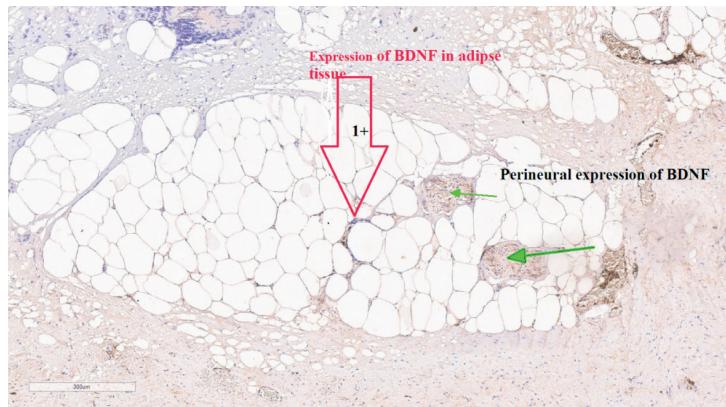
Препаратът представя промяната на експресията на NGF в перипростатната ректално разположена мастна тъкан в зависимост от далечността от туморния процес. Това ни кара да предполагаме, че експресията на NGF отслабва с отдалечаване от туморния процес, а тя е най-силно в мастната тъкан близо до туморния процес

карциномната тъкани при минимални и средни стойности на BMI. Достига до 100% интензитет при стойности на BMI над 28 kg/m^2 . Забелязва се, че експресията на рецептора за NGF е силно положителна с нарастване на BMI.

При рецептора, специфичен за BDNF, тази тенденция е обратна.

С нарастване на BMI започва намаляване на интензитета на експресия. При BMI 17 kg/m^2 липсва експресия в мастната тъкан около простатната жлеза; с покачване на BMI плътността на експресия се засилва, като тя е най-интензивна при пациентите със среден 25 kg/m^2 BMI. При нарастването на този индекс започва намаляване на интензитета на експресия (Фиг. 19 и 20). В простатната тъкан тенденцията е същата. При средни стойности на BMI имаме най-силна експресия в простатната тъкан, разположена ректално; колкото повече се покачва стойността на BMI, толкова плътността на експресия на този рецептор намалява (Табл. 23, Фиг. 14).

Това колерира с митогенната активност на растежните фактори, водещи до клетъчен растеж. Клетките, които са изложени на увеличаващи се концентрации на растежните фактори, постепенно изгубват съществена част от рецепторите си за тях (Фиг. 17). Тази обратна регулация зависи от концентрацията на лиганда. В клетките без лиганд броят на рецептора се нормализира. Свързването на растежния фактор със специфичния му рецептор води до конфигурационни промени в молекулата на рецептора. Тези промени засилват действието на протеин киназите и започват процеси на фосфорилиране и синтез на клетъчни протеини, включително и в самия рецептор. Тирозин-киназното фосфорилиране е най-важният сигнализиращ процес, като този процес се потенцира както от ATP, така и от GTP плюс (Mn^{2+}) и (Mg^{2+}). Вероятната връзка между растежните фактори и неопластичния процес е посредством онкогените и рецепторите за растежни фактори.

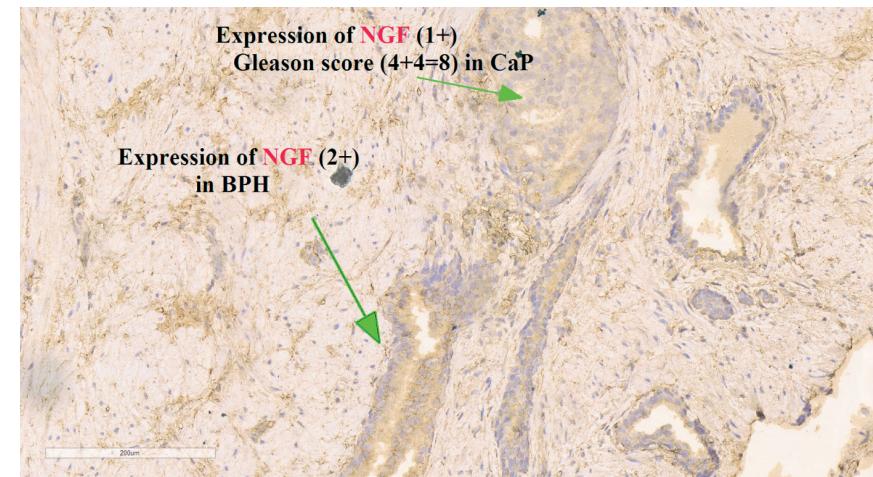


Фиг. 13. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score 5+4=9, V-52ml.pT3N0M0, G3. Демонстрира се експресията на BDNF в перипростатната мастна тъкан с Gleason score 5, вижда се налична експресия под 60% или 2+.

Изключително силна е експресията на BDNF (3+) в нервните и периневралните пространства, 3+, корелира с високата степен на патоанатомична недиференциация на простатния карцином. Имунохистохимична микрография на пациент Д.Р. ИЗ №18993.19-26.11.2013.хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013. pT3N0M0;G3;Gleason score (5+4)=9

Както беше споменато, рецепторите за изследваните от нас растежни фактори са специфични. Те се разполагат върху клетъчните мембрани и са гликопротеини. Смята се, че те дифундират на близко разстояние през интер/интра-клетъчното пространство и действат локално по паракринен или автокринен начин. В противоположност на ендокринните хормони, всеки растежен фактор може да синтезира от различни тъкани както от зрели, така и от ембрионални. Предполага се, че се отделят от всички клетъчни култури (Bradshaw R. Polypeptide growth factors Ann Rev Biochem 1984;53:259-292).

Специфичен за NGF е TrkA рецепторът, а за BDNF е TrkB. От изследваните от нас пациенти с BMI < 25 kg/m², при стойности на BMI 17 kg/m², експресията на TrkA в перипростатната мастна тъкан е 30% при минимални стойности на BMI; тя достига до 60% при средните стойности на BMI. В простатната тъкан експресията на TrkA е 60%, в перипростатната тъкан, разположена периректално, вентрално и в



Фиг. 10. Увеличение (x 100). Пациентът е с BMI 27, PSA-5 nmol/mL, Gleason score 4+4=8, V-65ml.pT2N0M0, G2, 75 г.

Демонстрира се експресията на NGF(2+) в доброкачествено хиперплазиращи простатни жлези (2+).

Демонстрира се експресията на NGF (1+) в карциномна простатната тъкан, Gleason score 4, (1+). Запазва се експресията на този невротрофин Имунохистохимична микрография на пациент Д.Р. ИЗ №18993.19-26.11.2013.хистологичен резултат № 18300/11 от 25.11.2013. pT3N0M0;G3;Gleason score (5+4)=9

Втората зависимост, която беше проследена, е корелацията между BMI и експресия на BDNF.

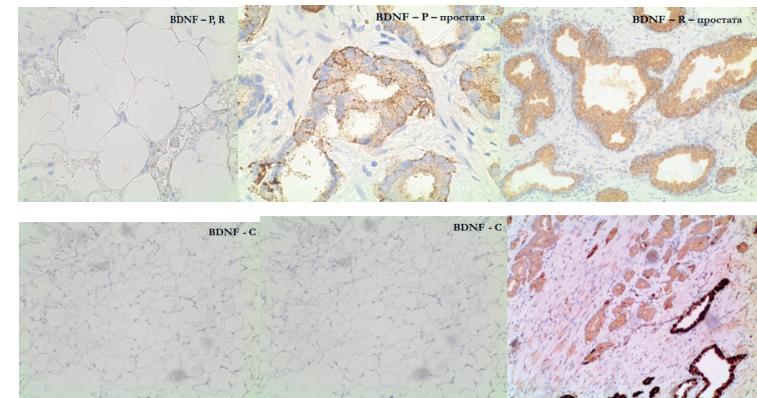
Всички растежни фактори са полипептиди, стимулиращи клетъчната пролиферация чрез свързване със специфични високоафинитетни рецептори, които са локализирани в клетъчната мембрана. На Табл. 22 са представени резултатите от експресията на BDNF. При пациенти с BMI под 25 (минимално 17.2kg/m², максимално 24kg/m², средна стойност 22kg/m²) експресията на BDNF е относително 60% в мастната тъкан, разположена вентрално и периректално. В контролната проба е отрицателна. В простатната жлеза експресията на BDNF при ниски стойности на BMI е налична, като тя е по-силна в простатната тъкан, разположена периректално. В карциномната тъкан тенденцията е към усилване при повишаване стойностите на боди мас индекса (BMI). В

епителните клетки на доброкачествената простатна хиперплазия при ниски стойности на БМИ е 60%, а при висок БМИ достига над 90%.

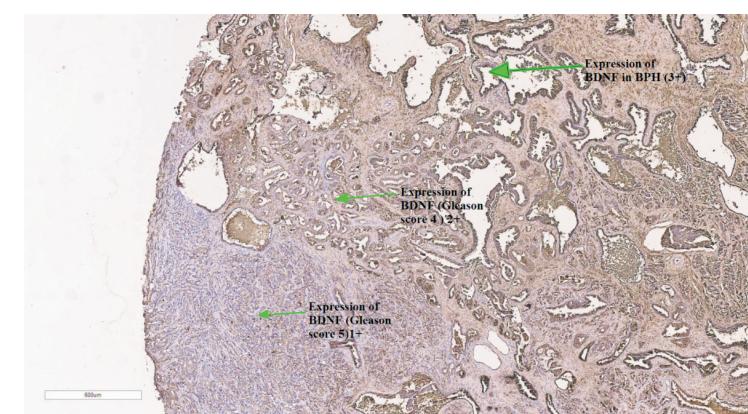
При пациентите с БМИ > 25 (минимален 25 kg/m², максимален 34 kg/m², средни стойности 28.2 kg/m²) си наблюдава тенденция към покачване с растежа на БМИ. При БМИ стойности над 34 kg/m², експресията в мастната тъкан е 60%, независимо къде се намира тя. Няма разлика в експресията на този невротрофин в епителните клетки на простатата. Тя остава висока както в клетките с хиперплазия, така и в карциномните такива (Табл. 22; Фиг 11, 12 и 13).

Табл. 22. Експресия на BDNF в зависимост от BMI <> 25. BDNF BMI < > 25. При тази зависимост стойността на корелация е слаба и обратна

| Брой пациенти | BMI < 25 | Екс. BDNF в Мастна тъкан | | | Екс BDNF В простата | | | |
|---------------|------------|--------------------------|------|-----|---------------------|------|------|-----|
| | | M.PV | M.PR | M.K | P.PV | P.PR | Ca.P | ДПХ |
| 26 | Min - 17.2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| | Med - 22 | 2 | 2 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| | Max - 24 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Брой пациенти | BMI > 25 | Екс. BDNF в мастна тъкан | | | Екс BDNF в простата | | | |
| 24 | Min-25 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | Med- 28.2 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Max- 34 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 3 | 3 |



Фиг. 11. Експресия на BDNF в адипозна тъкан, ДПХ периректално и перипростатично, контролна проба, карциномна тъкан



Фиг. 12. Увеличение (x100). Пациентът е с BMI 24, Gleason score 5+4=9, V-52ml.pT3N0M0, G3. Демонстрира се експресията на BDNF в простатна тъкан с Gleason score 5, вижда се налична експресия под 30% или 1+, която е изключително слаба в най-недиференцираните карциномни клетки. В средата се представя експресията на BDNF (3+) в карциномни клетки с Gleason score 4, тя е 2+, около 70%.

В горния ляв край се демонстрира почти 100% експресия на BDNF в клетки с доброкачествена хиперплазия. Това доказва, че липсва експресия на BDNF в недиференцираните неопластични клетки, а тя е силна в хиперплазиалите желзи.

Препараторът демонстрира диагностичните, прогностични и терапевтични възможности на BDNF