



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra Biochemii i Immunochemii

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Badania produktów zaawansowanej glikacji jako
biochemicznego markera nowotworu prostaty i
uszkodzenia tkanki kostnej

Otto Krawiec

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotorzy:

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Prof. dr hab. Anna Chełmońska-Soyta

Pragnę złożyć podziękowania Panu prof. dr hab. Andrzejowi Gamianowi i Pani prof. dr. hab. Annie Chełmońskiej-Sojcie, moim promotorom, za nieustającą mentorską opiekę, pomoc merytoryczną i niewyczerpane pokłady cierpliwości.

Szczególne podziękowania składam na ręce Panu prof. dr hab. Piotrowi Ziółkowskiemu i Pani dr Elżbiecie Gamian jak również Panu prof. dr hab. Piotrowi Dzięglowi i Pani dr Aleksandrze Piotrowskiej za pomoc w badaniach i nieocenione wsparcie merytoryczne.

Składam również serdeczne podziękowania Pani dr Aleksandrze Kuzan, Pani dr Agnieszce Bronowickiej-Szydelko i Pani dr Kindze Gostomskiej-Pampuch za okazane mi wsparcie, liczne rady i wprowadzenie w arkana pracy laboratoryjnej.

Spis treści

1. Wstęp	7
1.1. Produkty zaawansowanej glikacji	7
1.1.1. AGE10	9
1.1.2. Receptor dla produktów zaawansowanej glikacji	11
1.2. AGE i RAGE w stanach patologicznych	14
1.2.1. Choroby nowotworowe	14
1.2.1.1. Rak prostaty	14
1.2.2. Uszkodzenie tkanek	15
1.2.2.1. Dioksyny	15
1.2.3. Wpływ antyoksydantów i związków przeciwzapalnych na glikację	17
1.3. Gruczoł krokowy	18
1.3.1. Budowa narządu	18
1.3.2. Łagodny przerost prostaty (BPH)	20
1.3.3. Zapalenie prostaty	21
1.3.4. Rak prostaty	22
1.3.4.1. Objawy	23
1.3.4.2. Badania przesiewowe	24
1.3.4.3. Biopsja pod kontrolą ultrasonografii przezodbytniczej	26
1.3.4.4. Leczenie	26
1.3.4.5. Rak prostaty u psów	27
2. Cel pracy	28
3. Materiały i metody	29
3.1. Oczyszczanie przeciwciał anti-MAGE metodą chromatografii powinowactwa	29
3.2. Oznaczanie zawartości białka metodą Bradforda	29
3.3. Dot-bloting	29
3.4. Immunohistochemiczna ocena markerów w raku prostaty	30
3.4.1. Materiał tkankowy do badań	30
3.4.2. Immunohistochemiczna analiza AGE10	30
3.4.3. Immunohistochemiczna analiza RAGE	31
3.4.4. Immunohistochemiczna analiza P63	31
3.4.5. Immunohistochemiczna analiza O37	31
3.5. Immunohistochemiczna analiza tkanki zębowej potomstwa po traktowaniu matek dioksyną	33
3.5.1. Odczynniki	33
3.5.2. Zwierzęta doświadczalne	33
3.6. Analiza statystyczna	35

4. Wyniki	36
4.1. Immunohistochemiczna analiza preparatów raka prostaty	36
4.1.1. AGE10	36
4.1.1.1. Preparaty raka prostaty pochodzące od psów	44
4.1.2. RAGE	46
4.1.3. P63	49
4.1.4. O37	51
4.2. Immunohistochemiczna analiza tkanki zębowej potomstwa po traktowaniu matek dioksyną	55
5. Dyskusja	63
6. Wnioski	68
7. Streszczenie	69
8. Abstract	70
9. Piśmiennictwo	71

Wykaz skrótów

3-DG – 3-deoksyglukoza,

ACG – konwencjonalna glikacja w warunkach wodnych,

AGE-BSA – glikowana albumina surowicy bydlęcej,

AGE10 – natywny analog produktów zaawansowanej glikacji wywodzących się z melibiozy,

AhR – receptor węglowodorów aromatycznych,

BPH – łagodny przerost prostaty,

BSA – albumina surowicy bydlęcej,

CML – karboksymetylolizyna,

Cox-2 – cyklooksigenaza 2,

DAMP – struktury molekularne związane z uszkodzeniem,

DHT – dihydrotestosteron,

DRE – badanie *per rectum*,

eGFR – współczynnik filtracji kłębuszkowej,

FGF – czynnik wzrostu fibroblastów,

FIOPs – fluorescencyjne produkty oksydacji,

HbA1c – hemoglobina glikowana,

hK2 – ludzka kalikreina 2,

HMGB1 – białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej,

HMW-MAGE – wysokocząsteczkowe produkty glikacji wywodzące się z melibiozy,

ICAM-1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna,

IκB – inhibitor czynnika transkrypcyjnego kappa B,

LMW-MAGE – niskocząsteczkowe produkty glikacji wywodzące się z melibiozy,

LPS – lipopolisacharyd,

LUTS – objawy z dolnych dróg moczowych,
MAGE – produkty zaawansowanej glikacji wywodzące się z melibiozy,
MAPK – kinazy aktywowane mitogenami,
MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów,
MGO – metyloglioksal,
MIP-1 – białko zapalne makrofagów,
MMP – metaloproteiny macierzy pozakomórkowej,
MMP-2, MMP-3 – metaloproteiny z grupy żelatynaz,
MWG – glikacja pod wpływem mikrofal,
NF- κ B – czynnik transkrypcyjny kappa B,
PAMP – wzorce molekularne związane z patogenami,
PCa – rak gruczołu krokowego,
PCDDs – dibenzo-*p*-dioksyny,
PEC – trwałe zanieczyszczenia środowiska,
PGE2 – prostaglandyna E2,
PRR – receptory rozpoznające wzorce,
PSA – specyficzny antygen prostaty,
PTX3 – pentraksyna 3,
RAGE – receptor dla produktów zaawansowanej glikacji,
Rb – gen supresorowy RB1,
RFT – reaktywne formy tlenu,
STHML3 – model Stockholm3,
TCDD – 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyna,
TNF – czynnik martwicy nowotworów,

TNF α – czynnik martwicy nowotworów alfa,

TRUS – ultrasonografia przezodbytnicza,

TURP – przezcewkowa elektroresekcja prostaty,

VCAM-1 – naczyniowa molekula adhezyjna,

VEGF – czynnik wzrostu śródblonka,

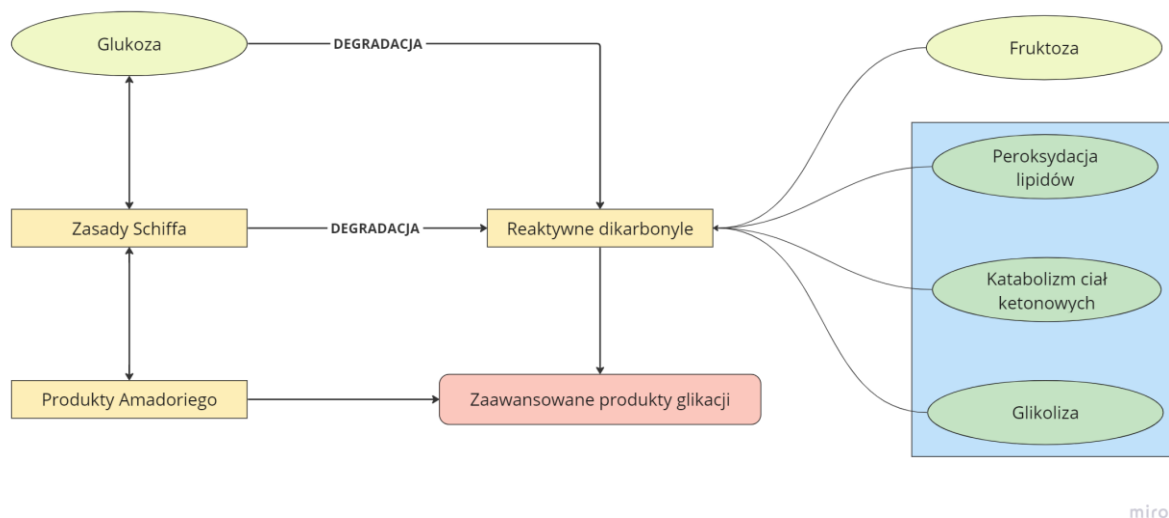
1. Wstęp

Produkty zaawansowanej glikacji to liczna grupa związków powszechnie występujących w organizmach żywych. Ich zwiększona ekspresja jest obserwowana w chorobach metabolicznych, zapalnych i nowotworowych. Ponadto, istnienie natywnego receptora rozpoznającego te związki sugeruje wieloaspektowy, znaczący wpływ produktów glikacji w stanach patologicznych. Mimo to, nie są one stosowane w diagnostyce. AGE10 to nowo odkryty przedstawiciel produktów zaawansowanej glikacji o odmiennej względem pozostałych strukturze i charakterystyce. Dodatkowo, opracowano specyficzny test immunologiczny wykrywający ten epitop. Pozwala nam to przypuszczać, że jakościowe i ilościowe zmiany ekspresji tego produktu mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych i będących następstwem uszkodzenia tkanek. Jednakże, nie dysponujemy dostateczną liczbą badań oceniających ekspresję tego epitopu w tkankach. Celem przeprowadzonych badań jest identyfikacja nowego epitopu w tkankach raka prostaty w korelacji do receptorów dla zaawansowanych produktów glikacji. Dodatkowo, spodziewając się obecności AGE10 w szerszym pojętym uszkodzeniu tkanki, zweryfikowaliśmy ekspresję epitopu w tkankach poddanych działaniu substancji toksycznych.

1.1. Produkty zaawansowanej glikacji

Produkty końcowe zaawansowanej glikacji (advanced glycation end-products – AGE) to grupa złożonych, heterogenicznych związków, które powstają z cukrów redukujących takich jak glukoza i fruktoza, oraz niektórych aldehydów. Tworzą się one w wyniku nieenzymatycznej reakcji z grupami aminowymi białek, lipidów i kwasów nukleinowych¹. Przemiany chemiczne prowadzące do powstania AGE zostały nazwane reakcjami Maillarda. W początkowym etapie tworzą się zasady Schiffa, jest to proces odwracalny, zależny od stężenia substratów (Ryc. 1). Następnie wspomniane związki ulegają przegrupowaniu do produktów Amadoriego – można je również określić mianem pośrednich produktów glikacji – charakteryzują się większą stabilnością, jednakże reakcja nadal jest odwracalna. W ostatnim etapie produkty Amadoriego tworzą kowalencyjne wiązania z białkami, trwale upośledzając ich funkcje^{1,2}. Jednym z produktów przejściowych mogą być reaktywne związki α -dikarbonylowe, takie jak metyloglioksal (MGO) i glioksal. Indukują one stres oksydacyjny i działają proapoptotycznie³, tworzą nieodwracalne wiązania kowalencyjne z resztami lizynowymi i argininowymi białek. Reaktywne α -dikarbonyle mogą również pochodzić ze źródeł niezwiązanych z glikacją, takich

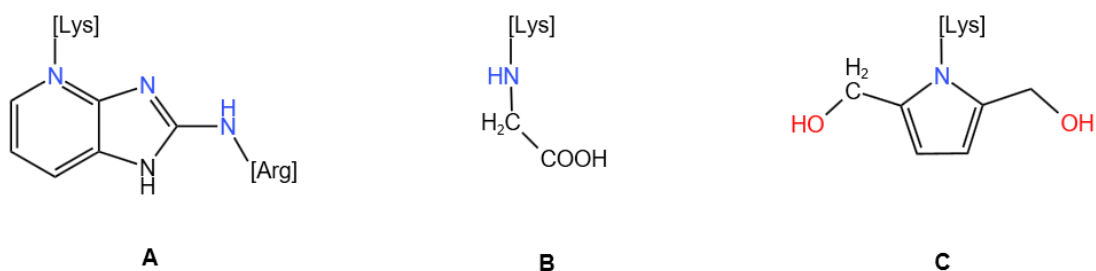
jak peroksydacja lipidów, glikoliza, katabolizm ciał ketonowych i oksydatywna degradacja zasad Schiffa⁴.



Rycina 1. Schemat glikacji. Zielonym kolorem zaznaczono źródła substratów, pomarańczowym grupy związków pośrednich. W niebieskiej tabeli zgrupowano główne endogenne źródła reaktywnych związków dikarbonylowych¹.

Reakcje Maillarda zachodzą w wolnym tempie, AGE tworzą się na przestrzeni tygodni. Najczęściej można je zaobserwować w białkach o długim okresie półtrwania, takich jak kolagen i tubulina². Warto również zauważyć, że istnieją egzogenne AGE, które powstają w wyniku ekspozycji na dym tytoniowy⁵ i obróbki termicznej pokarmów⁶. Z powodu nieenzymatycznej natury reakcji Maillarda, proces ten przebiega również w warunkach fizjologicznych, produkty glikacji akumulują się z wiekiem^{7,8}.

AGE tworzą liczną grupę związków o różnych właściwościach i budowie chemicznej (Ryc. 2). Struktura wielu z nich nadal nie jest poznana, do najbardziej poznanych należą karboksymetylolizyna (CML), pentozydyna i pyrralina.



Rycina 2. Struktury chemiczne wybranych produktów zaawansowanej glikacji: Pentozydyny (A), karboksymetylolizyny (B) i pyrraliny (C)².

Mimo różnorodności AGE, wszystkie produkty glikacji cechują się tworzeniem nieodwracalnych wiązań z wolnymi grupami aminowymi. Skutkuje to opornością zmodyfikowanych białek na działanie enzymów proteolitycznych i prowadzi do usztywnienia macierzy zewnątrzkomórkowej, zaburzenia jej funkcjonowania oraz utrudnionej przebudowy¹.

Glikacja została opisana przez Louis-Camille Maillard'a w 1912 roku⁹. W ciągu ostatnich 40 lat badania w tym obszarze znacznie się zintensyfikowały. Początkowo AGE były kojarzone z przewlekłą hiperglikemią i procesami starzenia się. Nasilenie glikacji obserwuje się w cukrzycy typu II, jednak wysokie stężenie glukozy nie jest warunkiem koniecznym do jej przebiegu. Zwiększoną obecność AGE zaobserwowano w chorobie Alzheimera¹⁰, reumatoidalnym zapaleniu stawów¹¹, miażdżycy¹² i nowotworach¹³.

1.1.1. AGE10

W praktyce laboratoryjnej produkty zaawansowanej glikacji można uzyskać przy użyciu różnych metod. W metodzie konwencjonalnej wykorzystuje się środowisko wodne, w którym roztwór białka inkubuje się z cukrami redukującymi takimi jak glukoza, fruktoza, ryboza czy metyloglioksal (MGO), glikacja zachodzi na przestrzeni tygodni (aqueous conventional glycation – ACG). Alternatywną metodą jest indukcja reakcji w warunkach bezwodnych przy użyciu wysokiej temperatury, między innymi przy wykorzystaniu mikrofal (microwave glycation – MWG)¹⁴.

Reakcja disacharydu, melibiozy z białkami w warunkach bezwodnych tworzy produkty odmienne od uzyskanych metodą klasyczną. Nowo odkrytą grupę związków syntetycznych nazwano MAGE (mel-derived AGEs), od użytego do syntezy substratu – melibiozy. MAGE można dodatkowo podzielić na niskocząsteczkowe MAGE powstałe z glikacji N-acetylolizyny

(LMW-MAGE) i wysokocząsteczkowe MAGE wywodzące się z glikacji białka, na przykład mioglobiny (HMW-MAGE). HMW-MAGE wykazuje działanie genotoksyczne i proapoptotyczne w liniach komórkowych czerniaka, gruczolakoraka płuc i raka jelita grubego. Co ciekawe, LMW-MAGE nie wywołuje efektu genotoksycznego, jednocześnie wpływa hamująco na apoptozę¹⁵.

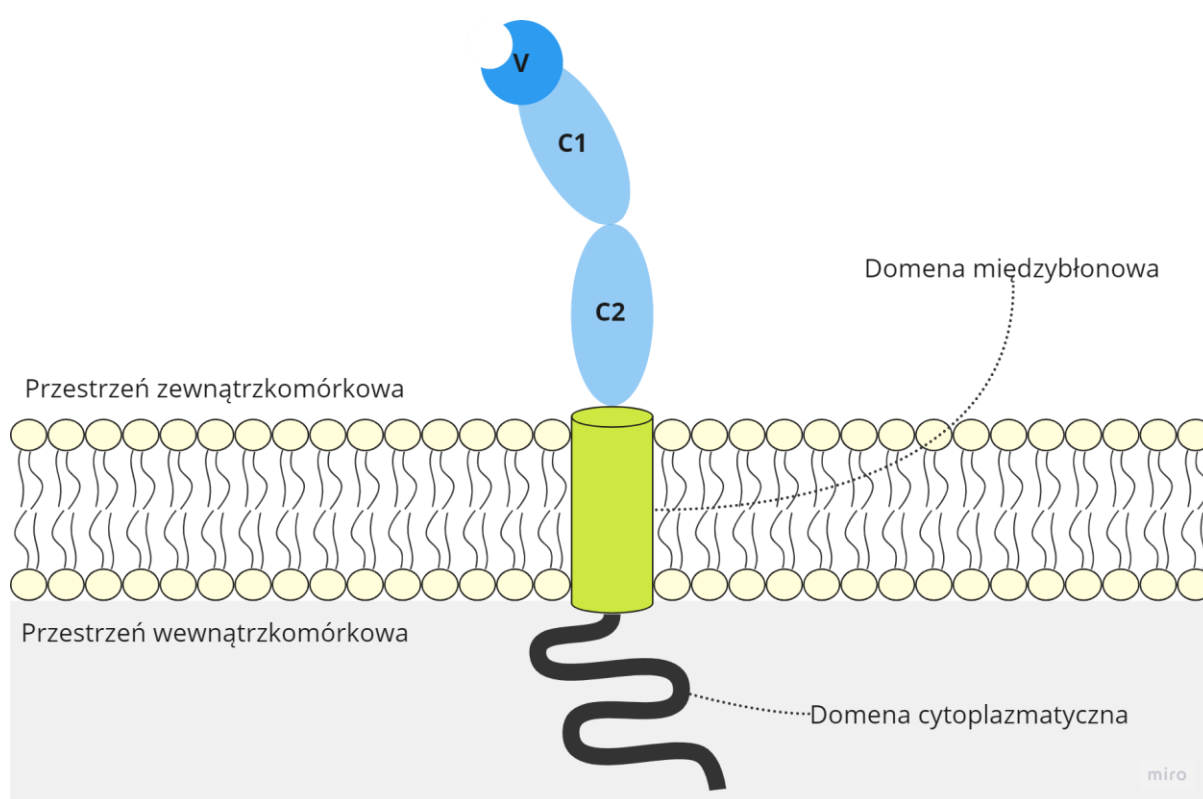
Natywny analog MAGE występuje w organizmach różnych gatunków zwierząt. Nowo poznany epitop, nazwany AGE10, rozpoznawany przez przeciwciała anti-MAGE, jest obecny zarówno u bezkręgowców jak i kręgowców, w tym u człowieka. Zidentyfikowano go w tkance pochodzącej od konia, świni, królika, szczura, żaby i ślimaka¹⁶. AGE10 występuje między innymi w tkankach aktywnych metabolicznie – mięśniach szkieletowych i kardiomiocytach, jednakże, wykryto jego obecność również w tkance łącznej i adipocytach. U człowieka, AGE10 występuje na różnych białkach surowicy ludzkiej, epitop jest obecny na albuminie i immunoglobulinach klasy A i G w osoczu pacjentów chorujących na cukrzycę. Z kolei, w surowicy pacjentów zdrowych nowego epitopu nie obserwuje się na albuminie, za to był obecny na immunoglobulinach IgA i IgG. AGE10 wykryto również w płynie otrzewnowym pacjentów chorujących na raka żołądka¹⁷.

Zmodyfikowane poprzez glikację białka indukują tworzenie się autoprzeciwciał. W badaniach nad surowicą pacjentów chorujących na cukrzycę odnotowano obecność autoprzeciwciał reagujących krzyżowo z MAGE. Jednocześnie, nie zauważono autoprzeciwciał przeciwko produktom glikacji wywodzących się z glukozy¹⁶. AGE10 wykazuje większą immunogenność w porównaniu do pozostałych produktów glikacji.

Przeciwciało monoklonalne anti-MAGE posłużyło do opracowania nowego testu ELISA umożliwiającego pomiary ilościowe MAGE oraz natywnego AGE10. Jest to o tyle istotne, ponieważ obecnie, jedyne dostępne komercyjnie testy immunologiczne wykrywają CML lub całkowity poziom AGE. Za pomocą nowego testu wykazano obecność AGE10 w surowicy pacjentów z mikroangiopatią cukrzycową. Korelacja była mniej zaznaczona u pacjentów leczonych kwasem acetylosalicylowym. Dodatkowo, AGE10 był pozytywnie skorelowany z wskaźnikiem filtracji kłębuszkowej (eGFR) i negatywnie skorelowany ze stężeniem kreatyniny. Nie zaobserwowano związku z glikemią i hemoglobina glikowaną (HbA1c)¹⁸.

1.1.2. Receptor dla produktów zaawansowanej glikacji

Receptor dla produktów zaawansowanej glikacji (RAGE) to białko przynależące do nadrodziny immunoglobulin. Składa się z 5 części: trzech zewnątrzkomórkowych domen (V, C1 i C2), części transbłonowej i domeny osadzonej w cytoplazmie (Ryc. 3). Funkcjonalnie, domena V jest miejscem wiązania się ligandów, a część cytoplazmatyczna jest konieczna do transdukcji sygnału. Geny kodujące RAGE zlokalizowane są na chromosomie 6, blisko rejonu głównego układu zgodności tkankowej typu III¹⁹.



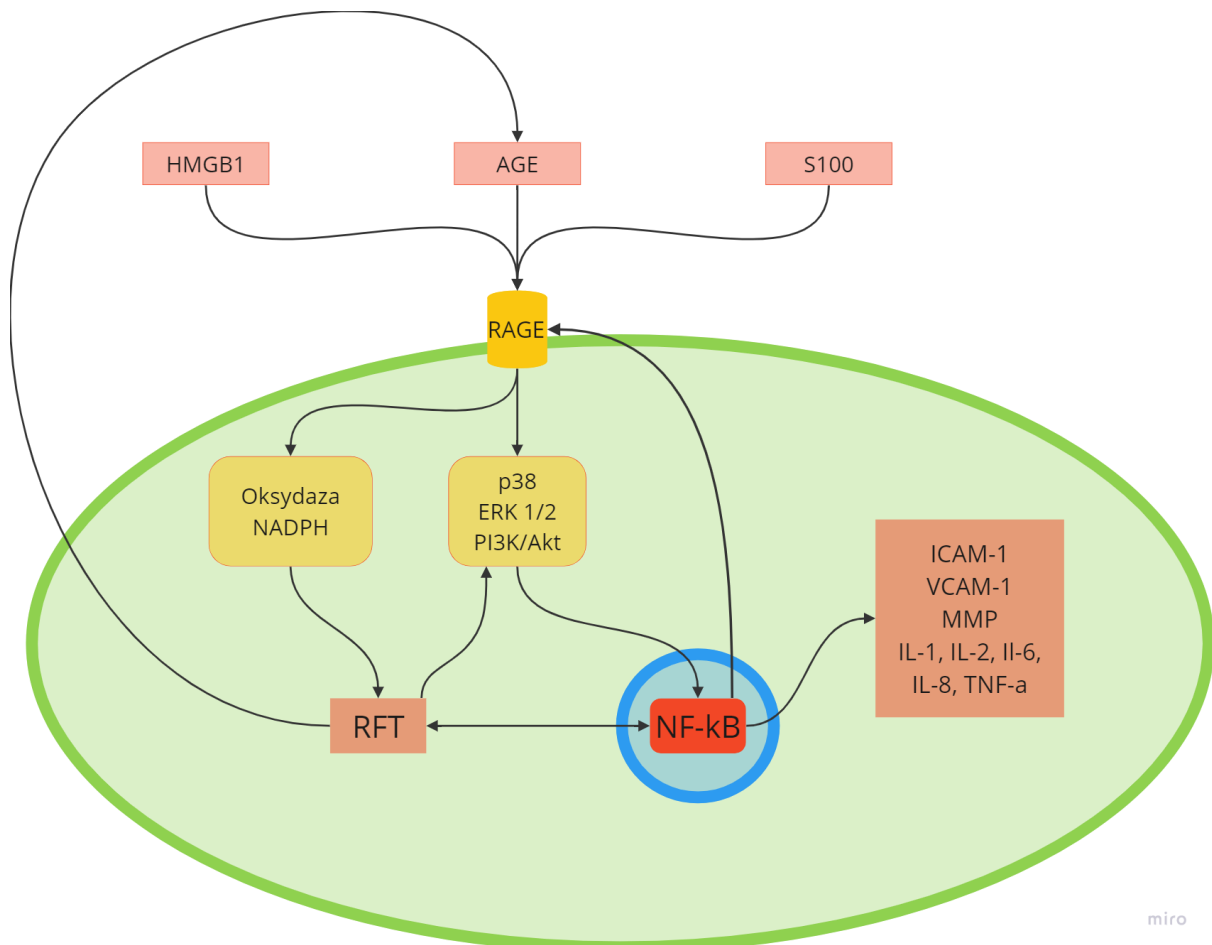
Rycina 3. Budowa receptora dla produktów zaawansowanej glikacji (RAGE). C1, C2 – domeny zewnątrzkomórkowe, V – domena wiążąca ligandy¹⁹.

Konstytutywną ekspresję tego receptora zaobserwowano na błonach podstawno-bocznych pneumocytów typu I. Ponadto RAGE jest obecny na komórkach śródbłonna naczyniowego, kardiomiocytach, i komórkach układu odpornościowego – monocytach, makrofagach, limfocytach i komórkach dendrytycznych^{1,19}. Podwyższona ekspresja RAGE została zaobserwowana w sepsie²⁰, cukrzycy^{1,21}, chorobie Alzheimera²², nefropatii cukrzycowej²³, reumatoidalnym zapaleniu stawów²⁴ i nowotworach²⁵.

RAGE jest multiligandowym receptorem rozpoznającym wzorce (pattern recognition receptors – PRR)²⁶. Receptory tej grupy pełnią kluczową rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Rozpoznają wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP), takie jak lipopolisacharyd (LPS) i bakteryjne DNA. Ligandami PRR, w tym RAGE są również struktury molekularne związane z uszkodzeniem komórek (DAMP) inaczej określane alarminami. DAMP to endogenne związki wydzielane pod wpływem zapalenia lub martwicy²⁷. Przynależy do nich białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (HMGB1) – biorące udział w replikacji DNA. Zwiększone stężenie HMGB1 obserwuje się w martwicy, ponadto jest aktywnie wydzielane przez komórki poddane działaniu cytokin prozapalnych, w szczególności przez monocyty i neutrofile²⁸. Kolejnym przedstawicielem alarmin są białka rodziny S100, odpowiadają za organizację cytoszkieletu i kontrolę cyklu komórkowego²⁹.

RAGE, poprzez szereg szlaków sygnalizacyjnych, aktywuje jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (necrotic factor – NF- κ B), który wzmacnia transkrypcję genów kodujących RAGE. Kolejnym efektem działania RAGE jest zwiększenie aktywności oksydazy NADPH, skutkujące wzrostem stężenia RFT, związki te dodatkowo aktywują NF- κ B^{30,31}. Opisane procesy promują przewlekły stan zapalny i umożliwiają wystąpienie dodatniej pętli zwrotnej. Schemat działania RAGE został przedstawiony na rycinie 4.

NF- κ B jest odpowiedzialny za regulację i adaptację nieswoistej odpowiedzi immunologicznej organizmu. Indukuje ekspresję prozapalnych genów kodujących cytokiny i chemokiny. NF- κ B tworzy kompleksy ze swoistymi inhibitorami (I κ B) obecnymi w cytoplazmie. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego zachodzi poprzez szlaki sygnalizacyjne pochodzące od PRR m.in. przedstawicieli nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów (TNF), receptory obecne na limfocytach T i B i RAGE. Pierwotny mechanizm składa się na fosforylację kompleksów kinaz I κ B, skutkuje to wzmożoną degradacją I κ B w proteasomach i szybką translokacją NF- κ B do jądra komórkowego³². NF- κ B wpływa na transkrypcję genów czynników adhezyjnych – międzykomórkową cząsteczkę adhezyjną (ICAM-1), naczyniową molekułę adhezyjną (VCAM-1), metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP)³³. Czynniki adhezyjne promują naciekanie i tworzenie przerzutów w chorobach nowotworowych³⁴. Ponadto, NF- κ B wzmacnia angiogenezę i odpowiedź zapalną poprzez transkrypcję genów kodujących cytokiny prozapalne – IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α i chemokiny takie jak białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1) i IL-18³³.



Rycina 4. Ligandy i ścieżki sygnałowe RAGE. HMGB1 – białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej; AGE – produkty zaawansowanej glikacji; S100 – nazwa rodzin białek wiążących wapń; RAGE – receptor dla produktów zaawansowanej glikacji; RFT – reaktywne formy tlenu; NF-κB – czynnik transkrypcyjny; p38, ERK 1/2, PI3K/Akt - ścieżki sygnałowe; ICAM-1, VCAM1, MMP – czynniki adhezyjne; IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-a – cytokiny prozapalne³⁰.

1.2. AGE i RAGE w stanach patologicznych

1.2.1. Choroby nowotworowe

W początkowej fazie rozwoju nowotworu, mediatory zapalne indukują zmiany epigenetyczne w komórkach przednowotworowych i wyciszają geny supresorowe. Następująca po tym faza promocji guza, wspierana przez cytokiny i chemokiny, skutkuje przetrwaniem i proliferacją komórek guza^{35,36}. Komórki nowotworowe za pomocą różnych mechanizmów kompensują niedostateczną podaż energii. W zmienionych nowotworowo tkankach obserwuje się zwiększony pobór glukozy i nasiloną glikolizę³⁷. Wysokie stężenie cukrów redukujących i reaktywnych dikarbonyli tworzy optymalne warunki dla glikacji. AGE poprzez interakcje z RAGE wzmagają stan zapalny, nierozzerwalnie związany z inicjacją i proliferacją zmian nowotworowych jak również ich potencjałem do tworzenia przerzutów³⁸.

Produkty zaawansowanej glikacji są obecne w wielu nowotworach. Zauważalna jest różnica w dystrybucji AGE zależna od typu histologicznego nowotworu. Zwiększone miano argpiryminy obserwuje się w raku płaskonabłonkowym krtani i gruczolakoraku piersi. Z kolei gruczolakorak jelita grubego i mięśniakomięsak gładkokomórkowy charakteryzują się większym udziałem karboksymetylolizyny (CML)³⁹. W liniach komórkowych hormononiezależnego, inwazyjnego raka piersi obserwuje się zwiększenie proliferacji i migracji komórek nowotworowych, proporcjonalne do stężenia AGE wywodzących się z MGO. Powiązano to z wynikającą z interakcji AGE-RAGE ekspresją metaloproteinaz (MMP), szczególnie z grupy żelatynaz (MMP-2, MMP-9) – degradują one tkankę łączną i blaszkę podstawną co umożliwia naciekanie i tworzenie się przerzutów⁴⁰. Nadekspresję RAGE obserwuje się w rakach piersi, poziom mRNA RAGE jest znacznie podwyższony w zmianach wysokiego stopnia, ekspresja RAGE jest proporcjonalna do rozmiaru guza⁴¹. Ponadto, wykazano korelację między ekspresją RAGE a rozmiarem i głębokością nacieku w rakach jajnika⁴². W nowotworach trzustki, ponad bezpośredni związek z proliferacją i naciekaniami guza, RAGE odgrywa kluczową rolę w transformacji zmian przednowotworowych⁴³.

1.2.1.1. Rak prostaty

Zaobserwowano wysokie stężenie CML w surowicy pacjentów z rakiem prostaty⁴⁴. Modyfikacja błony podstawnej wywołana glikacją promuje inwazyjność nowotworów prostaty i koreluje z gorszym rokowaniem⁴⁵. Stężenie CML koresponduje ze stopniem zaawansowania PCa mierzonym w skali Gleasona⁴⁶. Podobną korelację zauważono w przypadku RAGE, ekspresja receptora dla produktów zaawansowanej glikacji jest znacząco wyższa u pacjentów

z nowotworami o wyższym stopniu zaawansowania (Gleason >8)^{47,48}. Ponadto podanie glikowanej albuminy surowicy bydlęcej (AGE-BSA) wzmacnia wzrost guza i promuje jego inwazyjność w liniach komórkowych raka prostaty⁴⁹. Obserwuje się również indukcję fosforylacji i degradacji białka kodowanego przez gen supresorowy RB1 (Rb) przyczyniającą się do proliferacji nowotworu prostaty. Mechanizm ten jest uruchamiany poprzez interakcje AGE z RAGE⁵⁰. Wyciszenie genu kodującego RAGE powoduje zmniejszenie stężenia specyficznego antygenu prostaty (PSA) i hamuje proliferację guza w liniach komórkowych raka prostaty⁵¹. Co ważne, nadekspresja RAGE jest ściśle związana ze zmianami nowotworowymi, RAGE w zapaleniu prostaty i łagodnym przerzucie prostaty (BPH) jest obecny w znacznie mniejszym mianie⁴⁸.

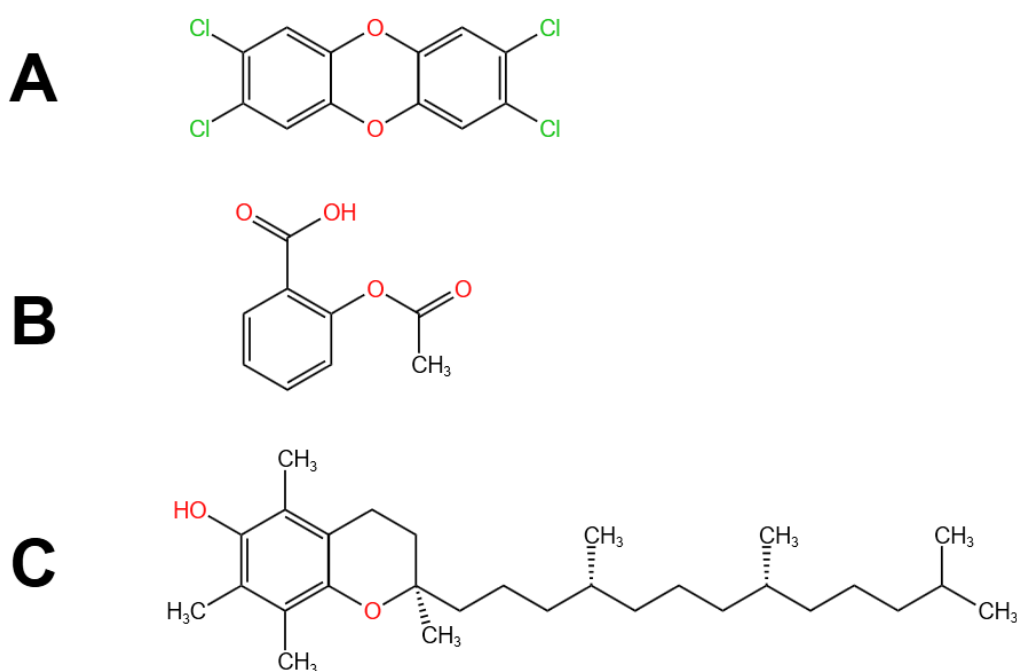
1.2.2. Uszkodzenie tkanek

1.2.2.1. Dioksyne

Dibenzo-*p*-dioksyne (PCDDs) to związki przynależące do halogenopochodnych węglowodorów aromatycznych. Jest to grupa stabilnych, toksycznych substancji powstających w procesach spalania materiałów organicznych lub jako produkt uboczny syntezy związków organicznych. Zwiększone stężenie PCDDs jest szczególnie odnotowywane w krajach uprzemysłowionych, są one określane jako trwałe zanieczyszczenia środowiska (persistent environmental contaminants – PEC). Charakteryzują się długim biologicznym czasem półtrwania jak również tendencją do akumulacji w organizmie, szczególnie w tkance tłuszczowej⁵². Wieloetapowy proces eliminacji dioksyn przyczynia się do powstawania wolnych rodników, które poprzez indukcję stresu oksydacyjnego inicjują lub podtrzymują stan zapalny. Dioksyne to substancje teratogenne, neurotoksyczne i hepatotoksyczne⁵³. Prototypowym związkiem tej grupy jest 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyna (TCDD) (Ryc. 5), wykazuje on ponadto największą toksyczność. TCDD dostaje się do komórek na drodze dyfuzji, by następnie przyłączyć się do obecnego w cytoplazmie receptora węglowodorów aromatycznych (AhR), utworzony kompleks translokuje do jądra komórkowego i pełni rolę czynnika transkrypcyjnego⁵³. AhR zwiększa ekspresję cytokin prozapalnych – TNF α , IL-6, IL-1 β bezpośrednio związanych ze zmianami apoptotycznymi, obserwowanymi między innymi w mięśniu sercowym⁵⁴. Ponadto dioksyne wzmacniają ekspresję cytochromów – szczególnie z układu CYP1A. Cytochromy grupy CYP1A są odpowiedzialne za metabolizm steroidów i ksenobiotyków^{52,53}. W tkankach zwierząt poddanych działaniu TCDD wykryto również zwiększoną aktywność cyklooksygenazy 2 (Cox-2) i podwyższone stężenie reaktywnych form

tłenu (RFT)⁵⁵. W badaniach nad myszami pozbawionymi genu kodującego AhR, nie zauważono działania teratogennego^{56,57}.

Tokoferol wykazuje działanie przeciwutleniające, ponadto wywiera hamujący wpływ na AhR, z kolei kwas acetylosalicylowy jest inhibitorem Cox-2^{52,54}. Kwas acetylosalicylowy (Aspiryna) i α -tokoferol niwelują toksyczność dioksyn, obserwowaną poprzez pomiar ekspresji AhR i Cox-2 w modelu zarodka kurzego⁵⁸. Wzory chemiczne TCDD, aspiryny i tokoferolu zostały przedstawiono na rycinie 5, uwagę zwracając zauważalne pewne podobieństwa strukturalne.



Ryc. 5. Struktury chemiczne 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (TCDD) (A), kwasu acetylosalicylowego (ASA, aspiryny) (B) i α -tokoferolu (witaminy E) (C).

W modelach zwierzęcych, najczęściej występujące malformacje to rozszczep podniebienia i wodonercze⁵⁹. Ponadto obserwuje się zaburzenia rozwoju grasicy, prostaty i czaszki⁵⁷. TCDD powoduje nadekspresję Cox-2, związane z tym zwiększone stężenie prostaglandyny E2 (PGE2) zaburza funkcjonowanie transporterów jonowych co w rezultacie powoduje rozwój wodonercza. Obserwuje się poszerzenie miedniczek nerkowych i zmniejszenie objętości mięszu nerki⁵⁵. TCDD zaburza fizjologiczny rozwój gruczołu krokowego u szczurów poddanych działaniu TCDD *in utero*. Obserwuje się znaczną redukcję objętości gruczołu, zaburzenia różnicowania komórek i nieprawidłowe formowanie się pęcherzyków prostaty^{60,61}. Zauważono również negatywny wpływ na chondrogenę kości czaszki u danio pręgowanego

i skrócenie żuchwy u potomstwa samic poddanych działaniu TCDD⁶². Dioksyny podane samicom szczurów wykazują niekorzystny wpływ na rozwój zębów w okresie pre i postnatalnym^{63,64}.

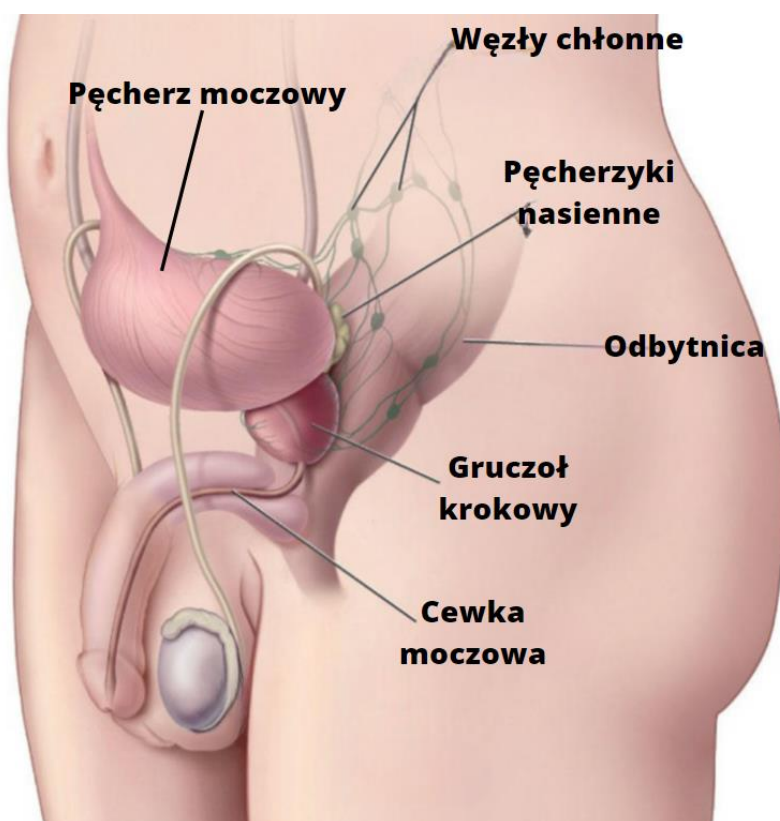
1.2.3. Wpływ antyoksydantów i związków przeciwzapalnych na procesy glikacji

Badania wskazują na bezpośredni związek między obecnością reaktywnych form tlenu (RFT) a nasileniem glikacji⁶⁵. Opisano wiele substancji, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznego, które wykazują zdolność do hamowania glikacji. Przykładem syntetycznego związku o takim działaniu jest aminoguanidyna, posiadająca zdolność do neutralizacji α -dikarbonyli poprzez kondensowanie z nimi i tworzenie związków o heterocyklicznej strukturze⁶⁶. Stosowanie aminoguanidyny prowadzi do zmniejszenia akumulacji AGE w naczyniach krwionośnych oraz redukcji zmian miażdżycowych *in vitro* u szczurów z cukrzycą⁶⁷. Zaobserwowano, że związki pochodzenia roślinnego również redukują glikację⁶⁸. Aktywność hamująca była bezpośrednio związana z zawartością związków fenolowych, zwłaszcza witeksyny i izowiteksyny⁶⁹. Wykazano działanie ochronne ekstraktów z różnych odmian fasoli, takich jak fasola złota, czarna czy soja warzywna. Spośród nich największy potencjał hamowania wykazywała fasola złota – jednocześnie, w porównaniu do pozostałych gatunków fasoli, zawierała największą ilość związków fenolowych⁶⁸. Związki polifenolowe mają zdolność do neutralizacji wolnych rodników oraz mogą przyłączać się do reszty lizyny i argininy, skutecznie blokując miejsca wiązania się α -dikarbonyli⁷⁰. Odnotowano również ochronny wpływ związków przeciwzapalnych. Kwas acetylosalicylowy (Aspiryna) hamował glikację w rogówce i twardówce pacjentów chorujących na cukrzycę, potencjalnie poprzez acetylację wolnych grup aminowych białek. Aspiryna ma również potencjał do neutralizowania wolnych rodników, co dodatkowo może przyczyniać się do hamowania glikacji⁷¹.

1.3. Gruczoł krokowy

1.3.1. Budowa narządu

Prostata to nieparzysty, zlokalizowany podotrzewnowo narząd mięśniowo-gruczołowy będący częścią męskiego układu rozrodczego. Znajduje się poniżej pęcherza moczowego i otacza cewkę moczową. Kształtem przypomina orzech włoski i ma mniej więcej taką samą wielkość. Składa się z podstawy przylegającej do przedniej części pęcherza moczowego; powierzchni przedniej; powierzchni tylnej sąsiadującej z bańką odbytnicy, co umożliwia badanie palpacyjne; powierzchni dolno-bocznej i wierzchołka przylegającego do zewnętrznego zwieracza cewki moczowej. Narząd jest otoczony torebką włóknistą pokrytą powięzią miednicy. Anatomicznie prostatę można również podzielić na płat lewy, prawy i środkowy. Gruczoł krokowy jest unaczyniony przez gałęzie tętnic pęcherzowych dolnych, odbytniczych dolnych i tętnic sromowych wewnętrznych. Splot żylny uchodzi do żyły biodrowej wewnętrznej a limfa sływa do węzłów chłonnych miednicy i węzłów chłonnych krzyżowych. Prostata jest unerwiona przez splot miedniczny⁷².



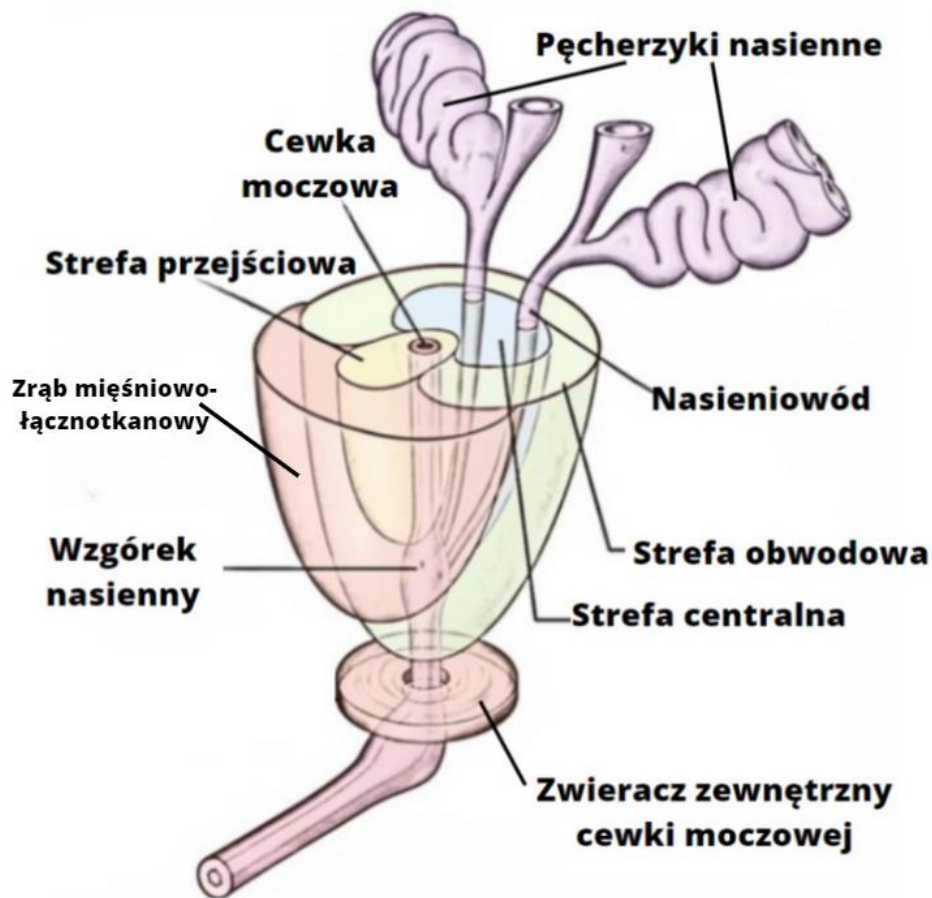
Rycina 6. Lokalizacja anatomiczna gruczołu krokowego
(<https://www.cancer.gov/types/prostate/understanding-prostate-changes>)

Narząd składa się z tkanki gruczołowej, włóknistej i mięśni gładkich które pełnią dwojaką rolę – wspomagają ejakulację i zapobiegają dostaniu się moczu do prostaty w trakcie mikcji⁷³.

W gruczole można wydzielić trzy strefy (Ryc. 7)⁷⁴:

1. Największa, strefa obwodowa. Otacza część strefy środkowej i dystalną część cewki moczowej. Zdecydowana większość przypadków raka gruczołu krokowego wywodzi się z tej strefy (około 70%),
2. Strefa środkowa, stanowiąca około 25% objętości całego narządu. Otacza strefę przejściową, pęcherzyki nasienne i nasieniowody. Rak gruczołu krokowego pochodzący z tej lokalizacji, choć rzadki (około 2,5-5%), charakteryzuje się większą agresywnością i niekorzystnym rokowaniem. Jest to w głównej mierze związane z jego skłonnością do inwazji pęcherzyków nasiennych oraz wysoką tendencją do naciekania poza torebkę gruczołu, głównie poprzez nasieniowody⁷⁵,
3. Najmniejsza, strefa przejściowa. Otacza proksymalny odcinek cewki moczowej, między pęcherzem moczowym a wzgórkami nasiennymi. Z wiekiem strefa ta często przerasta. Nowotwory złośliwe pochodzące z tego obszaru (około 20-25%) zwykle mają dobre rokowanie. Charakteryzują się powolnym wzrostem i niskim potencjałem do naciekania okolicznych tkanek, co częściowo wynika z wewnętrznej lokalizacji. Charakteryzują się wysokimi stężeniami specyficznego antygenu prostaty (PSA) i relatywnie dużym rozmiarem.

Ponadto, wydziela się zrąb mięśniowo-łącznotkankowy, który nie posiada utkania gruczołowego i otacza dolną część prostaty zwaną wierzchołkiem. Przez gruczoł krokowy przebiegają liczne struktury przewodowe: proksymalna część cewki moczowej; dwa nasieniowody i 20-30 przewodów gruczołowych.



Rycina 7. Budowa gruczołu krokowego
 (<https://www.earthslab.com/anatomy/prostate/>)

Główną funkcją gruczołu krokowego jest produkcja zasadowego płynu, działa on protekcyjnie na plemniki, jest ich nośnikiem i neutralizuje kwaśne środowisko żeńskich dróg rodnych. Dodatkowo zawiera sperminę, poliaminę wspomagającą mobilność plemników. W gruczole krokowym testosteron, za pomocą 5α -reduktazy, jest przekształcany w swój aktywny metabolit – dihydrotestosteron (DHT)^{72,73}. Najczęstsze choroby wywodzące się z tego narządu to łagodny przerost prostaty, zapalenie prostaty i nowotwór prostaty⁷⁶.

1.3.2. Łagodny przerost prostaty (BPH)

Hiperplazje prostaty obserwuje się u większości mężczyzn po 60 roku życia. Ma charakter ogniskowy i często lokalizuje się w strefie przejściowej. Kryteria histologiczne przerostu są spełnione u 10% trzydziestolatków, 50% sześćdziesięciolatków, a u mężczyzn w siódmej i ósmej dekadzie życia ponad 80% badanych prostat wykazuje cechy hiperplazji⁷⁷. Nie oznacza

to jednak, że wszyscy pacjenci doświadczają objawów przerostu prostaty. Ponadto, część pacjentów mimo symptomów nie szuka pomocy, uznając, że jest to naturalna kolej rzeczy. Dla niektórych objawy nie są na tyle problematyczne by zasięgnąć porady lekarskiej.

Objawy ze strony dolnych dróg moczowych (Lower urinary tract symptoms – LUTS) są mało swoiste, wskazują na przerost prostaty który może być łagodny w swojej naturze, lub być spowodowany nowotworem prostaty, jak również może wynikać ze schorzeń pęcherza moczowego. LUTS można podzielić na dwie kategorie^{77,78}:

1. Objawy zaporowe – problemy z rozpoczęciem lub kontynuacją mikcji, oddawanie moczu małymi partiami, słaby strumień moczu, częściowa lub pełna retencja moczu, nietrzymanie moczu z przepełnienia,
2. Objawy z podrażnienia – częste oddawanie moczu, uczucie parcia na mocz, nykturia, dysuria.

Dodatkowo pacjenci zgłaszają problemy z erekcją. Sugeruje się, że objętość prostaty przekraczająca 30cm³ dobrze koreluje z obecnością zaburzeń erekcji⁷⁶. Symptomatologia łagodnego przerostu i nowotworów prostaty, szczególnie ograniczonych miejscowo, pokrywa się – uzasadnia to potrzebę badań nad nowymi markerami nowotworów prostaty.

W leczeniu farmakologicznym BPH stosowane są leki blokujące receptor α (α -blokery) takie jak prazosyna lub doksazosyna. Obniżają napięcie mięśni gładkich pęcherza moczowego, co w konsekwencji ułatwia oddawanie moczu. Ponadto stosuje się inhibitory 5 α -reduktazy, powodujące spadek stężenia DHT co skutkuje atrofią gruczołu krokowego i zmniejszenie się jego objętości.

Złotym standardem postępowania w przypadku niepowodzenia leczenia farmakologicznego jest przezcewkowa elektresekcja prostaty (transurethral resection of the prostate – TURP). Resektoskop wprowadza się przez cewkę a następnie, używając pętli diatermicznej, usuwa okołocewkową część prostaty⁷⁹. Komplikacje krótkoterminowe TURP to hematuria, zapalenie dróg moczowych, zastój moczu. Długoterminowo może pojawić się zwężenie cewki moczowej, wysiłkowe nietrzymanie moczu, wytrysk wsteczny i zaburzenia erekcji⁸⁰.

1.3.3. Zapalenie prostaty

Zapalenie gruczołu krokowego może objawiać się bólem podbrzusza i objawami dolnych dróg moczowych (LUTS), jednakże często przebieg jest bezobjawowy. Zapalenie prostaty może

pojawić się na skutek zakażenia bakteryjnego. W leczeniu stosowane są między innymi antybiotyki pokrywające swoim spektrum bakterie gram-ujemne⁸¹.

Macierz zewnątrzkomórkowa pełni kluczową rolę w różnicowaniu się i migracji komórek. Zapewnia strukturalne i biochemiczne wsparcie dla komórek i aktywnie reguluje komunikację międzykomórkową. Zdrowe komórki oddzielone od macierzy nie są zdolne do przetrwania. W przewlekłym zapaleniu prostaty, pod wpływem czynników wzrostu i cytokin prozapalnych, między innymi interleukiny 7 (IL-7), interleukiny 2 (IL-2) i TNF α następuje aktywacja komórek zrębu i związana z tym przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto, przewlekłe zapalenie stymuluje komórki do wydzielania czynników promujących angiogenezę, m.in. czynnik wzrostu śródbłonka (VEGF), IL-8⁸².

1.3.4. Rak prostaty

Rak gruczołu krokowego (PCa) jest drugim najczęstszym rozpoznaniem onkologicznym wśród mężczyzn. Stanowi piątą przyczynę zgonów związanych z nowotworami u mężczyzn. Co roku PCa diagnozuje się u 1,6 miliona mężczyzn, a 366 tysięcy rocznie umiera z jego powodu. Częstość występowania wzrasta wraz z wiekiem, z średnią wynoszącą 66 lat. Poza tym, czynnikami ryzyka są rasa czarna, rodzinna historia raka prostaty, palenie papierosów, otyłość, przewlekłe zapalenie prostaty, radioterapia w wywiadzie^{81,83}.

Zauważono znaczną geograficzną zmienność występowania PCa. Ponad 70% nowotworów diagnozuje się w krajach wysoko rozwiniętych⁸⁴. Najwięcej przypadków PCa odnotowuje się w Stanach Zjednoczonych, Australii i krajach skandynawskich, najmniej z kolei w krajach Azji. Wykazano, że ryzyko PCa wzrasta u ciemnoskórych mężczyzn emigrujących z Afryki do Stanów Zjednoczonych⁸³. Różnice te mogą być podyktowane szeroko stosowanymi w krajach rozwiniętych przesiewowymi badaniami PSA. Skutkuje to większą liczbą rozpoznań w stadium lokalnym ale również pojawieniem się znacznej ilości wyników fałszywie dodatnich.

Otyłość jest szczególnie skorelowana z zaawansowanymi i agresywnymi formami guza⁸⁵. Wysokie BMI powoduje zaburzenia stężeń hormonów płciowych. Otyłość w połączeniu z niską aktywnością fizyczną wywołuje insulinooporność, a związane z nią przewlekłe podwyższone stężenie insuliny promuje wzrost i proliferację komórek nowotworowych⁸⁶.

DHT silnie stymuluje wzrost komórek prostaty⁸⁷. Zaburzenia gospodarki hormonalnej przyczyniają się do rozwoju nowotworów prostaty. Mutacje punktowe w genach kodujących

enzymy odpowiedzialne za syntezę testosteronu i dihydrotestosteronu takich jak 5 α -reduktaza-1, 5 α -reduktaza-2, cytochromy CYP17, CYP3A4, CYP9A1 zwiększają ryzyko PCa. Ponadto, mutacje genów supresorowych, takich jak BRCA1 i BRCA2 korelują z agresywnymi formami nowotworu⁸¹.

Najczęstszym typem raka prostaty jest gruczolakorak, stanowi on 95% przypadków⁸⁸. Rozwija się z komórek gruczołowych i najczęściej lokalizuje się w strefie obwodowej gruczołu. Zmienione komórki tworzą nieregularne struktury, o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego. Gruczolakoraki prostaty mają tendencje do miejscowego naciekania. Rokowanie jest zależne od stopnia zaawansowania nowotworu – przypadki ograniczone miejscowo wiążą się z dobrym rokowaniem. Gruczolakoraki można podzielić na dwa typy: groniasty – występujący zdecydowanie częściej, i przewodowy – o gorszym rokowaniu, często współistniejący z typem groniastym. Kolejnym typem nowotworu jest rak płaskonabłonkowy prostaty. Rozpoznanie jest stawiane rzadko (w około 1% przypadków), charakteryzuje się on dużym stopniem agresywności i szybkim tempem wzrostu, co często skutkuje wczesną diagnozą wynikającą z szybkiego pojawienia się objawów. Ponadto wyróżnia się nowotwory neuroendokrynne i mięsaki – co charakterystyczne, nie powodują one wzrostu stężenia PSA⁸⁹.

1.3.4.1. Objawy

Objawy podmiotowe związane są głównie z przerostem tkanki prostaty. Pokrywają się z symptomatologią BPH. Pacjenci zgłaszają dysurię, uczucie parcia na mocz, nykturię oraz uczucie niepełnego opróżnienia pęcherza. Wymienione symptomy często występują u starszych mężczyzn⁸⁴ i mogą wskazywać na zmiany ograniczone miejscowo⁹⁰.

Nowotwór prostaty najczęściej tworzy przerzuty do tkanki kostnej, szczególnie kości miednicy, żeber i kręgosłupa⁹¹. W zaawansowanych stadiach pojawiają się bóle pleców, zatrzymanie moczu, krwimocz, krew w nasieniu. Objawy te sugerują wyższy stopień zaawansowania raka prostaty, są one związane z lokalnym rozprzestrzenieniem się guza lub pojawieniem się przerzutów odległych^{84,89}. Inwazja do kości kręgosłupa może skutkować kompresją rdzenia kręgowego z towarzyszącymi parestezjami i nietrzymaniem kału⁸⁸.

Większość nowotworów jest wykrywana w stadium lokalnym. Mimo wysokiej chorobowości, w badaniach Eurocare-5 pięcioletnie przeżycie wyniosło 83%⁹². Na przestrzeni ostatnich lat śmiertelność w krajach rozwiniętych zmniejsza się, może mieć to związek z badaniami przesiewowymi. Nowotwór często cechuje się powolnym wzrostem – więcej niż 30%

mężczyzn powyżej 50 roku życia zmarłych z innych przyczyn wykazywało histopatologiczne oznaki nowotworu prostaty⁸⁴. W niedawno przeprowadzonym badaniu, które obejmowało 3 104 380 pacjentów, 10-letnie względne przeżycie dla zlokalizowanego raka prostaty wyniosło 100%. Dla stadium regionalnego, odległego i nieokreślonego, 10-letnie względne przeżycie wyniosło odpowiednio 96,1%, 18,5% i 78,1%⁹³.

1.3.4.2. Badania przesiewowe

Głównym celem badań przesiewowych jest wykrycie choroby we wczesnym stadium. Umożliwia to szybką interwencję i minimalizuje śmiertelność. Badania przesiewowe w PCa są szczególnie istotne – zdecydowana większość wczesnych zmian nie daje objawów bowiem objawów, a PCa istotnie przyczynia się do śmiertelności wśród mężczyzn. Pośród dostępnych narzędzi diagnostycznych, najczęściej wykorzystuje się badanie *per rectum* (digital rectal exam – DRE) i pomiar stężenia specyficznego antygenu prostaty (PSA). Aktualnie zaleca się wykonywanie przesiewowych badań stężenia PSA u mężczyzn po 50 roku życia, a w przypadku współistnienia czynników ryzyka po 45 roku życia⁸⁸. Obecnie badania przesiewowe w kierunku raka prostaty mają niewielki wpływ na 10-letnią śmiertelność związaną z tą chorobą⁹⁴.

DRE jest najtańszą i najbardziej dostępną metodą badania gruczołu krokowego. Podejrzanie zmiany nowotworowej stawia się po wyczuciu asymetrii prostaty lub zmian guzkowych. Niestety, zmieniona nowotworowo tkanka nie zawsze lokalizuje się obwodowo. W niedawnej metaanalizie, czułość DRE przeprowadzanego przez lekarzy pierwszego kontaktu wyniosła 51%, a specyficzność 59%⁹⁵. Stosowanie samego badania *per rectum* nie jest uznawane za diagnostyczne.

Specyficzny antygen prostaty (PSA) to proteaza serynowa przynależąca do kalikrein. Jest wytwarzana prawie wyłącznie przez nabłonek walcowaty gruczołu krokowego. PSA tworzy się wewnątrzkomórkowo z prekursora (pro-PSA), część PSA dostaje się do krwioobiegu w trakcie wydzielania do przewodów gruczołowych – mała frakcja ulega proteolizie i występuje w formie nieaktywnej (fPSA), pozostała część łączy się z inhibitorami proteaz występującymi w osoczu⁹⁶. Produkcja PSA jest zależna od stężenia androgenów⁹⁷. PSA zapobiega koagulacji nasienia poprzez rozkład białek odpowiedzialnych za jego żelową konsystencję, sprzyja ruchliwości plemników i rozpuszcza śluz szyjkowy⁹⁸.

W badaniach przesiewowych mierzy się stężenie wszystkich frakcji PSA (tPSA). Górna granica normy wynosi 4 ng/ml. Wynik mieszczący się w zakresie referencyjnym nie wyklucza diagnozy. U 17% pacjentów z rozpoznaniem PCa stężenie PSA wynosiło 1,1 ng/ml⁹⁹. Co

ważne, wysoko niezróżnicowane zmiany mogą w ogóle nie produkować PSA. PSA ma udowodnioną, wysoką swoistość względem patologii w zakresie prostaty. Mimo szerokiego zastosowania w badaniach przesiewowych, zwraca uwagę jego ograniczona specyficzność¹⁰⁰⁻¹⁰². PSA jest obecny w niskim mianie u osób zdrowych, jego stężenie wzrasta w BPH, zapaleniu gruczołu krokowego i raku^{100,103}. Wysokie stężenie PSA zaobserwowano u ponad 86% mężczyzn z BPH¹⁰⁴. Dodatkowo, stosowanie niektórych leków obniża stężenie PSA, szczególną uwagę powinno poświęcić się pacjentom którzy przekraczają normę przy jednoczesnym stosowaniu m.in. statyn lub tiazydów⁸⁸.

W European randomised study of screening for prostate cancer (ERSPC) wykazano, że aż 75,9% biopsji wykonanych z powodu wysokiego stężenia PSA skutkowało wynikiem negatywnym¹⁰⁵. Zależnie od wieku pacjentów i obranej wartości odcięcia czułość PSA względem PCa wynosi między 9% a 33%¹⁰⁴. Ponadto, u 25% pacjentów z rakiem prostaty miano PSA może być w normie⁸⁴. W badaniach Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening (PCLO) nie zauważono wpływu badań stężenia PSA na śmiertelność całkowitą¹⁰⁶. Można to tłumaczyć powolnym tempem wzrostu PCa. Większość raków wykrywanych z powodu wysokiego stężenia PSA jest klinicznie mało istotna, ocenia się, że jedynie około 25% pacjentów z rakiem niskiego stopnia będzie wymagało terapii z powodu progresji zmian⁹⁶. Nadmiarowa terapia skutkuje znacznym pogorszeniem jakości życia u pacjentów przewyższającym nad potencjalnymi korzyściami.

Diagnostykę nieinwazyjną można pogłębić wykorzystując fakt występowania różnych izoform PSA. Wykazano korelacje pro-PSA z agresywnymi typami PCa¹⁰⁷. Z kolei, frakcja wolna koresponduje z BPH. Zaproponowano użycie proporcji fPSA do tPSA jako badania wspomagającego różnicowanie nowotworu ze zmianami łagodnymi. Mały stosunek fPSA do tPSA koresponduje ze zmianami nowotworowymi¹⁰⁸. Jeszcze większą wartość przynoszą dostępne na rynku testy porównujące stężenia szeregu kalikrein obecnych w osoczu. Prostate health index (phi) i test 4K wykazują ponad 90% negatywną wartość predykcyjną^{109,110}. Mimo wysokiej skuteczności, nie nadają się do stosowania w badaniach przesiewowych, między innymi z powodów wysokich kosztów.

1.3.4.3. Biopsja pod kontrolą ultrasonografii przezodbytniczej

Ultrasonografia przezodbytnicza (TRUS) jest najczęściej stosowaną metodą obrazowania prostaty. Za pomocą sondy, przy użyciu fal o częstotliwości 7,5 MHz, wizualizuje się tkankę gruczołu krokowego. Rak najczęściej manifestuje się jako hipoechogeniczna masa, a gruczoł

krokový jest zwykle powiększony¹¹¹. Dokładność diagnostyczna oscyluje między 44,4% a 73,5% w zależności od stopnia zaawansowania histologicznego nowotworu. Diagnozy fałszywie pozytywne zostały postawione w 25,9% przypadkach, a fałszywie negatywne w 12,8%.¹¹². Obecnie zaleca się wykonanie TRUS w połączeniu z biopsją. W trakcie procedury pobiera się od 10 do 12 rdzeni tkankowych z różnych rejonów prostaty. Biopaty są następnie oceniane za pomocą skali Gleasona. Pod uwagę bierze się stopień zróżnicowania komórek i ich układ. Mniejsza komponenta utkania gruczołowego koreluje z wyższym stopniem złośliwości. W badaniu histopatologicznym ocenia się typ zmian nadając mu stopień od 1 do 5, gdzie 1 odpowiada tkance normalnej, a 5 tkance składającej się w całości z komórek atypowych. Następnie sumuje się wyniki dwóch najbardziej dominujących typów zmian. Sumaryczna wartość poniżej 6 koresponduje z dobrym rokowaniem, wskazuje na zmiany o niskim ryzyku. Wynik 8 i powyżej wskazuje na wysoką atypię i są związane z gorszym rokowaniem. Mimo powszechnego stosowania i przydatności skali Gleasona, zwłaszcza w prognozowaniu przebiegu nowotworu, jest ona podatna na subiektywną interpretację histopatologów oceniających tkankę¹¹³.

1.3.4.4. Leczenie

Przed podjęciem leczenia ocenia się jego zasadność. Zmiany niskiego ryzyka, ocenione poniżej 6 w skali Gleasona, najczęściej mają małe znaczenie kliniczne i cechują się powolnym wzrostem. W takich przypadkach bierze się pod uwagę wiek pacjenta i choroby współistniejące, jeżeli prognozowana długość życia nie przekracza 10 lat można zastosować aktywny nadzór. Pacjent powinien regularnie badać stężenie PSA i wykonać powtórny biopsję w przeciągu 12-18 miesięcy od momentu postawienia diagnozy. Stosuje się również leczenie farmakologiczne.

Najczęściej stosowaną farmakoterapią jest leczenie hormonalne mające na celu obniżenie poziomu androgenów m.in. leuprorelina, goserelina. Leki te hamują wydzielanie gonadotropiny, co skutkuje obniżeniem poziomu androgenów we krwi, efekt jest zauważalny po około 3 tygodniach stosowania. Leczenie antyandrogenowe może być z powodzeniem stosowane również u pacjentów z przerzutami. Kolejną grupą stosowanych leków są antagoniści receptora androgenowego m.in.. flutamid, bikalutamid⁸⁸.

Złotym standardem postępowania chirurgicznego w przypadku nowotworów zlokalizowanych do tkanek prostaty jest radykalna prostatektomia. Operację wykonuje się szczególnie u pacjentów z prognozowaną długością życia powyżej 10 lat lub w przypadku zmian wysokiego

ryzyka (powyżej 6 w skali Gleasona). Związana jest z dobrym rokowaniem. Jedną z głównych komplikacji pooperacyjnych są wysiłkowe nietrzymanie moczu, zaburzenia erekcji i wynika z tego pogorszona jakość życia⁸⁸.

W badaniach, 14-89% mężczyzn po radykalnej prostatektomii doświadczyło zaburzeń erekcji. Nie wykazano statystycznej różnicy w pojawianiu się dysfunkcji seksualnych między radykalną prostatektomią z dostępu załonowego a prostatektomią wykonaną z użyciem robota⁷⁶. W przypadkach choroby rozsianej stosuje się leczenie paliatywne, m.in. wykorzystuje się transuretralną elektroresekcję prostaty (TURP) celem zmniejszenia objawów zaporowych.

1.3.4.5. Rak prostaty u psów

Pies domowy to jedyny gatunek ssaków u którego może rozwinąć się rak prostaty. Prewelencja PCa wśród psów jest znacząco mniejsza w porównaniu do ludzi, w badaniach na 15 000 przyjętych psów, 431 miało chorobę prostaty, a tylko 56 miało raka prostaty¹¹⁴. Jednakże, prawdziwa zapadalność może być zaniżona z powodu niedostępności testów przesiewowych, w przeciwieństwie do dostępnego w diagnostyce ludzi pomiaru stężenia PSA; braku wykonywania rutynowego badania *per rectum* i wysokiej agresywności tych nowotworów skutkujących stawianiem błędnej diagnozy, wywodzącej się z objawów neurologicznych spowodowanych uciskającą tkanką guza lub przerzutami odległymi¹¹⁵.

PCa u psów charakteryzuje się hormononiezależnością i wysoką agresywnością, histologicznie dominuje rak gruczołowy i urotelialny¹¹⁶. Uwagę zwraca znaczna morfologiczna heterogenność PCa utrudniająca diagnostykę histopatologiczną¹¹⁷.

2. Cel pracy

Niedawno zidentyfikowany produkt zaawansowanej glikacji – AGE10, różni się od pozostałych, klasycznych związków glikacji. Obecność AGE10 została wykazana w tkankach ludzkich. Rola nowego epitopu w procesach nowotworzenia i uszkodzenia tkanek nie jest poznana. W niniejszej rozprawie postawiono trzy cele:

1. Immunohistochemiczną identyfikację obecności AGE10 w tkankach nowotworu prostaty u człowieka i psa,
2. Immunohistochemiczną identyfikację obecności RAGE w tkankach prostaty u człowieka i próba określenia korelacji względem AGE10,
3. Immunohistochemiczną identyfikację obecności AGE10 w tkankach szczura poddanych działaniu związków cytotoksycznych.

3. Materiały i metody

3.1. Oczyszczanie przeciwciał anti-MAGE metodą chromatografii powinowactwa

Doświadczenia z przygotowaniem przeciwciał wykonano w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, gdzie otrzymano klony hybrydom wytwarzające przeciwciała monoklonalne, jak opisano wcześniej^{14,18}. Kolumnę powinowactwa z immobilizowanymi MAGE przepłukano roztworem 2% PBS (30 ml). Następnie naniesiono supernatant zawierający przeciwciała monoklonalne anti-MAGE, pozyskane z hodowli komórek hybrydoma (10 ml). Kolejno kolumnę płukano roztworem 2% PBS w objętości odpowiadającej dwóm kolumnom (60 ml). Eluent pozyskano płuczając kolumnę za pomocą 7 ml 3M roztworu rodanku potasu (KSCN). Materiał był zbierany w 1 ml porcjach. Próbkki były testowane na obecność białka przy użyciu spektrofotometru, mierzono absorbancję przy długości 280 nm. Próbkki zebrano we frakcje odpowiadające elucji PBS i KSCN. Materiał zagęszczono do końcowej objętości 150 μ l, używając filtrów wirówkowych typu Amicon Ultra-15 (Merck Milipore). Za punkt odcięcia obrano 30 kDa. Zastosowano siłę wirowania 5000 x g, przez okres 20 minut. W zagęszczonym materiale oznaczano stężenie białka przy użyciu Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific)¹⁷ oraz aktywność metodą dot-blotingu (metody 3.2 i 3.3, odpowiednio). Oczyszczone w ten sposób mysie przeciwciała monoklonalne klasy IgE, indukowane w wyniku immunizacji produktami zaawansowanej glikacji MAGE, rozpoznają w opracowanych testach immunochemicznych tkankowy epitop AGE10^{14,18}.

3.2. Oznaczanie zawartości białka metodą Bradforda

Roztwór białka o objętości próbki 150 μ l mieszano z odczynnikiem Bradforda firmy Thermo Scientific (150 μ l) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Jako standardu do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej używano albuminy surowicy wołowej (BSA – Bovine Serum Albumin) w zakresie stężeń od 0-20 μ g.

3.3. Dot-bloting

Frakcje z kolumny powinowactwa nakładano po 5 μ l na zaktywowaną metanolem błonę PVDF (Immobilon®-P Transfer Membrane, Millipore, pore size 0,45 μ m, IPVH00010) za pomocą pipety. Na błonę uprzednio nasączoną antygenem MAGE otrzymanym metodą mikrofalową MWG (MicroWave Glycation)¹⁸. Membranę zanurzano w 5% mleku na TBST i prowadzono inkubację 2h w temperaturze pokojowej i 18h w temperaturze 4°C. Następnie

przepłukano błonę 3x4min w TBST i zalano roztworem II rzędowych przeciwciał anty mysiej IgE (JacsonImmuno Research, 315-035-045) sprzężone z peroksydazą w rozcieńczeniu 1:10 000. Kontrolę stanowiły próby nie poddawane reakcji z II rzędowymi przeciwciałami. Następnie przepłukano błony jak wcześniej i zainicjowano reakcję katalizowaną przez peroksydazę dostarczając roztworu AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole, Sigma, A5754). Po 5 minutach błony przepłukiwano w wodzie destylowanej i odczytywano wynik obecności immunoreaktywnych przeciwciał we frakcjach.

3.4. Immunohistochemiczna ocena markerów w raku prostaty

3.4.1. Materiał tkankowy do badań

Do analizy wykorzystano 37 preparatów udostępnionych przez Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego z banku tkanek do badań retrospektywnych po zatwierdzeniu przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (ST-727). 21 preparatów ze zmianami o umiarkowanym ryzyku (Gleason 6-7), 16 preparatów ze zmianami o wysokiej agresywności (Gleason >7). Równolegle wykorzystano 8 preparatów raka prostaty psa, udostępnione przez Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (prof. dr hab. Stanisław Dzimira), do badań retrospektywnych, na obecność antygenu AGE10. Próbkę tkanek ludzkich przeznaczone do diagnostyki histopatologicznej pochodzące z kliniki zostały przeznaczone do badania immunohistochemicznego (IHC) w celu wykazania i potwierdzenia statusu markerów AGE10, RAGE, O37 oraz P63 w uzyskanych próbkach. Bioptyaty tkanek zwierzęcych zostały zbadane na obecność epitopu AGE10. Fragment pobranej tkanki został utrwalony w 4% formaldehydzie w PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanami) w momencie pobrania chirurgicznego i został zatopiony w parafinie (FFPE) w celu cięcia na sekcje 4 µm.

3.4.2. Immunohistochemiczna analiza AGE10

Skrawki materiału umieszczone na szkiełkach powlekanych poli-l-lizyną zostały odparafinowane przy użyciu ksyłenu (3 x 6 min), tkanka została nawodniona przy użyciu serii roztworów etanolu (100% - 50%, po 4 minuty), a następnie płukana wodą destylowaną. Między poszczególnymi etapami materiał był opłukiwany w roztworze soli fizjologicznej buforowanej TRISem (TBS, 3 x 4 min). Do odkrycia antygenu zastosowano metodę odsłonięcia epitopu w wysokiej temperaturze (HIER). Materiał został zanurzony w buforze cytrynianowym i poddany działaniu mikrofal (2 x 8 min, 350W, mikrofalówka firmy Daewoo). Materiał został poddany działaniu odczynnika blokującego endogenną peroksydazę (Peroxidase-Blocking

Solution, DAKO) przez 10min, następnie zastosowano roztwór blokujący Protein Block Serum-Free (DAKO) celem zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania swoistych przeciwciał (20 min, w wilgotnej komorze). Następnie materiał został poddany działaniu przeciwciał pierwszorzędowych anti-MAGE (w ilości 150 μ l na preparat, pozostawionych na noc w temperaturze 4°C). Przeciwciała drugorzędowe stanowiły biotynylowane II rzędowe kozie przeciwciała anti-mysie IgE (Jackson ImmunoResearch), po czym stosowano streptawidynę-HRP (30min). Materiał został poddany działaniu 3,3'-diaminobenzydyny (DAB, DAKO) (5min). Skrawki zostały wybarwione hematoksyliną (2min), opłukane bieżącą wodą, odwodnione w serii roztworów etanolu (50%-100%, po 4 min), zanurzone w ksylenie (3 x 6 min), następnie umieszczono szkiełko nakrywkowe stosując żywicę syntetyczną jako medium zamykające (DAX). Kontrola negatywna została uzyskana poprzez podanie TBS w miejsce przeciwciał pierwszorzędowych. Analiza materiału została wykonana przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon Corp., Minato, Tokio, Japonia).

3.4.3. Immunohistochemiczna analiza RAGE

Zastosowano tożsamą metodę do opisanej w podrozdziale 3.4.2. Materiał został poddany działaniu przeciwciał pierwszorzędowych anti-RAGE (pozostawionych na noc w temperaturze 4°C). Przeciwciała drugorzędowe stanowiły przeciwciała anti-mysie IgG).

3.4.4. Immunohistochemiczna analiza P63

Dodatkowym przeciwciałem użytym w niniejszych badaniach było poliklonalne przeciwciało anti-P63 – rutynowo stosowane w diagnostyce raka prostaty.

Zastosowano tożsamą metodę do opisanej w podrozdziale 3.4.2. Materiał został poddany działaniu przeciwciał pierwszorzędowych anti-P63 (w ilościach stosowanych w rutynowej diagnostyce według instrukcji firmy Abcam. Przeciwciała drugorzędowe zastosowano również według instrukcji producenta).

3.4.5. Immunohistochemiczna analiza O37

W celu porównania reaktywności, a zarazem swoistości badanych przeciwciał wykonano także doświadczenia z przeciwciałami króliczymi wobec antygenu zawierającego kwas sjałowy, składnik tkanek ludzkich. Surowicę króliczą anti-O37 otrzymano od dr Agnieszki Korzeniowskiej-Kowal z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN. Zastosowano tożsamą metodę do opisanej w podrozdziale 3.4.2. Materiał został poddany działaniu przeciwciał pierwszorzędowych anti-O37 (surowica rozcieńczona 1:200, na noc w temperaturze 4°C). Przeciwciała drugorzędowe stanowiły przeciwciała anti królicze IgG.

3.5. Immunohistochemiczna analiza tkanki zębowej noworodków szczura od matek poddanych działaniu dioksyn

Analizie poddano preparaty histologiczne tkanek noworodków szczura uzyskane w przebiegu doświadczenia przeprowadzonego w Katedrze Biochemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu przy współudziale pracowników Katedry Patomorfologii, Stomatologii Zachowawczej i Pedodoncji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu i Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej.

Barwienie immunohistochemiczne zostało wykonane przez dr Kingę Gostomską-Pampuch zgodnie z podaną niżej metodą. W zakresie tego badania leżała ocena immunohistochemiczna preparatów pod kątem reaktywności AGE10 i jego roli w cytotoksyczności dioksyn.

3.5.1. Odczynniki

1. Octan alfa-tokoferolu (roztwór lipidowy wykonany na zamówienie przez Hasco-Lek SA we Wrocławiu),
2. Kwas acetylosalicylowy – Aspiryna firmy Bayer (zawiesina w skrobi została przygotowana w Zakładzie Biochemii Lekarskiej Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego),
3. Tiopental (Biochemie GmbH),
4. Roztwór 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD) – (Greyhound Chromatography And Allied Chemicals, numer katalogowy: DD-2378-S). Roztwór przygotowany poprzez rozpuszczenie w dimetylosulfotlenku, do uzyskania stężenia 5µg/ml, wykonany w Zakładzie Technologii Organicznej i Farmaceutycznej Politechniki Wrocławskiej.
5. Anty-MAGE, monoklonalne przeciwciało uzyskane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, we Wrocławiu.
6. Surowicę poliklonalną króliczą anti-O37 otrzymano od dr Agnieszki Korzeniowskiej-Kowal z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,
7. Odczynniki do barwienia immunohistochemicznego (NovoLink MinPolymer DS, Nr RE7290-CE Novocastra)

3.5.2. Zwierzęta doświadczalne

Do eksperymentu zostały wykorzystane samice szczurów linii Buffalo (w wieku od 9 do 11 tygodni, o masie w przedziale 130 do 150g). Szczury były hodowane w Zwierzętarni

Doświadczalnej Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego. Eksperyment uzyskał zgodę lokalnej komisji etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach (pozwolenie nr 11/2009/0027;38/2009). Podczas eksperymentu zwierzęta były utrzymywane w polistyrenowych klatkach, z dostępem do pokarmu firmy "Labofeed H" i wody. Zwierzęta były utrzymywane w następujących warunkach: wymiany powietrza 15 zmian na godzinę, temperatura 22°C i wilgotności 55%. Cykl świetlny wynosił 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Doświadczenia wykonano dzięki uprzejmości prof. Piotra Kuroпки w Katedrze Histologii Wydziału Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Zwierzęta laboratoryjne zostały losowo przydzielone do czterech grup, każda składająca się z 6 samic:

1. Grupa kontrolna, bez ekspozycji na substancje chemiczne,
2. Grupa poddana działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny w pojedynczej dawce 5µg/kg masy ciała, i.m.,
3. Grupa poddana działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny w pojedynczej dawce 5µg/kg masy ciała, i.m. i octanu alfa-tokoferolu w dawce 30 mg/kg masy ciała na dobę, s.c., przez okres 3 tygodni,
4. Grupa poddana działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny w pojedynczej dawce 5µg/kg masy ciała, i.m. i kwasu acetylosalicylowego w dawce 50mg/kg masy ciała na dobę, przez okres 3 tygodni.

Po okresie 3 tygodni, samice szczurów zostały sparowane z losowo dobranymi samcami z tej samej linii, nie poddanymi działaniu substancji chemicznych. Po tygodniu ciężarne samice szczurów odseparowano do osobnych klatek. Po około 21 dniach ciąży, samice zaczęły rodzić potomstwo które zostało podzielone na 4 grupy (każda składająca się z 24 młodych):

1. Potomstwo grupy kontrolnej (NK),
2. Potomstwo grupy poddanej działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny (NTCDD),
3. Potomstwo grupy poddanej działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny i tokoferolu (NTCDD + E),
4. Potomstwo grupy poddanej działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny i kwasu acetylosalicylowego (NTCDD + ASA);

By uniknąć wpływu dioksyn obecnych w mleku matek, drugiego dnia życia szczury zostały poddane eutanazji poprzez podanie dootrzewnowo tiopentalu w dawce 120 mg/kg masy ciała.

Materiał został pobrany do dalszych badań, mianowicie tkanki rozwijających się zębów. W badaniach przeprowadzonych w tej pracy został wykorzystany materiał obejmujący fragmenty szczęki górnej i dolnej. Odnośnie eksperymentów z użyciem zwierząt metody użyte były według procedur stosowanych rutynowo jak poprzednio¹¹⁸. W skrócie, w materiale pochodzącym od zwierząt zostały odpreparowane fragmenty żuchwy, które zawierały zęby trzonowe. Tak przygotowany materiał odwapniono w mieszaninie stężonych kwasów: kwasu solnego i kwasu mrówkowego (przez 24 godziny). Następnie materiał został odwodniony w serii alkoholowej, oczyszczony w benzoesanie metylu i osadzony w parafinie. Skrawki inkubowano następnie w wilgotnej komorze z przeciwciałem monoklonalnym anti-MAGE jak wyżej, w stężeniu 2 pg/ml przez 12 godzin w temperaturze 4°C. Przeciwciała drugorzędowe stanowiły II rzędowe kozie przeciwciała anti-mysie IgE. Jądra komórkowe były przeciwbarwione hematoksyliną Mayersa.

3.6. Analiza statystyczna

Modelowanie statystyczne zostało wykonane z użyciem pakietu STATISTICA 13.3, na licencji Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Do sprawdzenia, czy AGE oraz RAGE wpływają na szansę uzyskania wyższego wyniku Gleason, użyto ogólnego modelu nieliniowego opartego na rozkładzie wielomianowym porządkowym oraz funkcji wiążącej typu logit (porządkowa regresja logistyczna). Funkcja ta pozwala na wyliczenie szansy ze współczynników β i modelu. Model jest oparty na kilku wyrazach wolnych, opisujących:

- Szansę zaobserwowania wyniku Gleason większego od 9 (wyraz wolny 1),
- Szansę zaobserwowania wyniku Gleason większego od 8 (wyraz wolny 2),
- Szansę zaobserwowania wyniku Gleason większego od 7 (wyraz wolny 3),
- Szansę zaobserwowania wyniku Gleason większego od 6 (wyraz wolny 4).

Z racji porządkowości skali Gleason, wyrazy wolne 1 – 4 stopniowo zwiększają się. Taka kompozycja modelu pozwala wyciągnąć wnioski, czy:

1. Wszystkie wyrazy wolne (szanse) zmieniają się pod wpływem wzrostu intensywności AGE, przy założeniu ujemnego RAGE (efekt ‘AGE’),
2. Wszystkie wyrazy wolne zmieniają się pod wpływem uzyskania dodatniego wyniku RAGE, przy założeniu ujemnego AGE (efekt ‘RAGE’),
3. Opisany wcześniej efekt AGE (1.) jest różny dla ujemnego i dodatniego RAGE oraz – czy opisany wcześniej efekt RAGE (2.) jest różny dla jakiegokolwiek wartości intensywności AGE (interakcja ‘AGE*RAGE’).

Modele były budowane w oparciu o klasyczną, szeroko przyjętą konwencję: wpierym badano dwa wspomniane efekty (1. i 2.) a potem wprowadzono do nich interakcję (3.). W razie braku istotności statystycznej interakcji 3., pozostawano przy modelu z efektami 1. i 2. – w fazie wyciągania wniosków.

4. Wyniki

4.1. Immunohistochemiczna analiza preparatów raka prostaty

Badania wykonano w zespole Profesora Piotra Ziółkowskiego w Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

4.1.1. AGE10

Ekspresję epitopu zaobserwowano w 86% preparatach (Tab. 1). Immunoreaktywność była obecna w 72% zmian o niskim ryzyku (Skala Gleasona <7), w 90% zmian o pośrednim ryzyku (Skala Gleasona = 7) i w 93% zmian o ryzyku wysokim (Skala Gleasona >7).

Skala Gleasona	AGE (+)	AGE (-)	Suma
6	8	3	11
7	9	1	10
8	7	1	8
9	7	0	7
10	1	0	1
	32	5	37

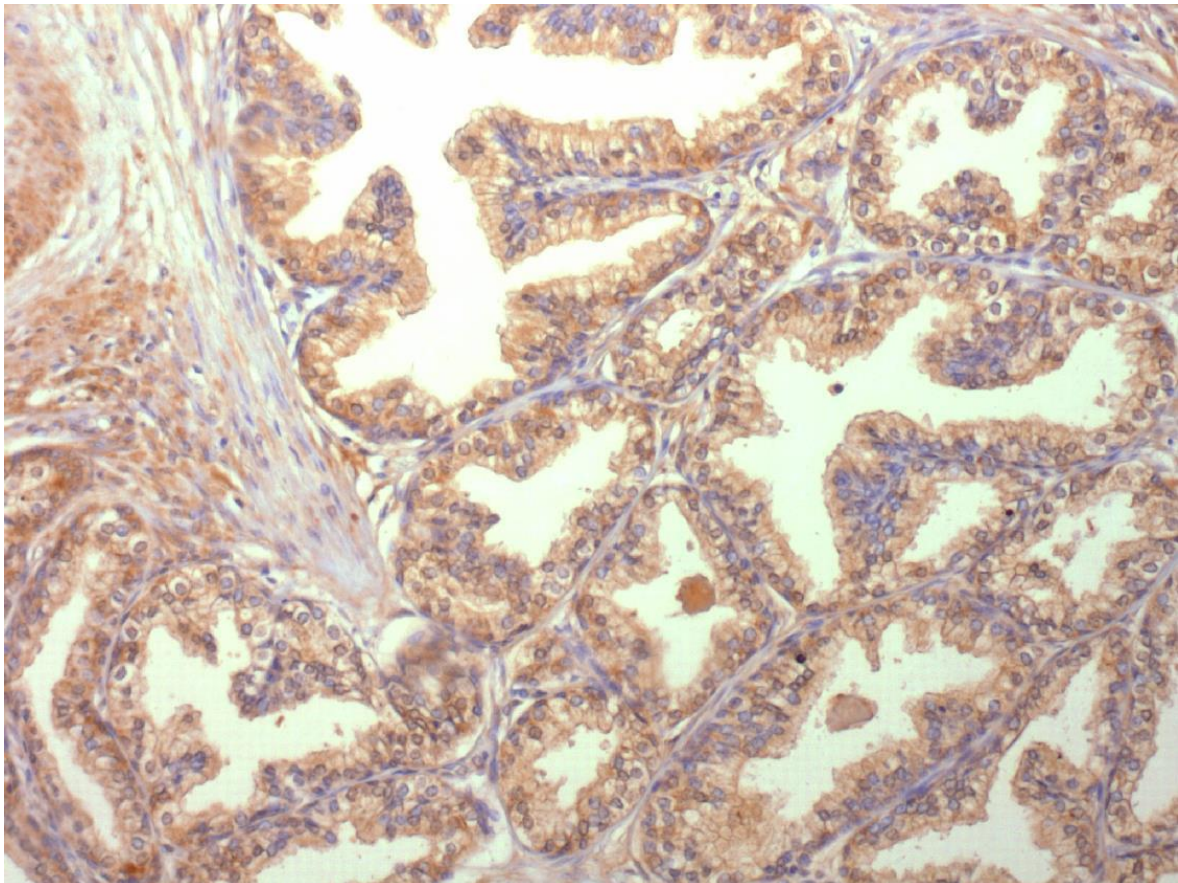
Tabela 1. Immunoreaktywność względem przeciwciała anti-MAGE w korelacji do skali Gleasona.

W zmianach niskiego ryzyka dominowała słaba lub umiarkowana reaktywność, w zmianach o pośrednim i wysokim ryzyku zauważono silną reaktywność (Tab. 2).

Intensywność barwienia w kierunku MAGE					
Skala Gleasona	+	++	+++	-	Suma
6	4	3	1	3	11
7	5	1	3	1	10
8	1	1	5	1	8
9	4	0	3	0	7
10	0	0	1	0	1
	14	5	13	5	37

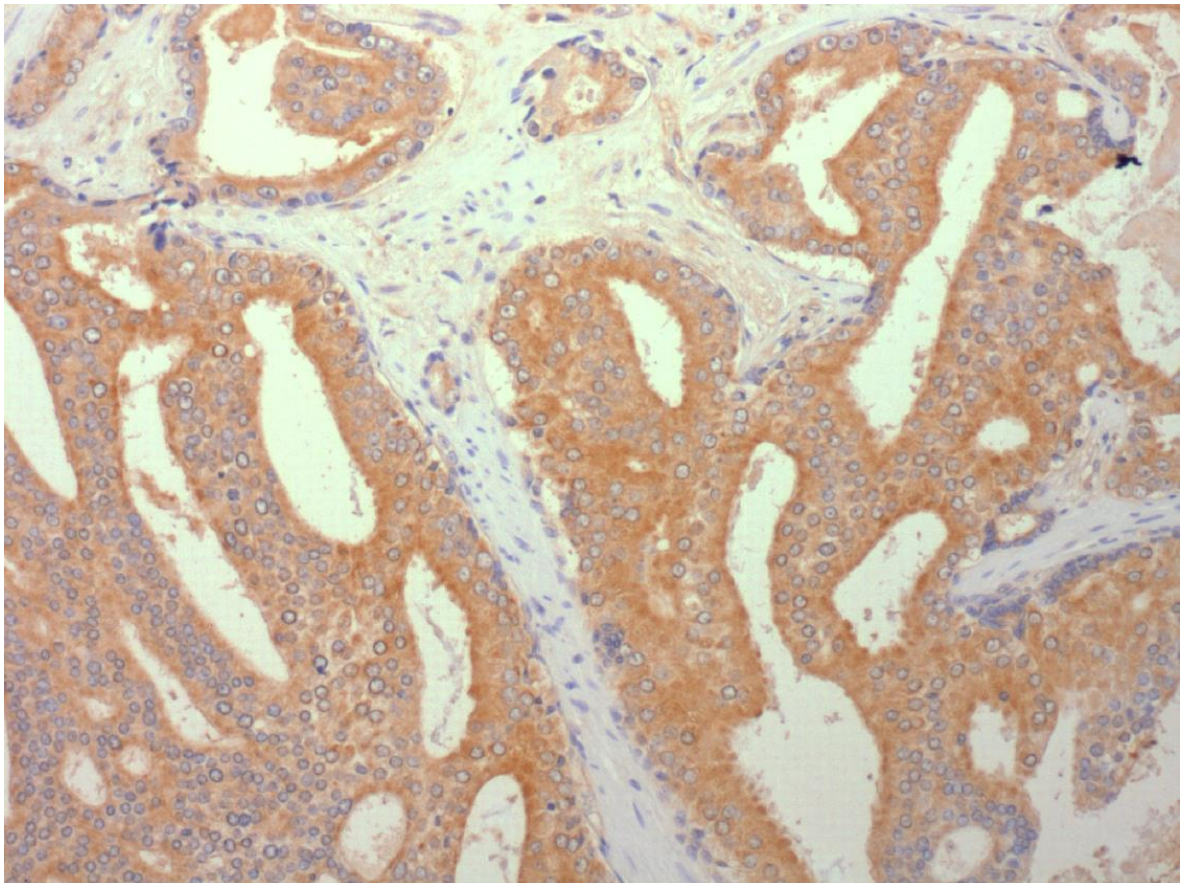
Tabela 2. Intensywność barwienia w kierunku MAGE w zależności od skali Gleasona.

Wyniki pokazane poniżej są wybranymi reprezentacjami obrazów uzyskanych podczas badania. Przeciwciała anty-MAGE rozpoznają epitop AGE10 w tkance raka prostaty, co pokazano na Ryc. 8.

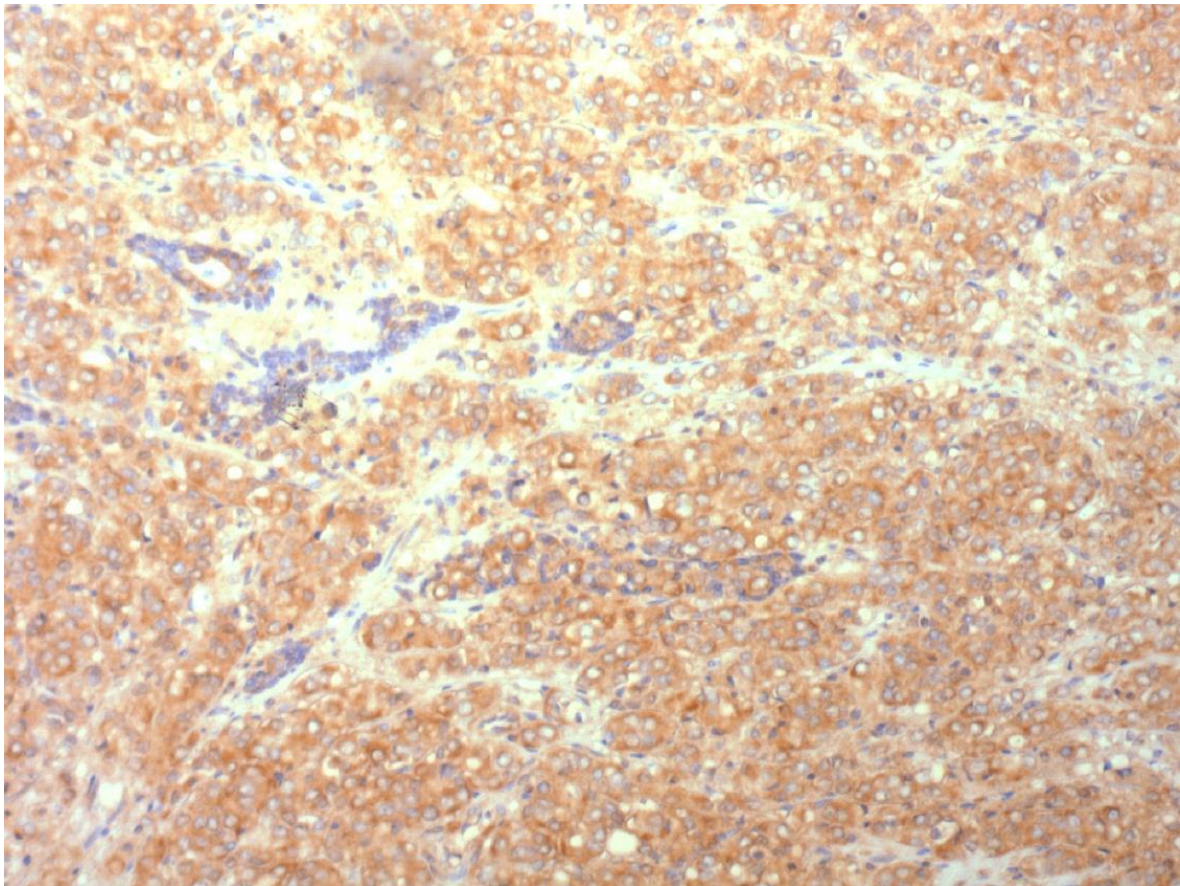


Rycina 8. Rak prostaty z immunoreaktywnością przeciwciał anty-MAGE w komórkach rakowych;
100x

Istotną obserwacją jest silna reaktywność cytoplazmatyczna w komórkach raka gruczołów sterczowych, mianowicie w komórkach nabłonka gruczołowego walcowatego (Ryc. 9). Ekspresja jest szczególnie zauważalna w wysoko niezróżnicowanych zmianach (Ryc. 10).

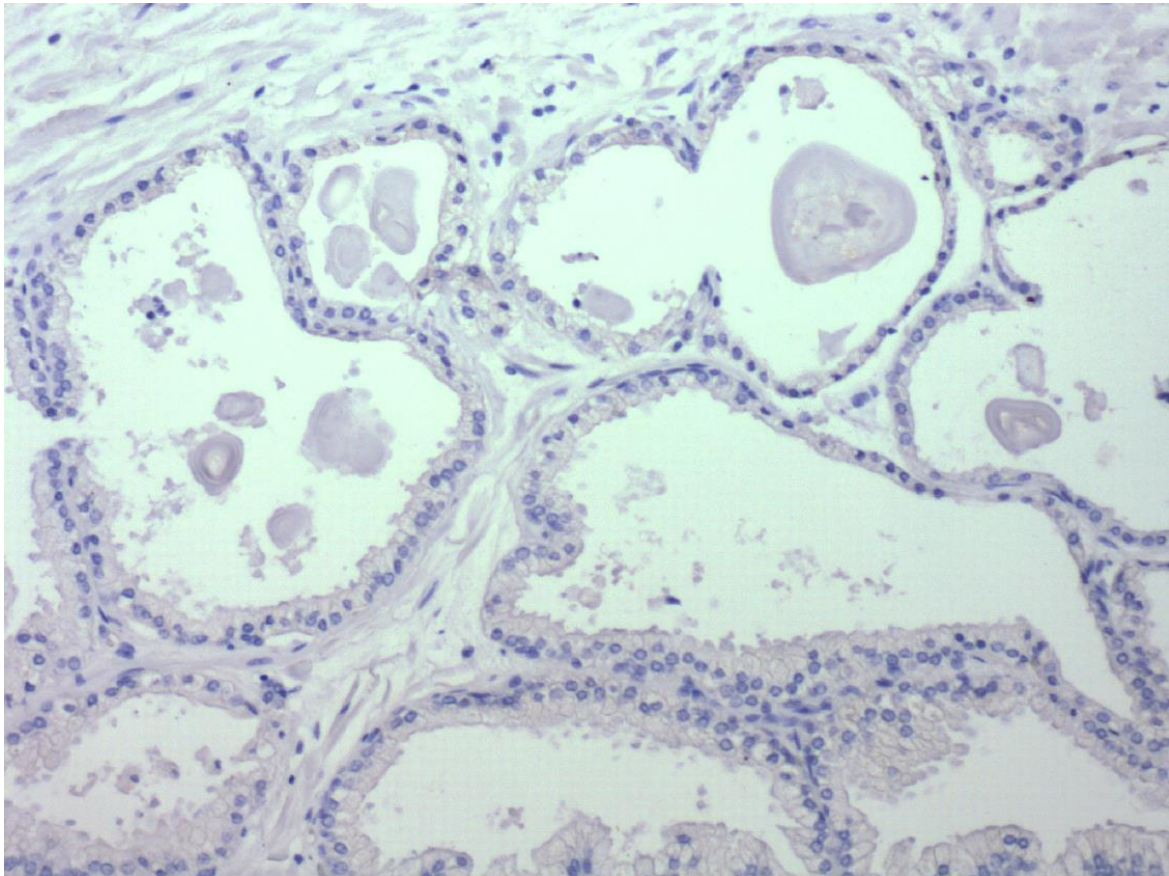


Rycina. 9. Reaktywność cytoplazmatyczna i brak wybarwienia jąder komórkowych przez przeciwciała anti-MAGE w komórkach raka prostaty; 100x



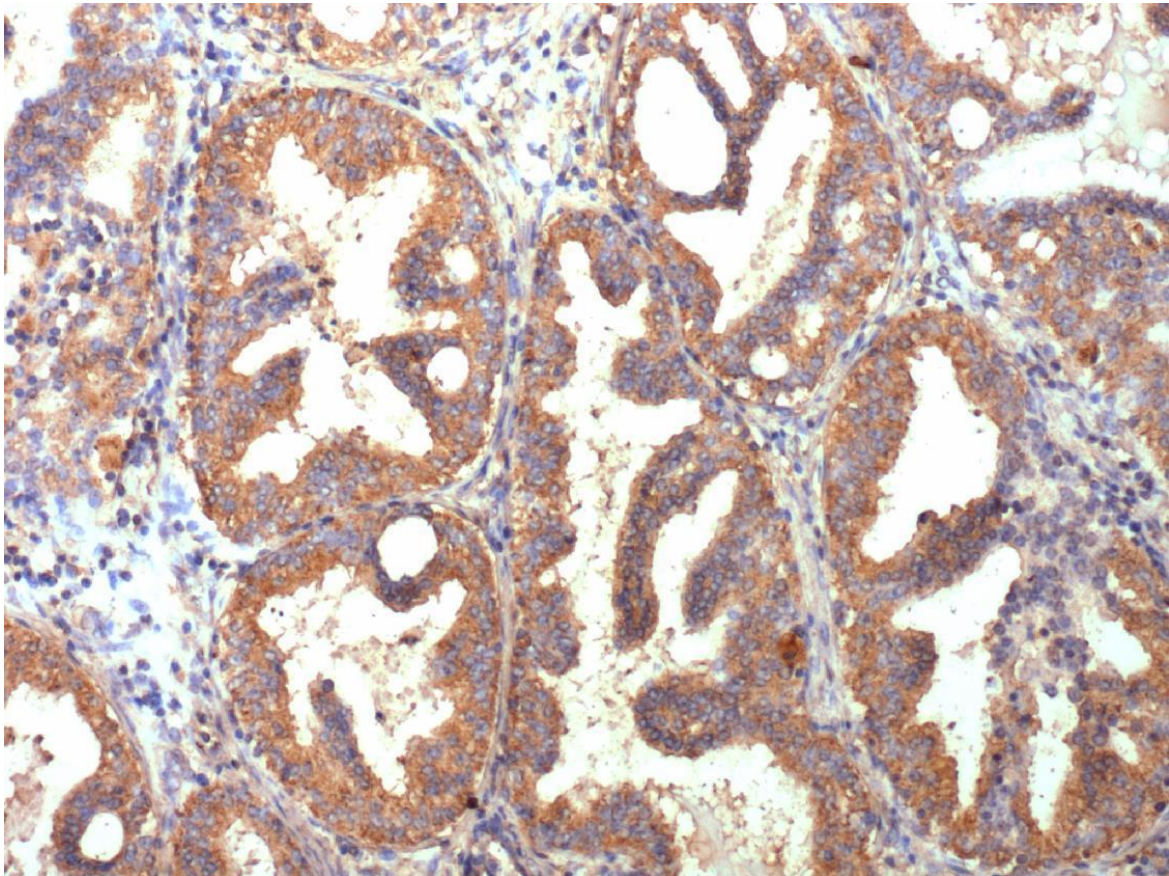
Rycina 10. Nisko zróżnicowany rak prostaty, silna immunoreaktywność przeciwciał anti-MAGE; 100x.

W porównaniu do tkanki rakowej, w tkance prawidłowej stercza nie zaobserwowano reaktywności badanych przeciwciał, ponadto cewy gruczołów sterczowych są duże, z wyraźnie widocznymi komórkami nabłonka gruczołowego walcowatego. Komórki mięśniowe gładkie również nie są wybarwione, cytoplazma w tkance prawidłowej prostaty nie jest immunoreaktywna z przeciwciałami anti-MAGE (Ryc. 11).



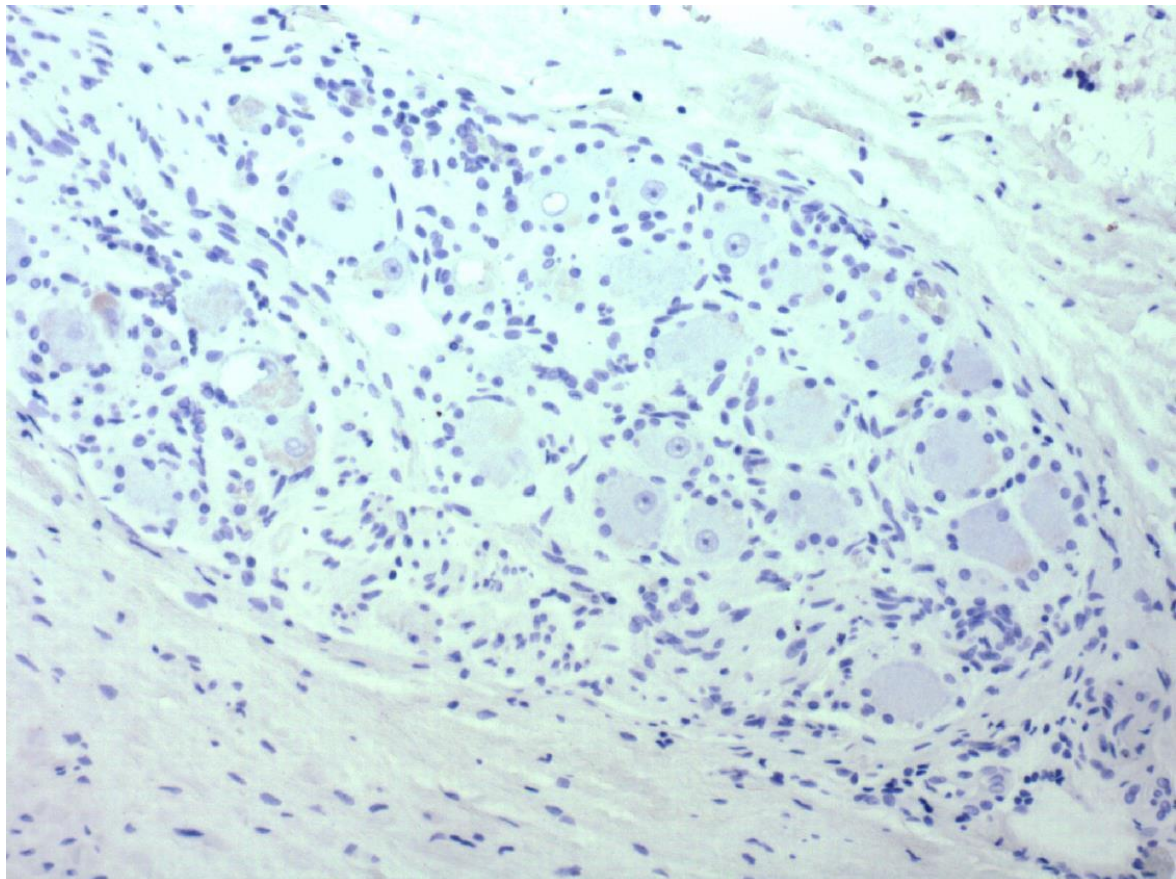
Rycina 11. Prawidłowa tkanka stercza z brakiem immunoreaktywności przeciwciał anti-MAGE;
100x

Na Ryc. 12 pokazano immunoreaktywność zmian o charakterze PIN (prostatic intraepithelial neoplasia), gdzie podścielisko również nie zawiera badanego epitopu AGE10. W cewkach prawidłowych tych zmian jest znacznie mniej, jeżeli występują.

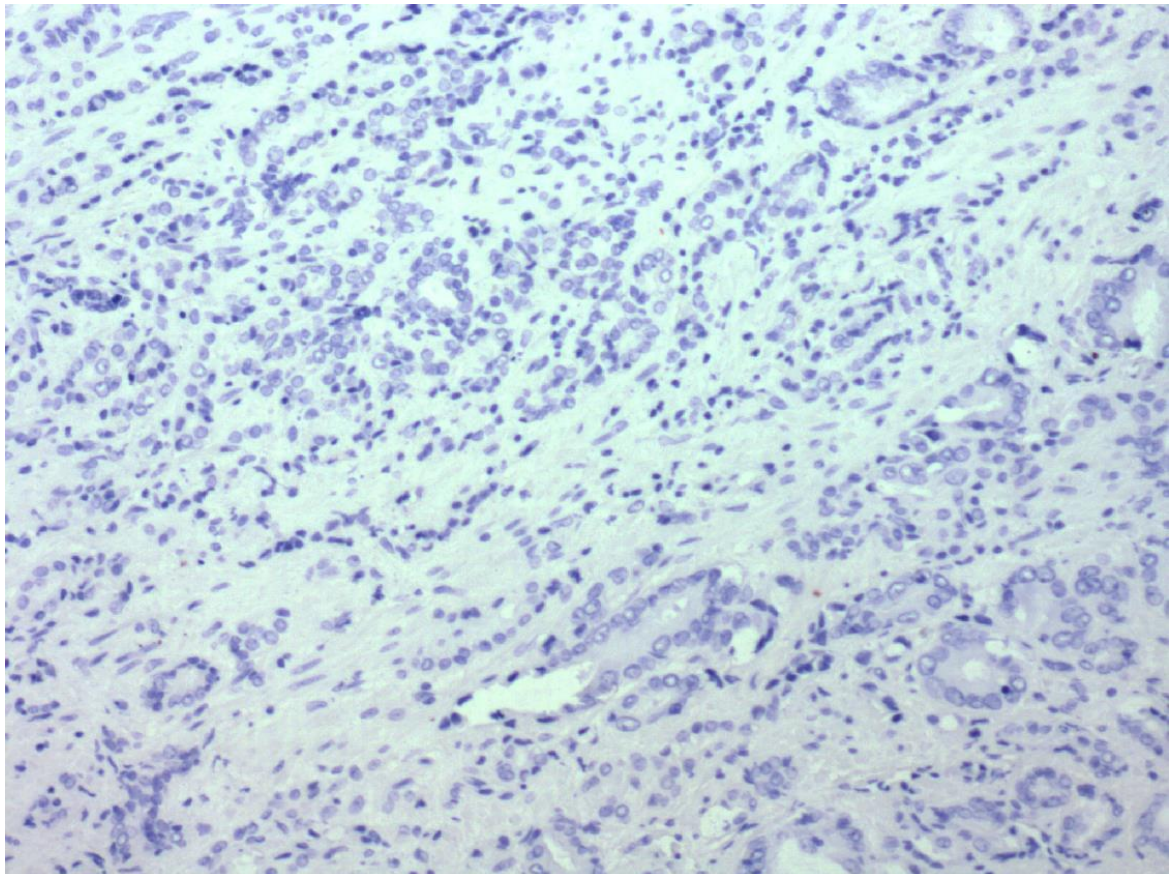


Rycina 12. Rak prostaty ze zmianami PIN wykazującymi immunoreaktywność przeciwciał anti-MAGE w komórkach rakowych; 100x

Interesującą obserwacją jest brak reaktywności pnia nerwowego w raku prostaty, co zilustrowano na Ryc. 13. Kontrolę eksperymentu reaktywności przeciwciał anti-MAGE z tkanką gruczołu krokowego przedstawiono na Ryc. 14.



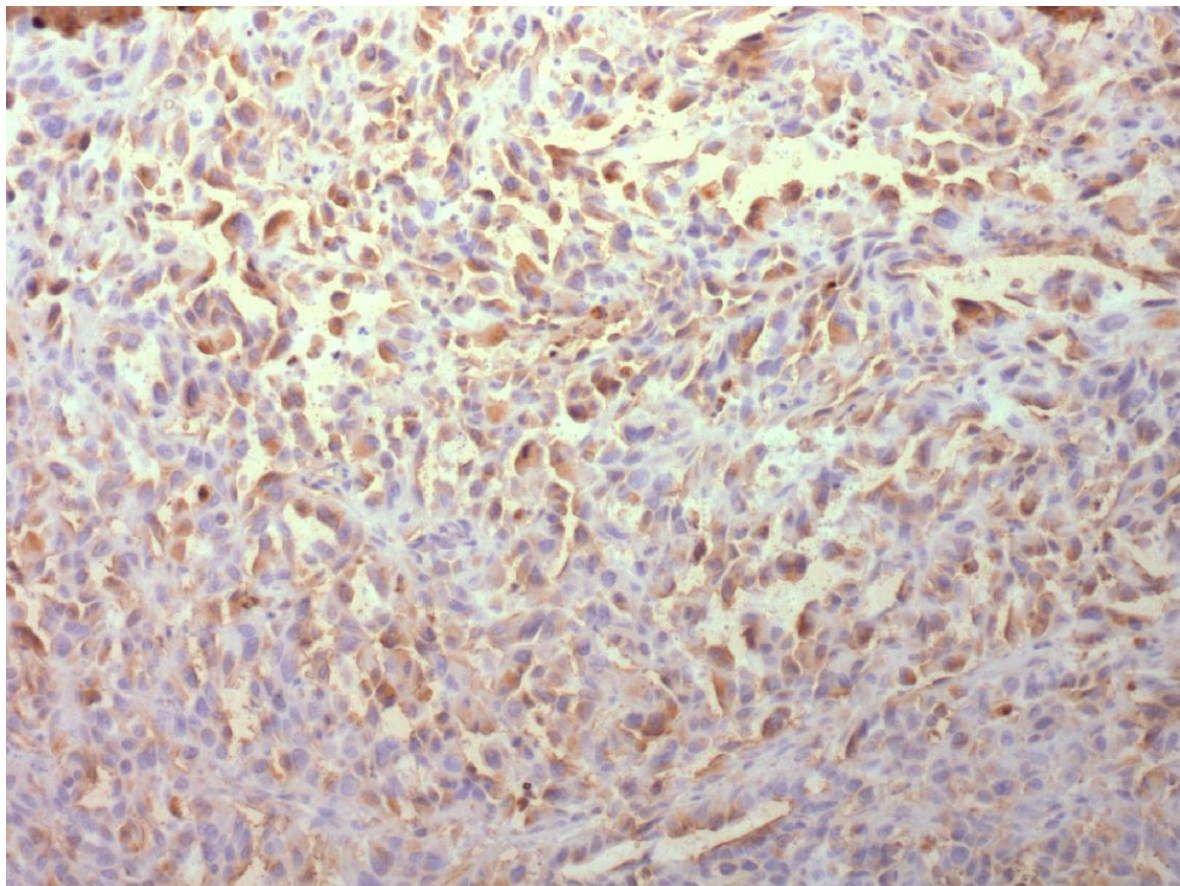
Rycina 13. Pień nerwowy uwidoczniiony w preparacie tkanki raka prostaty, brak immunoreaktywności przeciwciał anti-MAGE; 100x



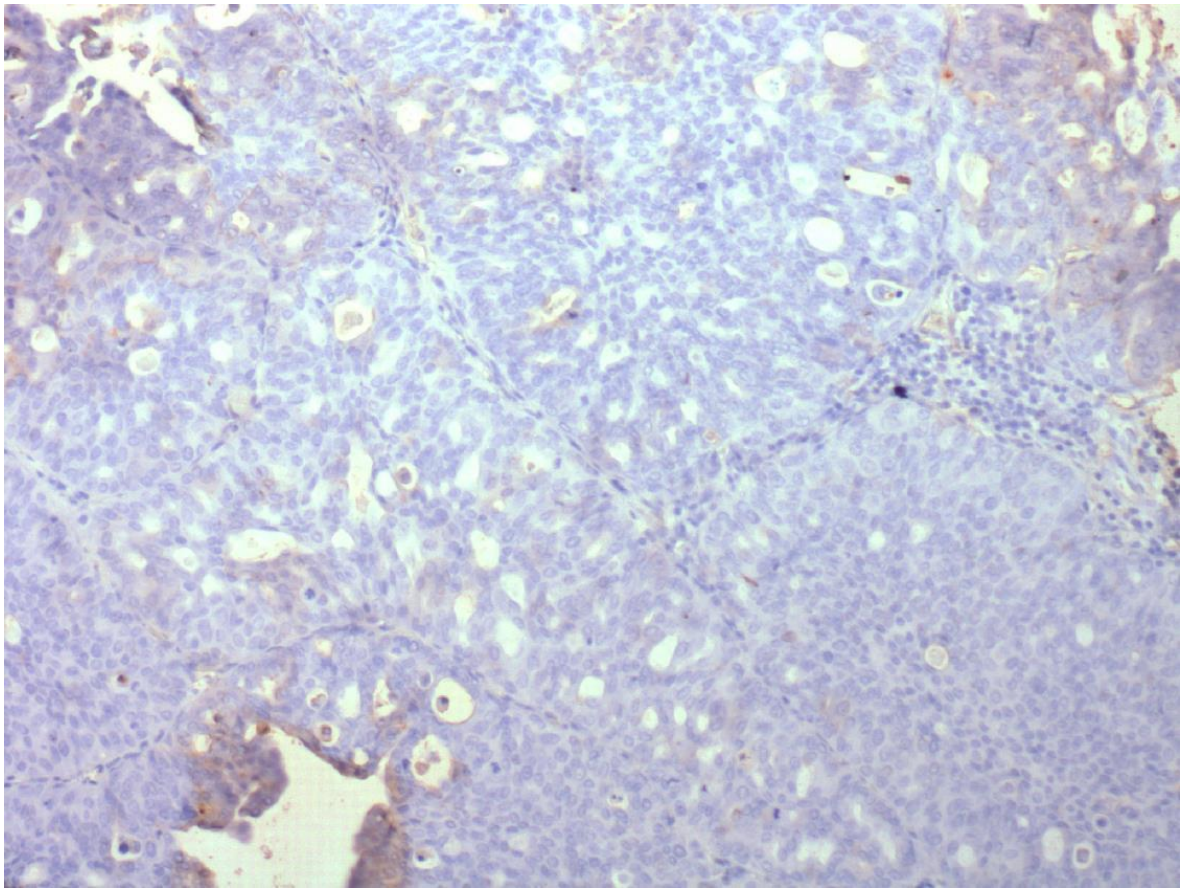
Rycina 14. Kontrola reaktywności przeciwciał anti-MAGE z tkanką raka gruczołu krokowego;
100x

4.1.1.1. Preparaty raka prostaty pochodzące od psów

W badaniach wykorzystano 8 preparatów nowotworów prostaty pochodzenia psiego. Słaba immunoreaktywność została zaobserwowana w przypadku jednego preparatu, na którym widoczne są pleomorficzne komórki nowotworowe ułożone w gniazda bez struktury gruczołowej (Ryc. 15). Pozostałe preparaty nie wykazały immunoreaktywności (Ryc. 16).



Rycina 15. Rak psiej prostaty o charakterze litym, słaba immunoreaktywność anty-MAGE; 100x.



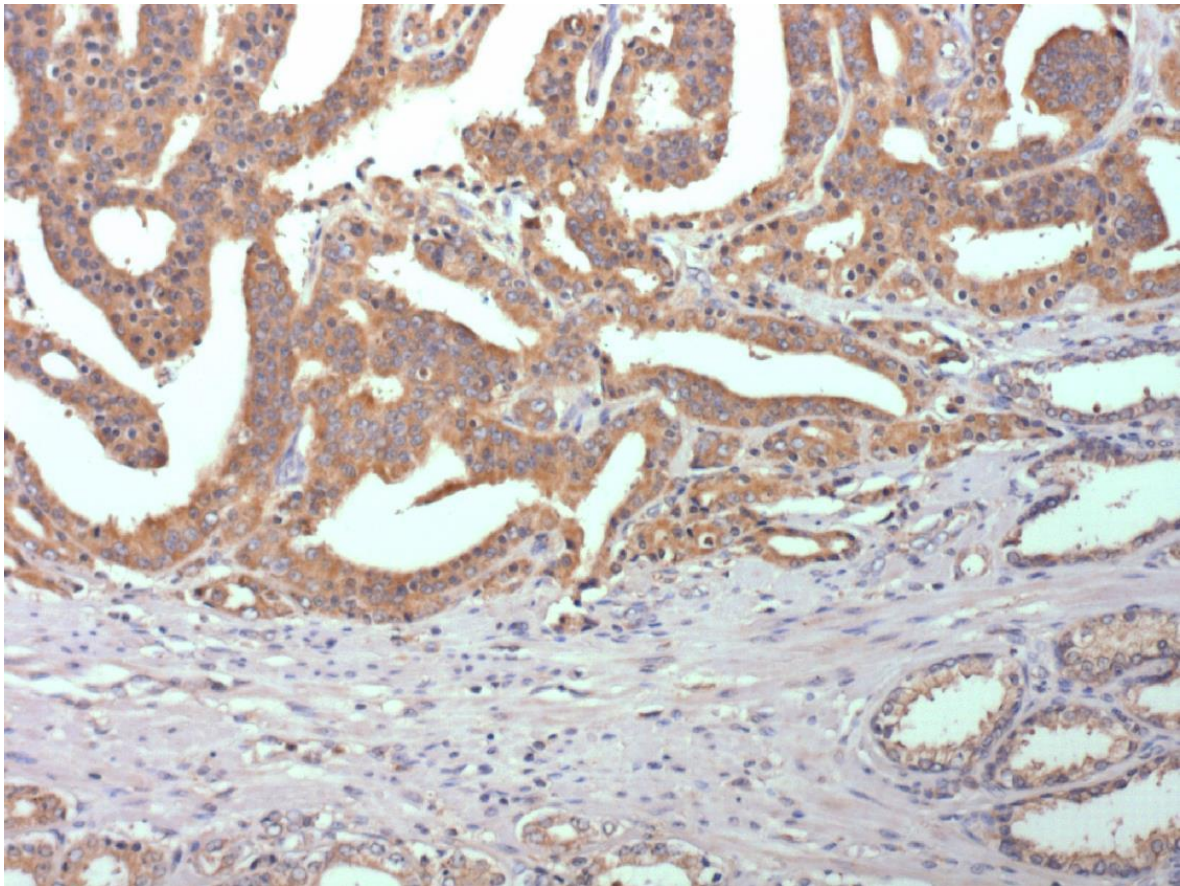
Rycina 16. Rak prostaty o utkaniu sitowatym, brak reaktywności przeciwciał anti-MAGE; 100x

4.1.2. RAGE

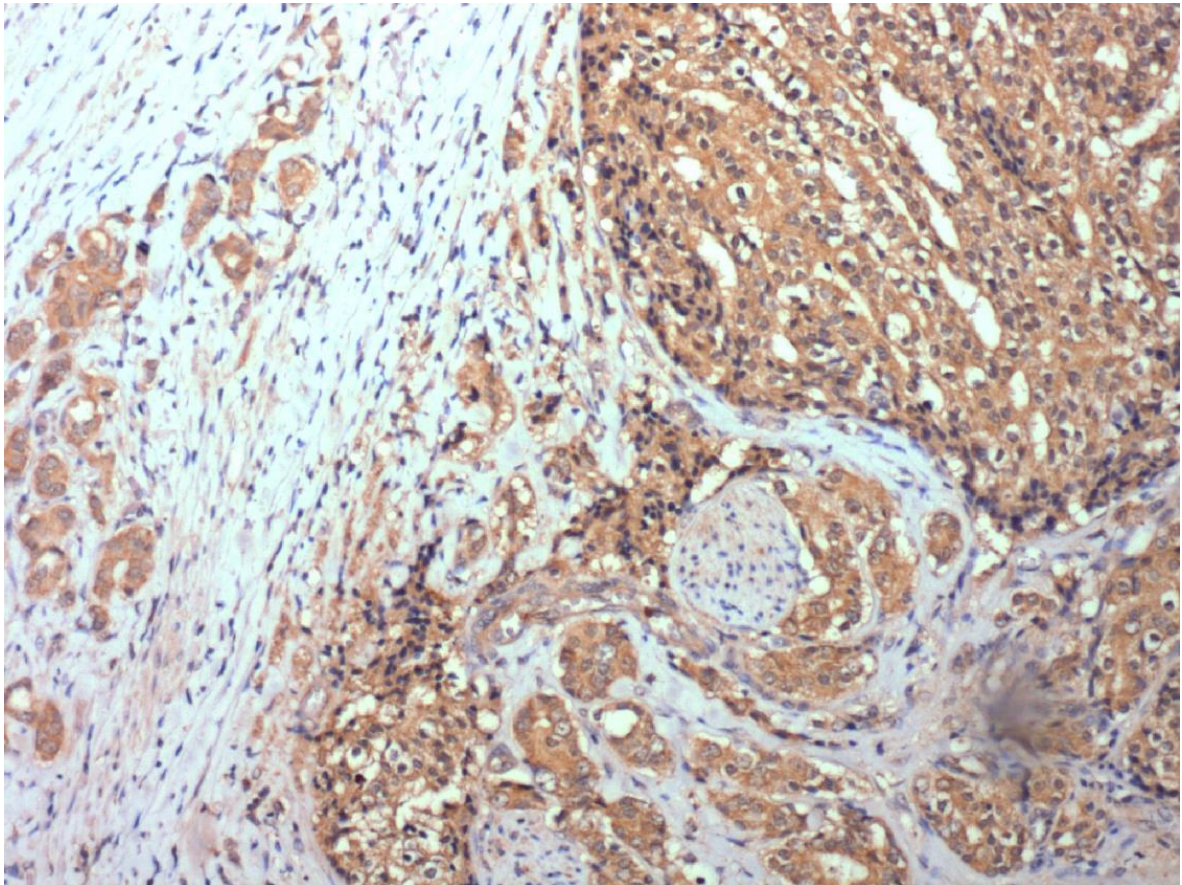
Preparaty raka prostaty wykazują immunoreaktywność względem przeciwciał anty-RAGE. Reakcja jest zauważalna w cytoplazmie (Ryc. 17). Zmiany nowotworowe niskiego ryzyka wykazały ekspresję w 54,5% (6/11), pośredniego ryzyka wykazały ekspresję w 60% (6/10) przypadków, z kolei immunoreaktywność była obserwowana we wszystkich preparatach wysokiego ryzyka.

<i>Skala Gleasona</i>	RAGE(+)	RAGE(-)	Suma
6	6	5	11
7	6	4	10
8	8	0	8
9	7	0	7
10	1	0	1
	28	9	37

Tabela 3. Immunoreaktywność względem przeciwciała anty-RAGE w korelacji do skali Gleasona.



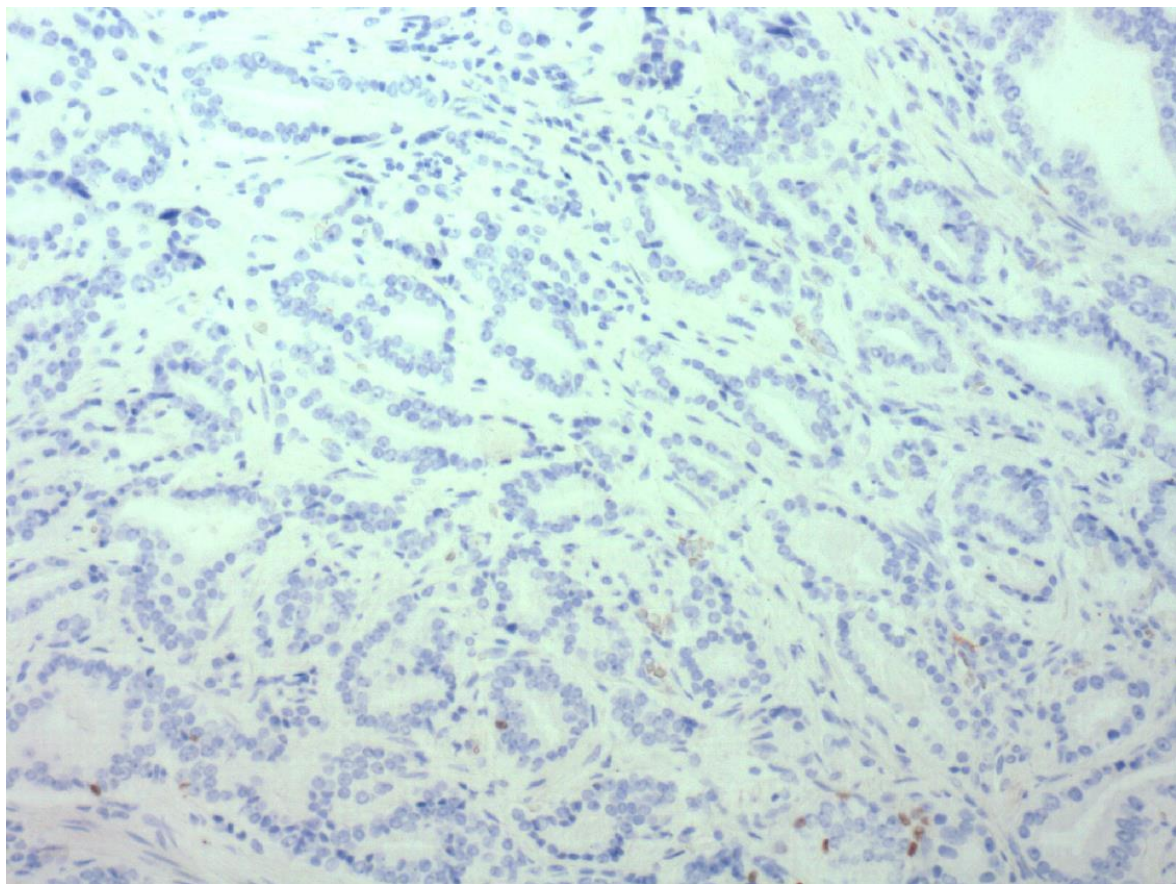
Rycina 17. Immunoreaktywność przeciwciał anti-RAGE w tkance raka prostaty, zauważalna reakcja cytoplazmatyczna; 100x



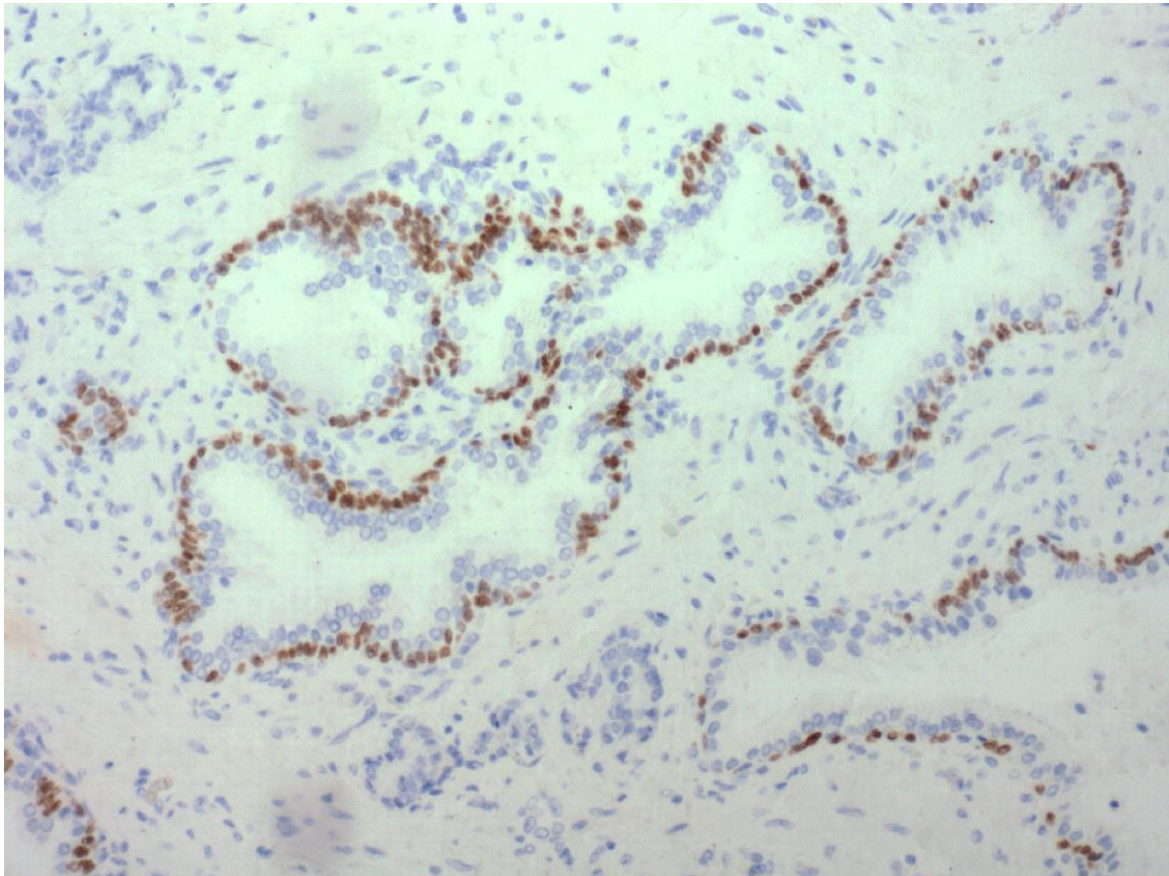
Rycina 18. Immunoreaktywność przeciwciał anti-RAGE w tkance raka prostaty, widoczny nacieknia nerwowego; 100x

4.1.3. P63

W celu porównania wyników reaktywności przeciwciał rozpoznających epitop AGE10 z reaktywnością przeciwciał P63 stosowanych w rutynowej diagnostyce raka prostaty, wykonano eksperymenty równoległego barwienia siedmiu preparatów przeciwciałami P63. Tkanka raka prostaty nie wykazuje immunoreaktywności (Ryc. 19), podczas gdy w prawidłowej tkance stercza występuje silna reaktywność komórek nabłonka gruczołowego walcowatego (Ryc. 20). Obserwowana reaktywność przeciwciała P63 w sterczu prawidłowym jest nieobecna w tkance raka.



Rycina 19. Rak prostaty wykazujący diagnostyczny brak immunoreaktywności przeciwciał P63 w komórkach rakowych; 100x

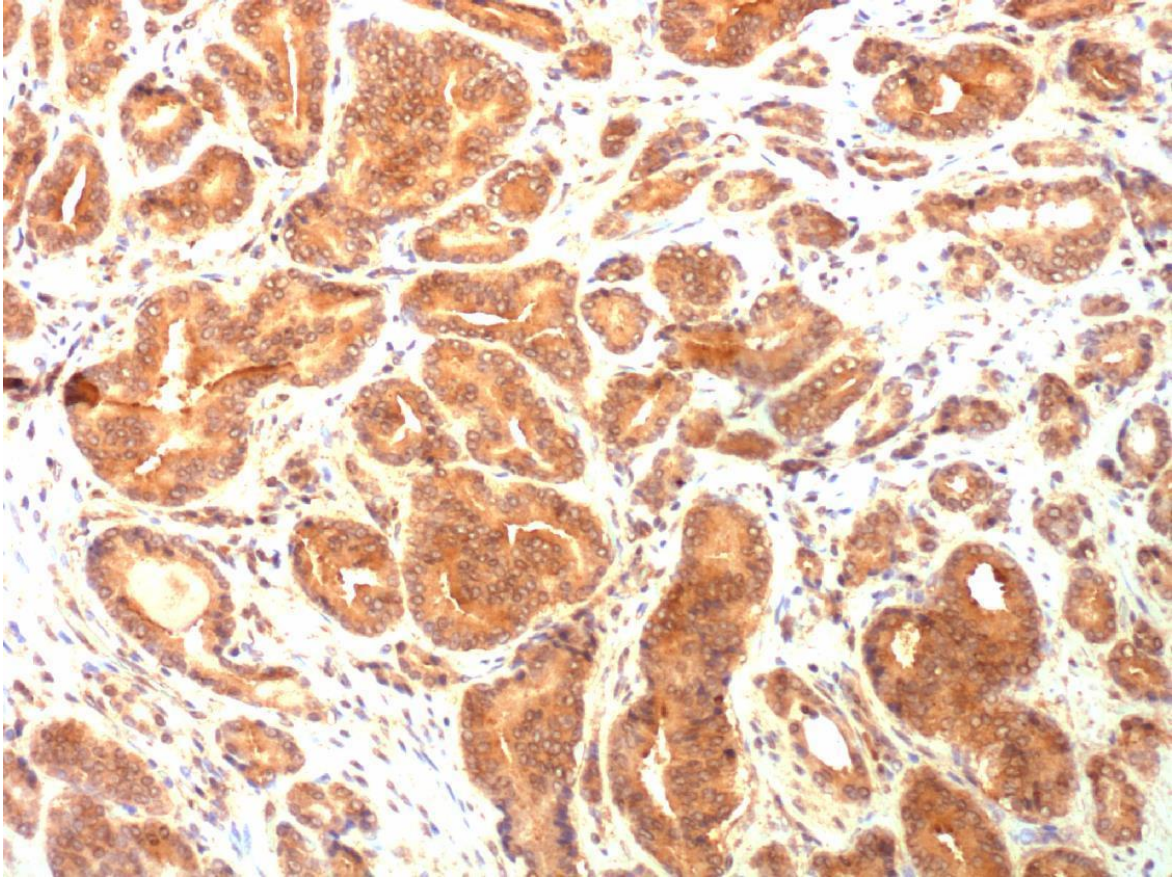


Rycina 20. Prawidłowa tkanka prostaty wykazująca diagnostyczną immunoreaktywność przeciwciał P63 w komórkach prawidłowych; 100x

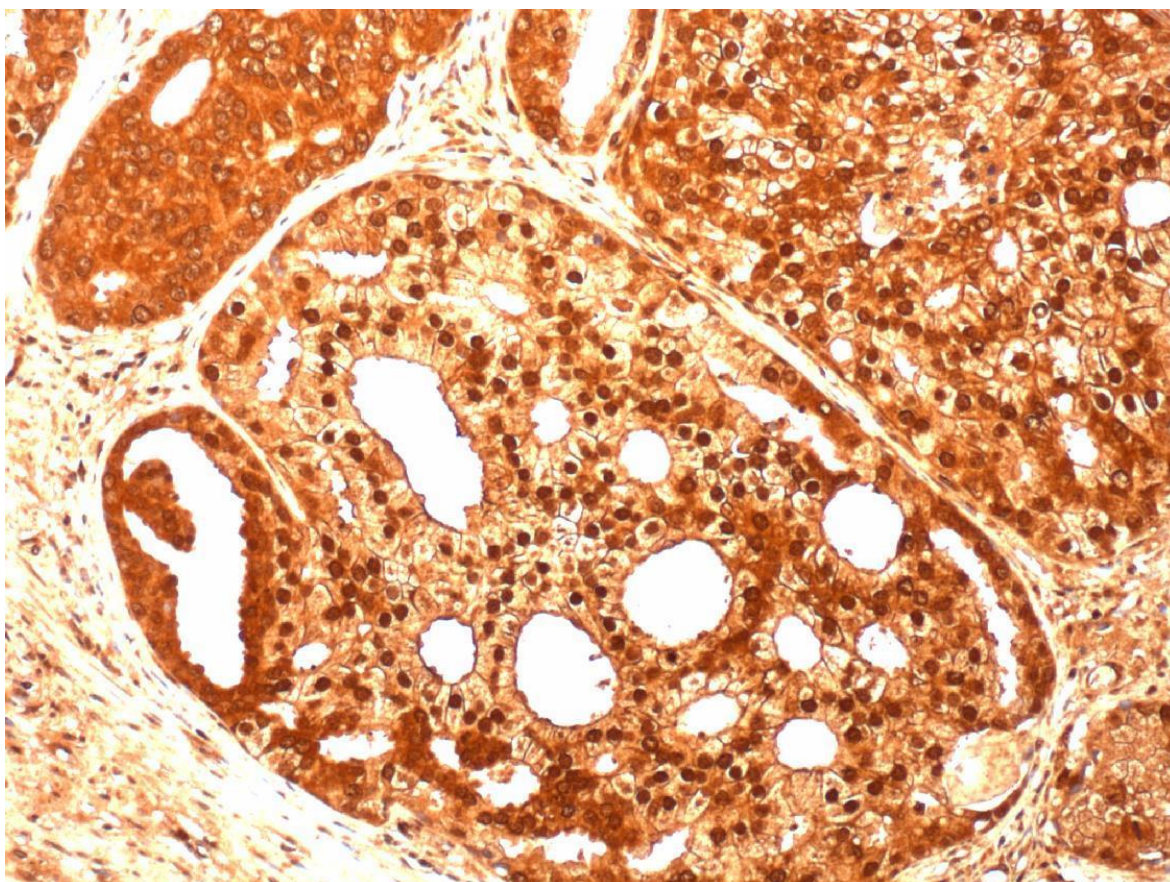
4.1.4. O37

W celu przeprowadzenia dalszej analizy porównawczej wykonano eksperymenty z przeciwciałami otrzymanymi wobec antygenu O37. Antygen ten jest polisacharydem bakteryjnym posiadającym w swojej strukturze kwas sjałowy, dlatego istnieje możliwość reaktywności krzyżowej z tkankami ludzkimi. Antygen O37 wykazuje swoistą reaktywność krzyżową z wysoko sjałowanym białkiem pasma 3 erytrocytów¹¹⁹. Poprzednio wykazano, że przeciwciała anty-O24 i O56 *E. coli* rozpoznają struktury gruczołów wydzielniczych pochodzenia nerwowego i tkanki nerwowej¹²⁰.

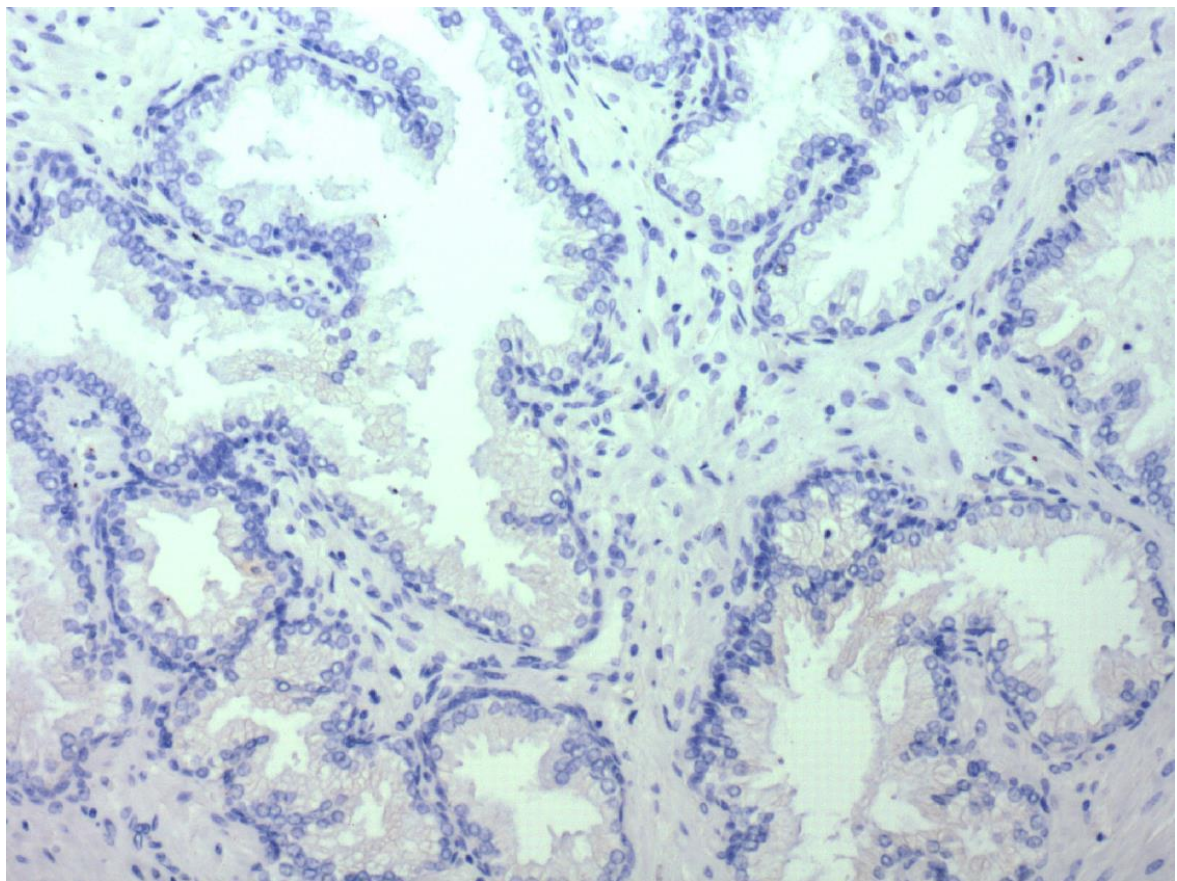
Wszystkie spośród 24 badanych preparatów wykazały reaktywność. Na Ryc. 21 pokazano reaktywność przeciwciał anty-O37 z tkanką raka prostaty, gdzie daje się zaobserwować bardzo wyraźną reaktywność cytoplazmatyczną z komórkami cew przy braku reaktywności zrębu. Poza reaktywnością cytoplazmatyczną uwidoczniona została także wyraźna reaktywność jądrowa w komórkach rakowych raka prostaty, co odróżnia swoistość tych przeciwciał od anty-MAGE (Ryc. 22). Prawidłowa tkanka stercza nie wykazuje immunoreaktywności z przeciwciałami anty-O37 (Ryc. 23).



Rycina 21. Rak prostaty z silną immunoreaktywnością przeciwciał anti-O37 w komórkach rakowych; 100x



Rycina 22. Reaktywność głównie jądrowa w komórkach rakowych raka prostaty z przeciwciałami anti-O37; 100x



Rycina 23. Prawidłowa tkanka stercza z brakiem immunoreaktywności przeciwciał anti-O37; 100x

4.2. Statystyczna ocena wpływu AGE i RAGE na szansę zezłośliwienia, określoną skalą Gleasona

W oparciu o model (Tabela 3) trenowany na bazie danych objętych tą pracą, można stwierdzić, że szansa zezłośliwienia zmiany w przypadku otrzymania ujemnego wyniku RAGE jest ok. 6,13 razy mniejsza w odniesieniu do przypadku otrzymania dodatniego wyniku (OR \approx 0.163, $p \approx$ 0.024). Dodatkowo, z racji braku istotności interakcji AGE i RAGE ($p \approx$ 0.467), można stwierdzić, że wspomniany efekt RAGE jest uniwersalny dla wszystkich rozpatrywanych wyników AGE w tej samej zmianie.

Efekt AGE, choć nieistotny ($p \approx$ 0.138), pozwala na wysunięcie hipotezy o możliwym dodatnim wpływie ilości AGE na zezłośliwienie – z racji na wysoce ujemną wartość β i oraz przewagę wartości świadczących o wzroście szansy zezłośliwienia w 95% przedziale ufności (1.008 dla wartości ujemnego OR vs. 0.138 dla wartości dodatniego OR; β i = 0 świadczy o równości szans, czyli OR = 1). Dodatkowo, można przyjąć, że ten efekt jest niezależny od wyniku RAGE. W celu sprawdzenia tej hipotezy, należałoby wykonać analizę na znacznie większej próbie zmian stercza.

Efekt	Oceniana kategoria	Kategoria odniesienia	β_i	β_i SE	Wald stat.	β_i -95% CI	β_i 95% CI	p	OR	OR -95% CI	OR 95% CI
Wyraz wolny 1	-	-	1.022	0.782	1.707	-0.511	2.555	0.191	-	-	-
Wyraz wolny 2	-	-	2.472	0.873	8.009	0.760	4.183	0.005	-	-	-
Wyraz wolny 3	-	-	3.676	0.956	14.774	1.801	5.550	0.000	-	-	-
Wyraz wolny 4	-	-	6.057	1.362	19.773	3.388	8.727	0.000	-	-	-
AGE	-	-	-0.434	0.293	2.200	-1.008	0.140	0.138	0.648	0.365	1.150
RAGE	Dodatnia (+)	Ujemna (-)	-1.814	0.804	5.087	-3.391	-0.238	0.024	0.163	0.034	0.788
‡ AGE*RAGE	-	-	-0.527	0.725	0.530	-1.948	0.893	0.467	0.590	0.143	2.442

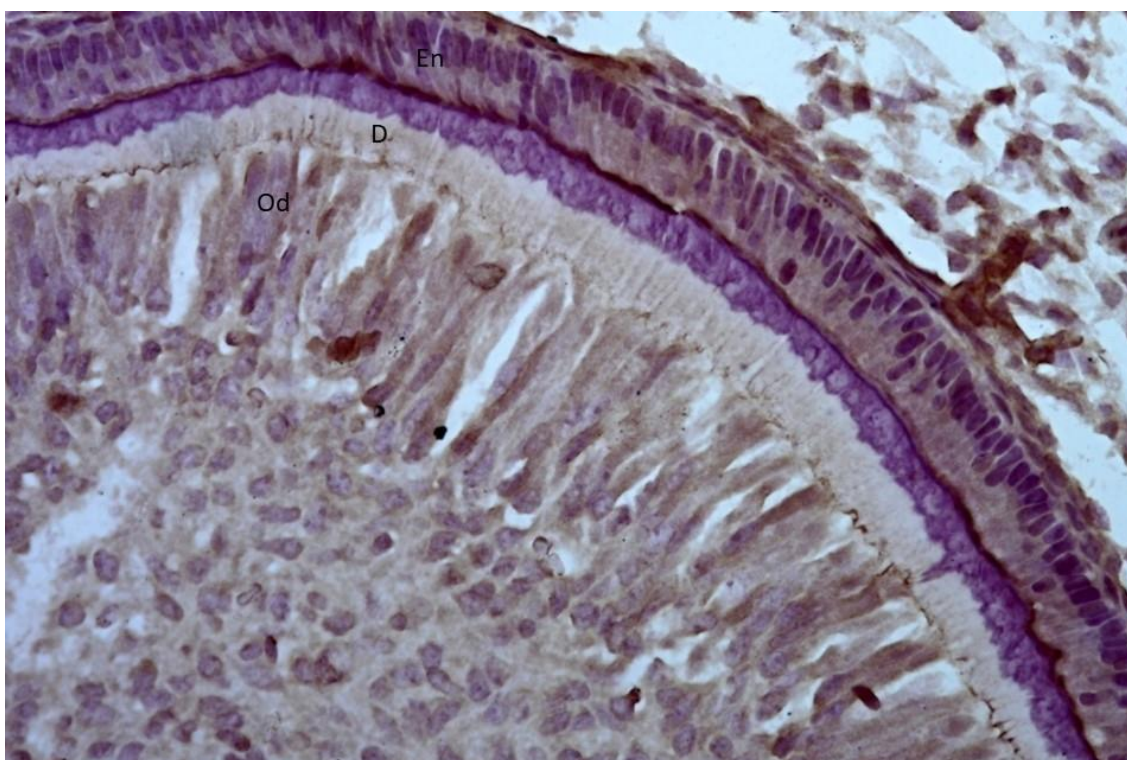
'‡': interakcja, z racji braku istotności, nie została ujęta w finalnym modelu, złożonym tylko z efektów 'AGE' i 'RAGE' oraz wyrazów wolnych. Stosowane skróty: SE, błąd standardowy; Wald stat., statystyka Walda; CI, przedział ufności; OR, iloraz szans. OR nie podano dla wyrazów wolnych, gdyż przedstawiają one bazowe szanse, a nie ich ilorazy (patrz dział 'Materiał i Metody')

Tabela 3. Modelowanie szansy zezłośliwienia zmiany (w oparciu o skalę Gleason) w kontekście intensywności AGE i/lub RAGE

4.3. Immunohistochemiczna analiza tkanki zębowej noworodków szczura od matek poddanych działaniu dioksyn

Analizę przeprowadzono na preparatach tkanki kostnej zęba i fragmencie żuchwy szczurów.

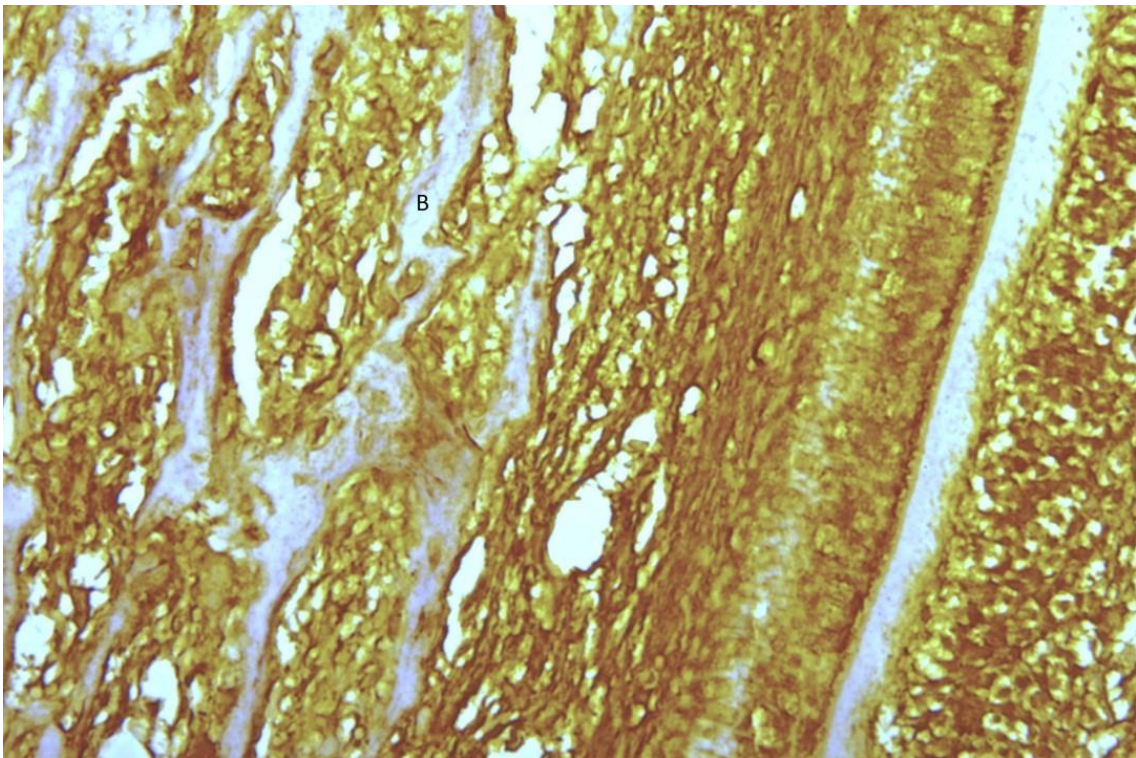
W grupie 1 (grupa NK – noworodki pochodzące od samic z grupy kontrolnej) obraz histologiczny rozwijających się zębów przedstawia rozwój szkliwa i brodawki zębowej (Ryc. 24). Powierzchnie pokryte są cylindrycznymi komórkami szkliwotwórczymi (ameloblastami), a od strony miazgi zębowej komórkami zębinotwórczymi (odontoblastami). W miazdze zęba obecne są liczne naczynia krwionośne. Do wyrostka zębodołowego przylega zwarta, włóknista tkanka łączna. Wyrostek zębodołowy jest ograniczony tkanką kostną beleczkowatą i wykazującą zaawansowaną osteogenezę. Tkanka nie wykazuje ekspresji antygenu AGE10.



Rycina 24. Część wierzchołkowa zęba szczura z grupy kontrolnej. Od – odontoblast, D – zębina, En – enameloblast; 100x

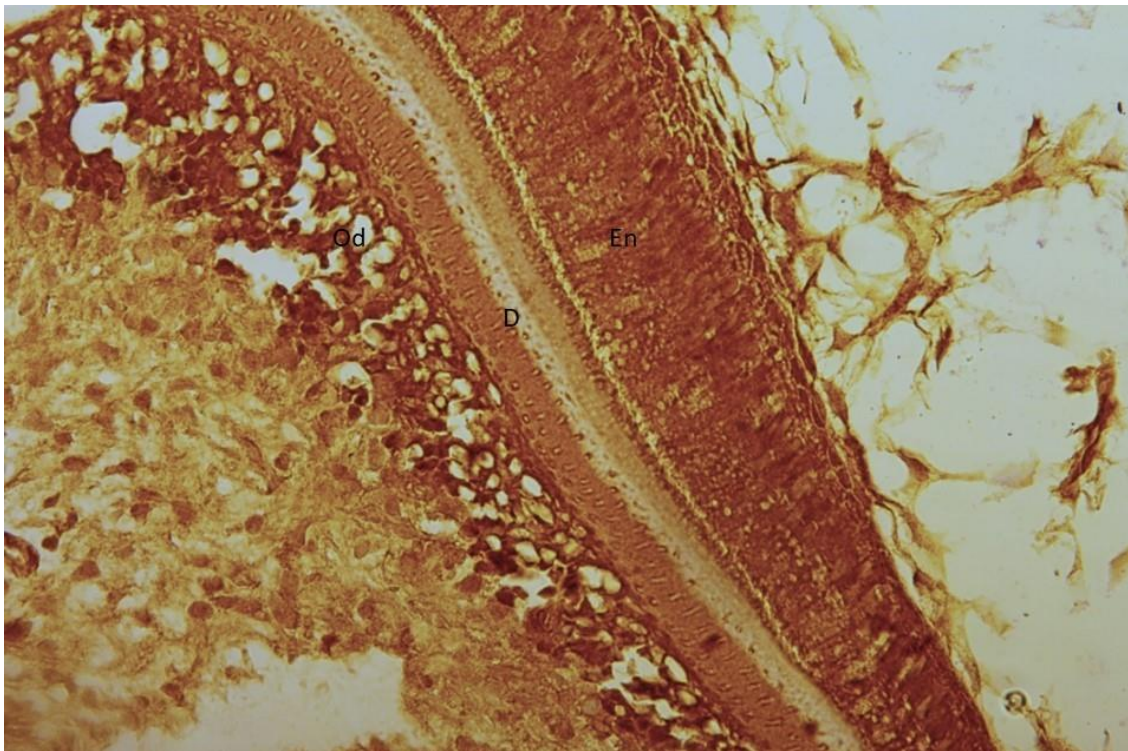
Ekspresję AGE10 w żuchwie noworodków z grupy 1 przedstawiono na Ryc. 25 . Widoczne są blaszki kostne składające się na jednostki strukturalne tkanki kostnej zbitej (osteony) i

pojedyncze blaszki kostne bez śladu glikacji. Odnawia się dodatnią, słabą reaktywność fizjologiczną w tkance łącznej okołozębowej, bez zauważalnej reakcji w tkance wyrostka zębodołowego, zębiny i szkliwa. Co wskazuje, że reakcja w zakresie tkanek zmineralizowanych jest negatywna. Widoczna jest słaba dodatnia reakcja w ameloblastach, a także wyraźna dodatnia reakcja w miążdże zęba.



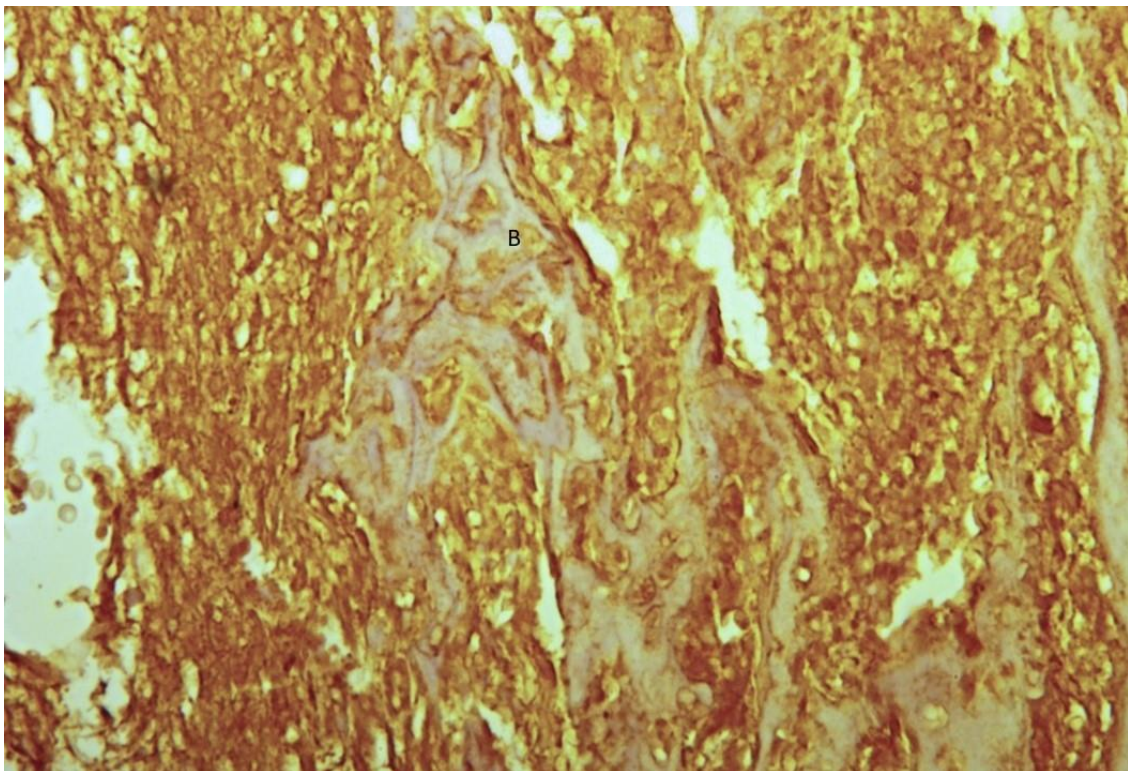
Rycina 25. Tkanka okołozębowa rozwijającego się zęba szczura z grupy kontrolnej. B – kość; 100x

W grupie 2 (NTCDD, od matek poddanych działaniu dioksyny) obserwuje się niższy stopień rozwoju zarówno szkliwa, jak i brodawek zębowych. W szkliwie widoczne są komórki prostopadłościennie, rzadko cylindryczne, dające wrażenie częściowo uformowanego dojrzałego narządu. W obszarze graniczącym z warstwą odontoblastyczną gromadzą się różnicujące się komórki mezenchymalne. Ponadto obserwuje się sukcesywne tworzenie zębiny i różnicowanie sześciennych ameloblastów z wewnętrznego nabłonka szkliwa. Stopień rozwoju wspomnianych struktur tkankowych, jak również angiogenezy, jest mniej zaawansowany niż w grupie kontrolnej. W rejonie zawiązków zębowych występują duże obszary zahamowanego rozwoju kości wyrostka zębodołowego. W obszarach sąsiadujących z zębami widoczne są nacieki leukocytarne.



Rycina 26. Część wierzchołkowa zęba szczura z grupy poddanej działaniu TCDD, Od – odontoblast, D – zębina, En – ameloblast; 100x

Ekspresję AGE10 w żuchwie noworodków z grupy noworodków pochodzących od matek poddanych działaniu TCDD (grupa NTCDD) przedstawiono na Ryc. 27. Widoczna jest macierz kostna z osteocytami. W strukturach tych zachodzi wzmożona zewnątrzkomórkowa glikacja. Odontoblasty i ameloblasty są objęte nasiloną glikacją, zauważalną również w osteocytach wyrostka zębodołowego. Dodatnia reakcja jest nasilona w komórkach miazgi zębowej, fibroblastach tkanki przyzębia, a także w komórkach śródbłona naczyń włosowatych. Co ciekawe, reaktywność występuje jedynie w cytoplazmie, w niektórych przypadkach cytoplazma pokrywa jądro, chociaż samo jądro nie jest wybarwione.



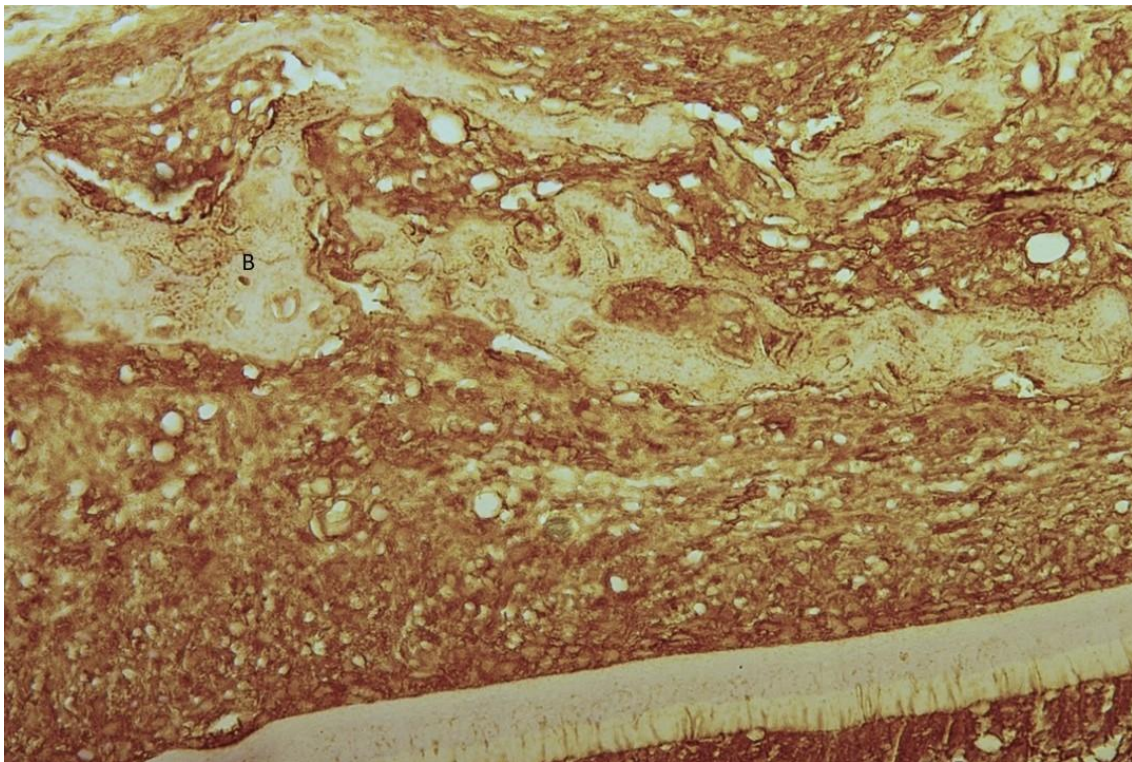
Rycina 27. Tkanka okołożębowa rozwijającego się zęba szczura z grupy poddanej działaniu TCDD,
B – kość; 100x

W grupie 3 (NTCDD+E) obraz histologiczny jest podobny do obrazu potomstwa z grupy 2, jednak wewnętrzna powierzchnia szkliwa jest przeważnie cylindryczna, wskazująca na prawidłowo zróżnicowane ameloblasty. Można zaobserwować mniejszą liczbę komórek różnicujących się (prostopadłościennych). W brodawkach zębowych występuje wyraźna angiogeneza, zwłaszcza w warstwie odontoblastycznej. W błonie śluzowej widoczne są nacieki leukocytarne.



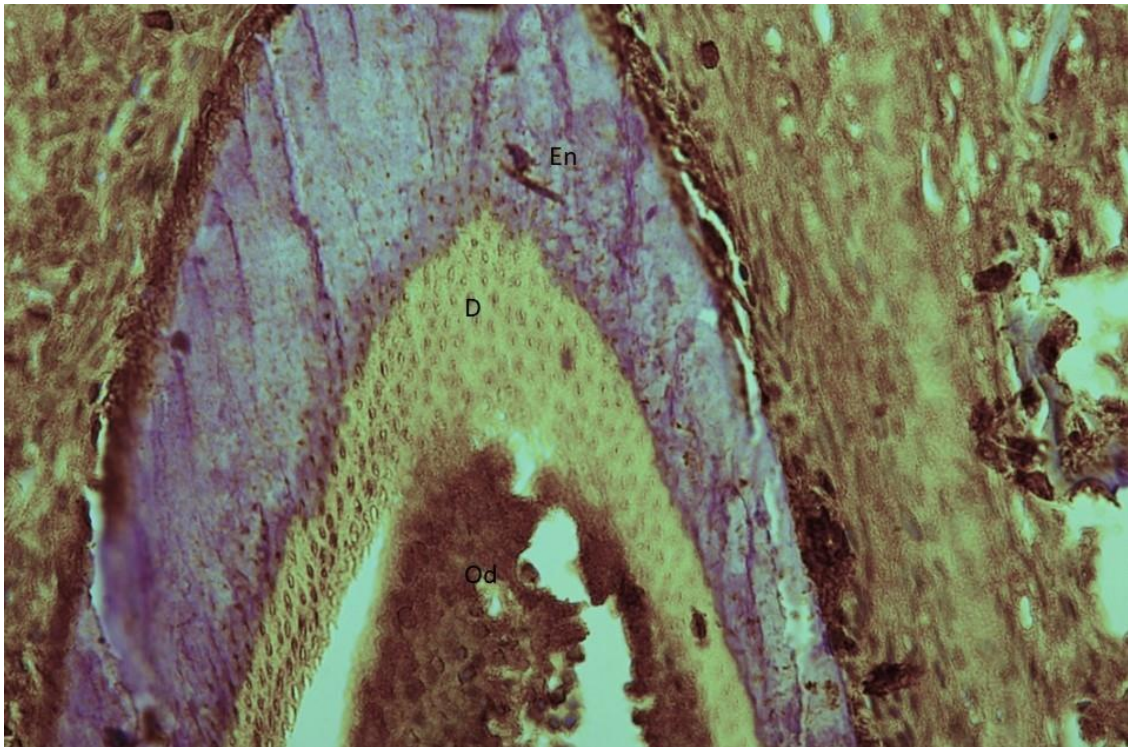
Rycina 28. Część wierzchołkowa zęba szczura z grupy poddanej działaniu TCDD i witaminy E, Od – odontoblast, D – zębina, En – ameloblast; 100x

W grupie 3 (TCDD+E) reaktywność tkanki kostnej wyrostka zębodołowego i przyzębia z przeciwciałem anti-MAGE jest słabsza niż w grupie TCDD. W preparacie szczęki widoczne są osteony i wyraźnie zaznaczona glikacja, wynosząca około 60% obserwowanej w grupie TCDD.



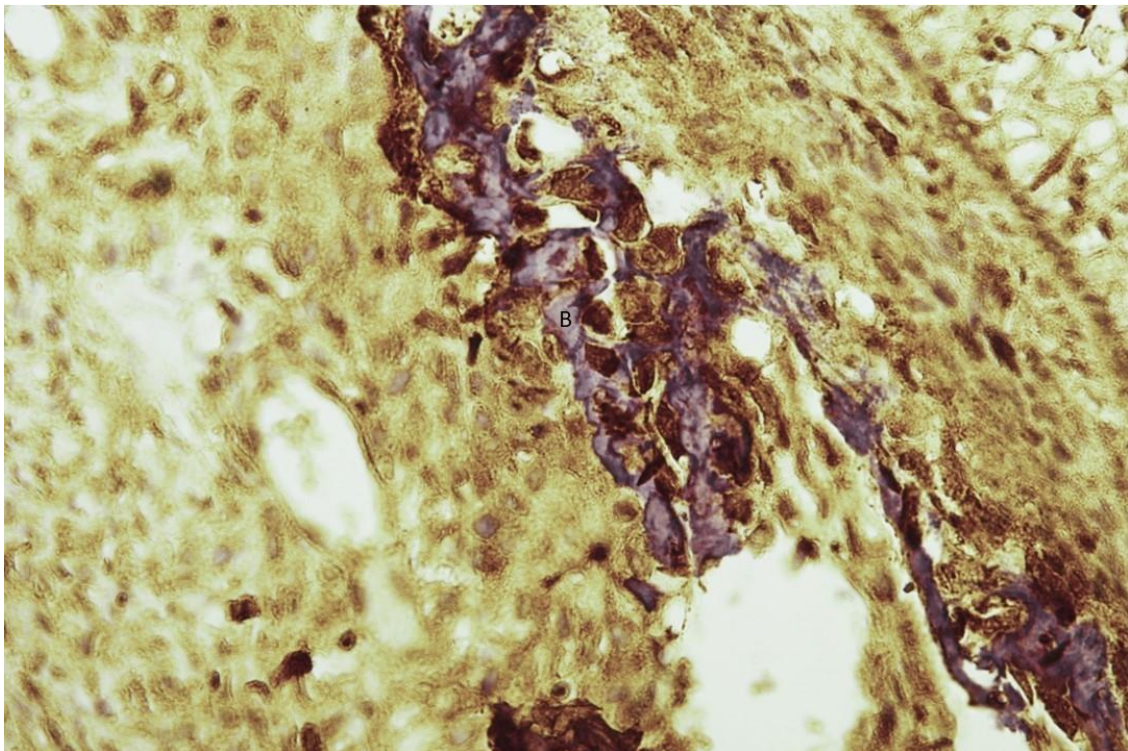
Rycina 29. Tkanka okołożębowa rozwijającego się zęba szczura z grupy poddanej działaniu TCDD i witaminy E, B – kość; 100x

W grupie 4 (NTCDD+ASA) w szkliwie występuje znacznie więcej komórek cylindrycznych niż prostopadłościennych. W obszarze komórek odontoblastycznych widoczne są liczne cylindryczne odontoblasty. W miazdze obserwuje się przyspieszoną angiogenezę. Obserwuje się zaawansowany rozwój kości wyrostka zębodołowego w obszarach obwodowych. Nie stwierdzono nacieków leukocytarnych (Rys. 29).



Rycina 29. Część wierzchołkowa zęba szczura z grupy poddanej działaniu TCDD i ASA, Od – odontoblast, D – zębina, En – enameloblast; 100x

W grupie 4 (TCDD+ASA) glikacja tkanki kostnej wyrostka zębodołowego i przyzębia nie jest tak silna jak w grupie TCDD. W preparatach z tej grupy stopień glikacji jest zauważalnie niższy, około 30% reakcji obserwowanej w grupie TCDD. Glikację można zaobserwować w osteocytach, a także osteoklastach.



Rycina 30. Tkanka okołożębowa rozwijającego się zęba szczura z grupy poddanej działaniu TCDD i ASA, B – kość; 100x

5. Dyskusja

Produkty zaawansowanej glikacji (AGE) odgrywają znaczącą rolę w patofizjologii chorób człowieka. Tworzą się na drodze nieenzymatycznej reakcji cukrów redukujących z wolnymi grupami aminowymi białek¹. Ich zwiększone miano jest obecne w cukrzycy, wielu chorobach o podłożu zapalnym i nowotworach¹³. Poprzez interakcję z receptorem dla produktów zaawansowanej glikacji (RAGE) wywołują one negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmu, między innymi poprzez aktywację oksydazy NADPH i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B^{30,31}. Wywołany przez AGE wzmożony stres oksydacyjny, zmiany konformacyjne białek i indukcja cytokin prozapalnych przyczyniają się do angiopatii obserwowanej w cukrzycy²³, jak również promują proliferację, naciekanie i tworzenie się przerzutów w chorobach nowotworowych³⁴. AGE10, nowo odkryty związek wykazuje znaczne różnice w porównaniu do klasycznych produktów glikacji, ma on między innymi właściwości immunogenne, genotoksyczne i proapoptotyczne¹⁵, jego syntetyczny analog wywodzi się z disacharydu – melibiozy. Opracowano specyficzne przeciwciało i testy immunochemiczne pozwalające wykryć ten epitop. AGE10 zaobserwowano w surowicy pacjentów chorujących na cukrzycę i w różnych tkankach nowotworowych¹⁸. Ostatnie doniesienia o AGE10 pozwalają nam przypuszczać, że swoiste dla tego epitopu przeciwciało anti-MAGE może być z powodzeniem wykorzystane do detekcji markera uszkodzenia tkanek i diagnostyki chorób nowotworowych.

Rak prostaty (PCa) jest drugą najczęściej stawianą diagnozą nowotworową u mężczyzn^{81,83}. Mimo to, postawienie celnego rozpoznania nowotworu prostaty stanowi wyzwanie diagnostyczne. Symptomy związane z PCa są mało specyficzne. Pacjenci najczęściej zgłaszają problemy z rozpoczęciem mikcji, uczucie parcia na mocz, słaby strumień moczu, nykturię czy dysurię⁹⁰. Wszystkie te objawy związane są z przerostem tkanki prostaty⁸⁴ i występują również w innych patologich gruczołu krokowego, między innymi w łagodnym przerście prostaty (BPH)^{100,103}. Postępująca z wiekiem hiperplazja tkanki gruczołu krokowego występuje u ponad 80% mężczyzn powyżej 70 roku życia⁷⁷. Aktualnie dysponujemy ograniczonymi możliwościami diagnostyki przesiewowej. W praktyce, do badań przesiewowych wykorzystuje się pomiar stężenia PSA. Niestety, nie jest on specyficzny do zmian rakowych¹⁰⁰⁻¹⁰². By pogłębić diagnozę, konieczne jest wykonanie biopsji pod kontrolą TRUS. Badania wykazują, że aż 75,9% ilość biopsji wykonanych z powodu wysokiego stężenia PSA skutkowało wynikiem negatywnym¹⁰⁵. Poszukiwania nowych metod diagnostycznych są

przedmiotem wielu badań. Obiecujące doniesienia wskazują na potencjalną rolę wieloparametrycznego rezonansu magnetycznego (mpMRI)¹²¹. Biopsje pod jego kontrolą identyfikowały więcej klinicznie istotnych nowotworów, przy równoczesnej redukcji ilości pobranych wycinków. Ostatnio zaproponowano nowy radioizotop wiążący się swoiście z komórkami wykazującymi nadekspresję RAGE¹²². Stosuje się również modele diagnostyczne między innymi Stockholm3 (STHML3), biorący pod uwagę dane kliniczne i stężenia wielu biomarkerów – ludzką kalikreinę (hK2), β -mikroseminoproteinę, frakcję wolną PSA i całkowite stężenie PSA¹²³. Szczególną uwagę zwraca fakt bezpośredniego związku AGE z PCa. Poprzez przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej, indukcję stresu oksydacyjnego i aktywację RAGE produkty zaawansowanej glikacji bezpośrednio wpływają na stopień zaawansowania raka i rokowanie⁴⁵. Zwiększone miano AGE jest czynnikiem ryzyka nowotworów prostaty⁴⁴, glikacyjna modyfikacja błony podstawnej gruczołu krokowego promuje naciekanie guza, stężenie karboksymetylolizyny (CML) w surowicy pacjentów z nowotworami prostaty koreluje ze stopniem zaawansowania raka⁴⁶, podobną zależność obserwuje się w zakresie ekspresji RAGE^{47,48}. AGE zdają się odgrywać kluczową rolę w patogenezie PCa.

Rola AGE10 w nowotworze prostaty nie została dotychczas opisana. Przypuszczamy, że ten epitop może posłużyć jako wczesny marker nowotworu. W przeprowadzonych badaniach sprawdzono obecność nowego epitopu w biopatach raka prostaty pochodzenia ludzkiego i psiego. Preparaty ludzkie przeanalizowano również pod kątem ekspresji rutynowo stosowanego w diagnostyce patomorfologicznej białka p63. Ponadto użyto przeciwciała wobec O37 wykrywającego endogenne polisacharydy bakteryjne, anti-O37, który wykazuje również reaktywność krzyżową z białkami endogennymi między innymi z wysoko sjałowanym białkiem pasma 3 erytrocytów¹¹⁹. Przypuszczamy, że O37 może posłużyć jako dodatkowy marker nowotworów. Preparaty zostały również zbadane pod kątem reaktywności względem przeciwciał anti-RAGE.

Silna reaktywność przeciwciał anti-MAGE w zakresie cytoplazmy komórek walcowatych tkanki gruczołowej prostaty, przy jednoczesnym braku reakcji w zakresie tkanki mięśniowej gładkiej i tkanki łącznej podścieliska wskazuje na predylekcję do wewnątrzkomórkowego tworzenia się AGE10 w komórkach gruczołowych. Hipotezę wspiera brak reaktywności w zakresie pnia nerwowego, zarówno w preparatach raka prostaty jak i prawidłowej tkanki stercza. Ekspresja AGE10 została zaobserwowana w 86,4% przypadków. AGE10 podobnie do CML, może akumulować się w miarę starzenia się organizmu^{8,46}. W ostatnich badaniach,

AGE10 został zidentyfikowany w mięśniach szkieletowych i kardiomiocytach różnych gatunków zwierząt¹⁶. Zauważony w niniejszych badaniach brak reaktywności w zakresie tkanki mięśniowej gładkiej może być podyktowany mniejszą aktywnością metaboliczną mięśni gładkich wynikającą między innymi z odmiennej morfologii i różniących się mechanizmach inicjacji skurczu. W mięśniach gładkich aktywacja kinazy lekkich łańcuchów miozyny jest modulowana przez kompleks wapnia i kalmoduliny¹²⁴. Zapotrzebowanie energetyczne a w konsekwencji stężenie cukrów redukujących, jest niższe. Z racji nieenzymatycznej natury glikacji, obserwuje się akumulację AGE wraz z wiekiem również u zdrowych osób^{1,8}. Co ważne, anti-MAGE nie wykazywało reaktywności w prawidłowej tkance stercza. Może to świadczyć o odmiennych od klasycznych mechanizmach tworzenia się AGE10 i przemawiać za jego większą specyficznością. Uwagę zwraca mniejsza intensywność barwienia w zakresie cew gruczołowych o morfologii zbliżonej do prawidłowej. Może wskazywać to na korelację ekspresji AGE10 ze stopniem zaawansowania zmian neoplastycznych i nowotworowych. Hipotezę tę wspiera zauważalny wzrost intensywności reakcji pomiędzy grupami ryzyka, w grupie o niskim ryzyku silna reakcja została zaobserwowana w 9% przypadków, w grupie o pośrednim ryzyku w 30% przypadków a w grupie wysokiego ryzyka w 56% przypadków. Efekt AGE, choć nieistotny ($p \approx 0.138$), pozwala na wysunięcie hipotezy o możliwym dodatnim wpływie ilości AGE na zezłośliwienie – z racji na wysoce ujemną wartość β (-0.434). Jednocześnie obserwuje się brak reaktywności anti-MAGE w prostatkach pochodzenia psiego. Pomimo pewnych podobieństw pomiędzy rakiem prostaty u psów i człowieka¹¹⁷, w prezentowanej pracy jednoznacznie nie potwierdzono ekspresji antygenu AGE10 u psów z rakiem prostaty.

W przeprowadzonych badaniach zauważyliśmy wzrost ekspresji RAGE wraz ze stopniem zaawansowania raka prostaty. W 57,1% przypadków zmian o niskim i umiarkowanym ryzyku (Skala Gleasona 6-7) zaobserwowaliśmy immunoreaktywność, gdzie zmiany o wysokiej agresywności (Skala Gleasona >7) wykazały 100% reaktywność. Szansa zezłośliwienia zmiany w przypadku otrzymania ujemnego wyniku RAGE jest ok. 6,13 razy mniejsza w odniesieniu do przypadku otrzymania dodatniego wyniku ($OR \approx 0.163$, $p \approx 0.024$). Pokrywa się to z dotychczas opublikowanymi badaniami^{48,50}. Dodatkowo, z racji braku istotności interakcji AGE10 i RAGE ($p \approx 0.467$), można stwierdzić, że wspomniany efekt RAGE jest uniwersalny dla wszystkich rozpatrywanych wyników AGE w tej samej zmianie. Uwagę zwraca słabsza aczkolwiek obecna reaktywność prawidłowych cew prostaty. RAGE to multiligandowy receptor, rozpoznający wiele związków, m.in. produkty zaawansowanej

glikacji, HMGB1 czy białka rodziny S100²⁶ – co może tłumaczyć szerzej obserwowaną ekspresję tego epitopu w badanych preparatach.

Analiza porównawcza reaktywności anti-MAGE z obecnością p63 wykazała negatywną korelację AGE10 z p63 – co pokrywa się ze spodziewanymi wynikami¹²⁵. Dodatkowo, zaobserwowaliśmy ekspresję antygeny O37 w raku prostaty. Co ciekawe, antygen O37 występował również w jądrze komórkowym, wraz ze wzrostem zaawansowania reaktywność w zakresie jądra znacząco się nasilała, co odróżnia go od AGE10.

Należąca do halogenopochodnych węglowodorów aromatycznych 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyna (TCDD) jest wysoce toksycznym związkem wykazującym działanie teratogenne i neurotoksyczne⁵³. Poprzez interakcję z receptorem węglowodorów aromatycznych (AhR) indukuje stres oksydacyjny i przyczynia się do uszkodzenia tkanek⁵³. Podanie małych dawek TCDD samicom szczurów skutkowało zaburzeniami rozwojowymi u młodych, najczęściej raportowanymi malformacjami był rozszczep podniebienia i wodonercze⁵⁹, jednakże badania donoszą o negatywnym wpływie dioksyn na rozwój m.in. prostaty czy kośćca czaszki⁵⁷. Ekspozycja na dioksyny skutkuje również atrofią grasicy i wpływa negatywnie na spermatogenezę u szczurów. Dane sugerują znaczący, negatywny wpływ na rozwój organizmu.

W przeprowadzonych badaniach zbadano ekspresję AGE10 w preparatach tkanki kostnej zębów szczurów pochodzących od matek poddanych działaniu TCDD jak również zidentyfikowano wpływ α - tokoferolu i kwasu acetylosalicylowego na ekspresję nowego epitopu. Zaobserwowane zmiany – niedojrzałe ameloblasty, nacieki leukocytarne, słabo zarysowana angiogeneza wskazują na zaburzenia rozwoju tkanki kostnej zębów u młodych z grupy poddanej działaniu TCDD. Co ważne, bardzo mała ilość dioksyn, pojedyncza dawka 5 μ g/kg m.c. im, powoduje tak znaczące skutki u noworodków pochodzących od matek potraktowanych TCDD.

W grupie kontrolnej (NK) zaobserwowano fizjologiczny rozwój zęba. Tkanka składała się z cylindrycznych komórek szklivotwórczych (ameloblastów) co wskazuje na ich prawidłowe zróżnicowanie. Tkanka kostna wyrostka zębodołowego charakteryzowała się zaawansowaną osteogenezą, jak również zaobserwowano liczne naczynia krwionośne w miążdże zęba wskazujące na nasiloną angiogenezę. Tkanka kostna wyrostka zębodołowego, zębiny i szkliwa nie wykazywała śladu glikacji. Jednocześnie odnotowano słabą, dodatnią reakcję w tkance łącznej okołozębowej, co oznacza zawartość fizjologiczną na niskim poziomie.

Tkanka kostna zęba noworodków pochodzących od grupy samic poddanych działaniu samej dioksyny (NTCDD) wyróżniała się najbardziej nasilonymi zmianami, rozwój szkliwa i brodawek zębowych był wyraźnie zaburzony. Ameloblasty wykazywały niższy poziom zróżnicowania, zidentyfikowany dzięki ich prostopadłościenną morfologię. Angiogeneza była zauważalnie mniej nasilona. W tkance kostnej wyrostka zębodołowego występowały rejony zahamowanej osteogenezy. Zidentyfikowano nacieki leukocytarne w obszarach sąsiadujących z tkanką kostną zęba. Korelowało to ze znaleziskami w preparatach żuchwy. Uwidoczniono wzmożoną zewnątrzkomórkową glikację. Reakcję zauważono w odontoblastach, ameloblastach i osteocytach i komórkach śródbłona naczyń włosowatych.

Związki przeciwzapalne wpływają hamująco na proces zapalny, *in vitro* proces glikacji w obecności kwasu acetylosalicylowego jest zahamowany. Podobny efekt zauważa się po zastosowaniu związków przeciwutleniających takich jak witamina C, kwercetyna czy flawonoidy¹²⁶. Wyniki wskazują, że kwas acetylosalicylowy miał widoczny wpływ hamujący na gromadzenie się AGE10. Jednocześnie, tokoferol w porównaniu z kwasem acetylosalicylowym tylko nieznacznie zmniejszał szkodliwe działanie dioksyn. Nasze obserwacje sugerują, że proces gromadzenia się w tkankach AGE10 w wyniku działania dioksyn jest modulowany przez inhibitory anty-Cox-2.

Podsumowując, podwyższony poziom AGE10 jest obecny w tkankach nowotworu prostaty. Nowy epitop może posłużyć jako nowy marker PCa. Jego obecność w uszkodzonych dioksynami tkankach żuchwy szczurów sugeruje, że jest on również markerem uszkodzenia tkanki na tle toksycznym.

Interpretacja przedstawionych wyników badań ma ograniczenia wynikające z małej liczby analizowanych przypadków oraz jakościowej oceny ekspresji badanych związków. Mimo widocznego związku AGE10 z PCa zauważamy potrzebę dalszych badań, potencjalnym kierunkiem może być weryfikacja obecności AGE10 w osoczu pacjentów z PCa. Zwiększenie liczby badanych prób o różnym stopniu zaawansowania procesu nowotworowego może pozwolić na zbadanie w którym etapie transformacji nowotworowej następuje akumulacja AGE10 i czy ekspresja tego epitopu antygenowego może być wczesnym markerem nowotworu prostaty u ludzi.

6. Wnioski

1. Epitop AGE10 jest obecny w zmienionych nowotworowo tkankach gruczołu krokowego,
2. Ekspresja AGE10 nie jest związana ze stopniem zaawansowania nowotworu prostaty,
3. Ekspresja RAGE jest związana ze stopniem zaawansowania nowotworu prostaty,
4. Ekspresja epitopu AGE10 nie charakteryzuje nowotworu tkanek gruczołowych prostaty u psów,
5. Toksyczne działanie dioksyn wzmacnia tworzenie się AGE10 w tkance kostnej zęba i żuchwy szczurów, co wskazuje, że jest on markerem uszkodzenia tkanki na tle toksycznym,
6. Kwas acetylosalicylowy i α -tokoferol moduluje w kierunku obniżania powstawania AGE10 w tkance kostnej szczurów uszkodzonej dioksynami.

7. Streszczenie

Produkty zaawansowanej glikacji (AGE) to grupa heterogenicznych związków powstających w nieenzymatycznej reakcji cukrów redukujących z grupami aminowymi białek. Stres oksydacyjny nasila glikację a zwiększone stężenie AGE obserwuje się w wielu chorobach o podłożu zapalnym i nowotworach, między innymi w raku prostaty (PCa). Stężenie produktów zaawansowanej glikacji (AGE) wzrasta w uszkodzonych tkankach. Niedawno odkryty produkt glikacji, AGE10, wyróżnia się od pozostałych klasycznych AGE. Jego syntetyczny analog tworzy się w warunkach bezwodnych, manifestuje właściwości proapoptotyczne, genotoksyczne i immunogenne. Rola AGE10 w nowotworach i uszkodzeniu tkanek nie została dotychczas zbadana. Rak prostaty jest drugim najczęstszym rozpoznaniem onkologicznym wśród mężczyzn. W badaniach przesiewowych stosuje się pomiar stężenia specyficznego antygenu prostaty (PSA). Jednocześnie badanie to charakteryzuje się małą specyficznością względem PCa, stężenie PSA rośnie w często występującym łagodnym przerzucie prostaty i zapaleniu gruczołu krokowego. Wprowadzenie przesiewowego badania PSA ma niewielki wpływ na śmiertelność u mężczyzn – podkreśla to potrzebę poszukiwań nowych metod wczesnej diagnostyki. Przypuszczamy, że ten epitop może posłużyć jako wczesny marker nowotworu. Celem badania była immunohistochemiczna analiza obecności AGE10 w nowotworze prostaty. Wykorzystaliśmy preparaty raka prostaty pochodzenia ludzkiego i psiego. Zaobserwowaliśmy reaktywność przeciwciał anti-MAGE w tkankach ludzkich. Dodatkowym celem pracy było zbadanie, czy uszkodzenie tkanek indukowane dioksynami powoduje akumulację AGE10. Przeprowadzono analizę immunohistochemiczną preparatów tkanki kostnej szczurów pochodzących od matek eksponowanych na 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksynę (TCDD). Zaobserwowaliśmy zaburzenia rozwojowe po ekspozycji na TCDD wraz ze zwiększoną obecnością AGE10. Wykazano, że AGE10 może posłużyć jako marker uszkodzenia tkanek wynikłych z ekspozycji na dioksyny.

8. Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) are a heterogeneous group of compounds formed in an enzymatic reaction between reducing sugars and amino groups of proteins. Glycation is increased by oxidative stress. Elevated levels of AGEs have been observed in various inflammatory diseases and cancers, including prostate cancer (PCa). The concentration of AGEs increases in damaged tissues. Among the classic AGEs, a recently discovered glycation product called AGE10 stands out. Its synthetic analogue is formed under anhydrous conditions, and exhibits pro-apoptotic, genotoxic, and immunogenic properties. However, the role of AGE10 in cancer and tissue damage remains unclear. Prostate cancer is the second most common cancer diagnosed in men. Screening tests typically measure the concentration of prostate-specific antigen (PSA). However, PSA testing has low specificity for PCa, as elevated PSA levels can also occur in benign prostatic hyperplasia and prostatitis. The introduction of PSA screening has had minimal impact on mortality rates in men, emphasizing the need for new methods of early diagnosis. We assume that this epitope may serve as an early cancer marker. In this study, our objective was to perform immunohistochemical analysis to examine the presence of AGE10 in prostate cancer. We used human and canine prostate cancer biopsies. We observed the reactivity of anti-MAGE antibodies in human tissues. Another aim of our study was to investigate whether dioxin-induced tissue damage leads to the accumulation of AGE10. We conducted immunohistochemical analysis on bone tissue from rats whose mothers had been exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins (TCDD). Our observations revealed developmental abnormalities and increased presence of AGE10 in the offspring exposed to TCDD. This suggests that AGE10 can serve as a marker for tissue damage resulting from dioxin exposure.

9. Piśmiennictwo

1. Singh R, Barden A, Mori L, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-146. doi:10.1007/S001250051591
2. Thorpe S, Baynes J. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):275-281. doi:10.1007/S00726-003-0017-9
3. Rabbani N, Xue M, Thornalley PJ. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconj J*. 2016;33(4):513-525. doi:10.1007/S10719-016-9705-Z
4. Brings S, Fleming T, Freichel M, Muckenthaler MU, Herzig S, Nawroth PP. Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5):984. doi:10.3390/ijms18050984
5. Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB, Bucala R. Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med*. 1998;4(9):594. doi:10.1007/bf03401759
6. O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1989;28(3):211-248. doi:10.1080/10408398909527499
7. Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, et al. The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. *Cell Metab*. 2018;28(3):337. doi:10.1016/J.CMET.2018.08.014
8. Thomas CJ, Cleland TP, Sroga GE, Vashishth D. Accumulation of carboxymethyllysine (CML) in human cortical bone. *Bone*. 2018;110:128-133. doi:10.1016/j.bone.2018.01.028
9. Hellwig M, Henle T. Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014;53(39):10316-10329. doi:10.1002/anie.201308808
10. Leszek J, Małyszczak K, Bartyś A, Staniszevska M, Gamian A. Analysis of serum of patients with Alzheimer's disease for the level of advanced glycation end products. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2006;21(5):360-365. doi:10.1177/1533317506291075
11. de Groot L, Hinkema H, Westra J, et al. Advanced glycation endproducts are increased in rheumatoid arthritis patients with controlled disease. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(6). doi:10.1186/AR3538
12. Del Turco S, Basta G. An update on advanced glycation endproducts and

- atherosclerosis. *BioFactors Oxf Engl*. 2012;38(4):266-274. doi:10.1002/BIOF.1018
13. Turner DP. The Role of Advanced Glycation End-Products in Cancer Disparity. *Adv Cancer Res*. 2017;133:1. doi:10.1016/BS.ACR.2016.08.001
 14. Staniszewska M, Jarosz J, Jon M, Gamian A. Advanced glycation end-products prepared in solution under high pressure contain epitopes distinct from those formed in the dry reaction at high temperature. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005;53(1):71-78.
 15. Czech M, Konopacka M, Rogoliński J, et al. The Genotoxic and Pro-Apoptotic Activities of Advanced Glycation End-Products (MAGE) Measured with Micronuclei Assay Are Inhibited by Their Low Molecular Mass Counterparts. *Genes*. 2021;12(5). doi:10.3390/GENES12050729
 16. Staniszewska M, Bronowicka-Szydełko A, Gostomska-Pampuch K, et al. The melibiose-derived glycation product mimics a unique epitope present in human and animal tissues. *Sci Rep*. 2021;11(1). doi:10.1038/S41598-021-82585-7
 17. Gostomska-Pampuch K, Gamian A, Rawicz-Pruszyński K, et al. Proteins in human body fluids contain in vivo antigen analog of the melibiose-derived glycation product: MAGE. *Sci Rep 2022 121*. 2022;12(1):1-15. doi:10.1038/s41598-022-11638-2
 18. Bronowicka-Szydełko A, Krzystek-Korpaczka M, Gacka M, Pietkiewicz J, Jakobsche-Policht U, Gamian A. Association of Novel Advanced Glycation End-Product (AGE10) with Complications of Diabetes as Measured by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Med*. 2021;10(19). doi:10.3390/JCM10194499
 19. Sims G, Rowe D, Rietdijk S, Herbst R, Coyle A. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:367-388. doi:10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.021908.132603
 20. Hofer S, Uhle F, Fleming T, et al. RAGE-mediated inflammation in patients with septic shock. *J Surg Res*. 2016;202(2):315-327. doi:10.1016/J.JSS.2016.01.019
 21. Manigrasso MB, Juranek J, Ramasamy R, Schmidt AM. Unlocking the Biology of RAGE in Diabetic Microvascular Complications. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2014;25(1):15-22. doi:10.1016/J.TEM.2013.08.002
 22. Shi DY, Bierhaus A, Nawroth PP, Stern DM. RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation? *J Alzheimers Dis JAD*. 2009;16(4):833-843. doi:10.3233/JAD-2009-1030
 23. Wu XQ, Zhang DD, Wang YN, Tan YQ, Yu XY, Zhao YY. AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney. *Free Radic Biol Med*. 2021;171:260-271.

doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.05.025

24. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Makino H. Increased expression of receptor for advanced glycation end products by synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):97-104.
doi:10.1002/ART.21524
25. Logsdon C, Fuentes M, Huang E, Arumugam T. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med.* 2007;7(8):777-789. doi:10.2174/156652407783220697
26. Teissier T, Boulanger É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. *Biogerontology.* 2019;20(3):279-301. doi:10.1007/S10522-019-09808-3
27. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1). doi:10.1038/S41392-021-00687-0
28. Yang H, Wang H, Andersson U. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Front Immunol.* 2020;11:484. doi:10.3389/FIMMU.2020.00484
29. Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW. Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(6):993-1007.
doi:10.1016/J.BBAMCR.2008.11.016
30. Tobon-Velasco J, Cuevas E, Torres-Ramos M. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF- κ B pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2014;13(9):1615-1626.
doi:10.2174/1871527313666140806144831
31. Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, et al. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes.* 2001;50(6):1495-1504.
doi:10.2337/DIABETES.50.6.1495
32. Ramadass V, Vaiyapuri T, Tergaonkar V. Small Molecule NF- κ B Pathway Inhibitors in Clinic. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):5164. doi:10.3390/ijms21145164
33. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2:17023. doi:10.1038/SIGTRANS.2017.23
34. Janiszewska M, Primi MC, Izzard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem.* 2020;295(8):2495-2505. doi:10.1074/jbc.REV119.007759
35. Grivennikov SI, Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev.* 2010;20(1):65-71. doi:10.1016/j.gde.2009.11.004
36. DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM. Immune cells as mediators of solid tumor

- metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(1):11-18. doi:10.1007/s10555-007-9100-0
37. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809
 38. Zinger A, Cho WC, Ben-Yehuda A. Cancer and Aging - the Inflammatory Connection. *Aging Dis.* 2017;8(5):611-627. doi:10.14336/AD.2016.1230
 39. van Heijst JWJ, Niessen HWM, Hoekman K, Schalkwijk CG. Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:725-733. doi:10.1196/annals.1333.084
 40. Sharaf H, Matou-Nasri S, Wang Q, et al. Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(3):429-441. doi:10.1016/j.bbadis.2014.12.009
 41. Nankali M, Karimi J, Goodarzi MT, et al. Increased Expression of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) Is Associated with Advanced Breast Cancer Stage. *Oncol Res Treat.* 2016;39(10):622-628. doi:10.1159/000449326
 42. Rahimi F, Karimi J, Goodarzi MT, et al. Overexpression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in ovarian cancer. *Cancer Biomark Sect Dis Markers.* 2017;18(1):61-68. doi:10.3233/CBM-160674
 43. Kang R, Loux T, Tang D, et al. The expression of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is permissive for early pancreatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(18):7031-7036. doi:10.1073/pnas.1113865109
 44. Yang S, Pinney SM, Mallick P, Ho SM, Bracken B, Wu T. Impact of Oxidative Stress Biomarkers and Carboxymethyllysine (An Advanced Glycation End Product) on Prostate Cancer: A Prospective Study. *Clin Genitourin Cancer.* 2015;13(5):e347. doi:10.1016/J.CLGC.2015.04.004
 45. Rodriguez-Teja M, Gronau JH, Breit C, et al. AGE-modified basement membrane cooperates with Endo180 to promote epithelial cell invasiveness and decrease prostate cancer survival. *J Pathol.* 2015;235(4):581-592. doi:10.1002/path.4485
 46. Foster D, Spruill L, Walter KR, et al. AGE metabolites: A biomarker linked to cancer disparity? *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2014;23(10):2186-2191. doi:10.1158/1055-9965.EPI-14-0564
 47. Zhao C, Bao J, Lu Y, et al. Co-expression of RAGE and HMGB1 is associated with cancer progression and poor patient outcome of prostate cancer. *Am J Cancer Res.* 2014;4(4):369-377.

48. Aboushousha T, Lashen R, Abdelnaser K, et al. Comparative Expression of RAGE and SOX2 in Benign and Malignant Prostatic Lesions. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2019;20(2):615. doi:10.31557/APJCP.2019.20.2.615
49. Ishiguro H, Nakaigawa N, Miyoshi Y, Fujinami K, Kubota Y, Uemura H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *The Prostate*. 2005;64(1):92-100. doi:10.1002/PROS.20219
50. Bao JM, He MY, Liu YW, et al. AGE/RAGE/Akt pathway contributes to prostate cancer cell proliferation by promoting Rb phosphorylation and degradation. *Am J Cancer Res*. 2015;5(5):1741.
51. Elangovan I, Thirugnanam S, Chen A, et al. Targeting receptor for advanced glycation end products (RAGE) expression induces apoptosis and inhibits prostate tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(4):1133-1138. doi:10.1016/J.BBRC.2011.12.060
52. Rosińczuk J, Całkosiński I. Effect of tocopherol and acetylsalicylic acid on the biochemical indices of blood in dioxin-exposed rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40(1):1-11. doi:10.1016/J.ETAP.2015.04.017
53. White SS, Birnbaum LS. An Overview of the Effects of Dioxins and Dioxin-like Compounds on Vertebrates, as Documented in Human and Ecological Epidemiology. *J Environ Sci Health Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2009;27(4):197. doi:10.1080/10590500903310047
54. Bryant PLM, Schmid JE, Fenton SE, Buckalew AR, Abbott BD. Teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the expression of EGF and/or TGF- α . *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol*. 2001;62(1):103-114. doi:10.1093/TOXSCI/62.1.103
55. Nishimura N, Matsumura F, Vogel CFA, et al. Critical role of cyclooxygenase-2 activation in pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;231(3):374-383. doi:10.1016/J.TAAP.2008.05.012
56. Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, et al. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 1997;2(10):645-654. doi:10.1046/J.1365-2443.1997.1490345.X
57. Yoshioka W, Tohyama C. Mechanisms of Developmental Toxicity of Dioxins and

- Related Compounds. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3). doi:10.3390/IJMS20030617
58. Gostomska-Pampuch K, Ostrowska A, Kuropka P, et al. Protective effects of levamisole, acetylsalicylic acid, and α -tocopherol against dioxin toxicity measured as the expression of AhR and COX-2 in a chicken embryo model. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(4):523-536. doi:10.1007/S00418-016-1528-2
 59. Kransler KM, McGarrigle BP, Olson JR. Comparative developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the hamster, rat and guinea pig. *Toxicology.* 2007;229(3):214-225. doi:10.1016/J.TOX.2006.10.019
 60. Ko K, Theobald HM, Peterson RE. In Utero and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the C57BL/6J Mouse Prostate: Lobe-Specific Effects on Branching Morphogenesis. *Toxicol Sci.* 2002;70(2):227-237. doi:10.1093/TOXSCI/70.2.227
 61. Lin TM, Simanainen U, Moore RW, Peterson RE. Critical windows of vulnerability for effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 2002;69(1):202-209. doi:10.1093/TOXSCI/69.1.202
 62. Teraoka H, Dong W, Ogawa S, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: altered regional blood flow and impaired lower jaw development. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 2002;65(2):192-199. doi:10.1093/TOXSCI/65.2.192
 63. Partanen AM, Kiukkonen A, Sahlberg C, et al. Developmental toxicity of dioxin to mouse embryonic teeth in vitro: Arrest of tooth morphogenesis involves stimulation of apoptotic program in the dental epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;194(1):24-33. doi:10.1016/j.taap.2003.08.014
 64. Kattainen H, Tuukkanen J, Simanainen U, et al. In utero/lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure impairs molar tooth development in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;174(3):216-224. doi:10.1006/TAAP.2001.9216
 65. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules.* 2015;5(1):194-222. doi:10.3390/BIOM5010194
 66. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. Reactions of aminoguanidine with α -dicarbonyl compounds studied by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom Chichester Engl.* 2012;18(4):385-397. doi:10.1255/ejms.1191
 67. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419(1):31-40.

doi:10.1016/j.abb.2003.08.013

68. Sharma C, Kaur A, Thind SS, Singh B, Raina S. Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *J Food Sci Technol*. 2015;52(12):7561-7576. doi:10.1007/s13197-015-1851-y
69. Abdulai IL, Kwofie SK, Gbewonyo WS, Boison D, Puplampu JB, Adinortey MB. Multitargeted Effects of Vitexin and Isovitexin on Diabetes Mellitus and Its Complications. *Sci World J*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/6641128
70. Spagnuolo L, Posta SD, Fanali C, Dugo L, De Gara L. Antioxidant and Antiglycation Effects of Polyphenol Compounds Extracted from Hazelnut Skin on Advanced Glycation End-Products (AGEs) Formation. *Antioxidants*. 2021;10(3):1-14. doi:10.3390/ANTIOX10030424
71. Malik NS, Meek KM. The inhibition of sugar-induced structural alterations in collagen by aspirin and other compounds. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(2):683-686. doi:10.1006/BBRC.1994.1282
72. Singh O, Bolla SR. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Prostate. *StatPearls*. Published online July 25, 2022. Accessed May 26, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540987/>
73. How does the prostate work? - InformedHealth.org - NCBI Bookshelf. Accessed March 2, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279291/>
74. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*. 1981;2(1):35-49. doi:10.1002/pros.2990020105
75. Cohen RJ, Shannon BA, Phillips M, Moorin RE, Wheeler TM, Garrett KL. Central zone carcinoma of the prostate gland: a distinct tumor type with poor prognostic features. *J Urol*. 2008;179(5):1762-1767. doi:10.1016/J.JURO.2008.01.017
76. Ma C, Su H, Li H. Global Research Trends on Prostate Diseases and Erectile Dysfunction: A Bibliometric and Visualized Study. *Front Oncol*. 2020;10:1. doi:10.3389/FONC.2020.627891
77. Roehrborn CG. Benign Prostatic Hyperplasia: An Overview. *Rev Urol*. 2005;7(Suppl 9):S3.
78. Lepor H. Pathophysiology of Lower Urinary Tract Symptoms in the Aging Male Population. *Rev Urol*. 2005;7(Suppl 7):S3.
79. Issa MM, Shrewsbury AB. Transurethral Resection Of The Prostate. *Med Manag Surg Patient Textb Perioper Med Fifth Ed*. Published online November 28, 2022:790-793. doi:10.1017/CBO9780511920660.143

80. Teo JS, Lee YM, Ho HSS. An update on transurethral surgery for benign prostatic obstruction. *Asian J Urol.* 2017;4(3):195-198. doi:10.1016/j.ajur.2017.06.006
81. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019;10(2):63. doi:10.14740/WJON1191
82. Stark T, Livas L, Kyprianou N. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *Transl Androl Urol.* 2015;4(4):455. doi:10.3978/J.ISSN.2223-4683.2015.04.12
83. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(12). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A030361
84. Merriel SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther.* 2018;35(9):1285. doi:10.1007/S12325-018-0766-1
85. Rivera-Izquierdo M, Pérez de Rojas J, Martínez-Ruiz V, et al. Obesity as a Risk Factor for Prostate Cancer Mortality: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of 280,199 Patients. *Cancers.* 2021;13(16):4169. doi:10.3390/cancers13164169
86. Arcidiacono B, Iiritano S, Nocera A, et al. Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:789174. doi:10.1155/2012/789174
87. Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health.* 2019;37(3):288. doi:10.5534/WJMH.180040
88. Kaler J, Hussain A, Haque A, Naveed H, Patel S. A Comprehensive Review of Pharmaceutical and Surgical Interventions of Prostate Cancer. *Cureus.* 2020;12(11). doi:10.7759/CUREUS.11617
89. Litwin M, Tan H. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA.* 2017;317(24):2532-2542. doi:10.1001/JAMA.2017.7248
90. Martin RM, Vatten L, Gunnell D, Romundstad P, Nilsen TIL. Lower urinary tract symptoms and risk of prostate cancer: the HUNT 2 Cohort, Norway. *Int J Cancer.* 2008;123(8):1924-1928. doi:10.1002/IJC.23713
91. La Manna F, Karkampouna S, Zoni E, et al. Metastases in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(3). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A033688
92. Trama A, Foschi R, Larrañaga N, et al. Survival of male genital cancers (prostate, testis and penis) in Europe 1999-2007: Results from the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2015;51(15):2206-2216. doi:10.1016/j.ejca.2015.07.027
93. Siegel DA, O'Neil ME, Richards TB, Dowling NF, Weir HK. Prostate Cancer Incidence and Survival, by Stage and Race/Ethnicity - United States, 2001-2017. *MMWR Morb*

- Mortal Wkly Rep.* 2020;69(41):1473-1480. doi:10.15585/MMWR.MM6941A1
94. Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, et al. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2018;362. doi:10.1136/BMJ.K3519
 95. Naji L, Randhawa H, Sohani Z, et al. Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Fam Med.* 2018;16(2):149-154. doi:10.1370/AFM.2205
 96. David MK, Leslie SW. Prostate Specific Antigen. In: *StatPearls.* StatPearls Publishing; 2023. Accessed June 6, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557495/>
 97. Rastrelli G, Corona G, Vignozzi L, et al. Serum PSA as a predictor of testosterone deficiency. *J Sex Med.* 2013;10(10):2518-2528. doi:10.1111/JSM.12266
 98. Pezaro C, Woo HH, Davis ID. Prostate cancer: measuring PSA. *Intern Med J.* 2014;44(5):433-440. doi:10.1111/IMJ.12407
 99. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, et al. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA.* 2005;294(1):66-70. doi:10.1001/jama.294.1.66
 100. Ornstein D, Pruthi R. Prostate-specific antigen. *Expert Opin Pharmacother.* 2000;1(7):1399-1411. doi:10.1517/14656566.1.7.1399
 101. Djulbegovic M, Beyth RJ, Neuberger MM, et al. Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2010;341:c4543. doi:10.1136/bmj.c4543
 102. Ilic D, O'Connor D, Green S, Wilt TJ. Screening for prostate cancer: an updated Cochrane systematic review. *BJU Int.* 2011;107(6):882-891. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.10032.x
 103. Kaynar M, Yildirim M, Gul M, Kilic O, Ceylan K, S S. Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer differentiation via platelet to lymphocyte ratio. *Cancer Biomark Sect Dis Markers.* 2015;15(3):317-323. doi:10.3233/CBM-150458
 104. Leal J, Welton NJ, Martin RM, et al. Estimating the sensitivity of a prostate cancer screening programme for different PSA cut-off levels: A UK case study. *Cancer Epidemiol.* 2018;52:99-105. doi:10.1016/j.canep.2017.12.002
 105. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med.* 2012;366(11):981-990. doi:10.1056/NEJMOA1113135
 106. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality

- results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(2):125-132.
doi:10.1093/jnci/djr500
107. Sokoll LJ, Sanda MG, Feng Z, et al. A prospective, multicenter, National Cancer Institute Early Detection Research Network study of [-2]proPSA: improving prostate cancer detection and correlating with cancer aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2010;19(5):1193-1200. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0007
 108. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA.* 1998;279(19):1542-1547.
doi:10.1001/jama.279.19.1542
 109. Filella X, Giménez N. Evaluation of [-2] proPSA and Prostate Health Index (phi) for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(4):729-739. doi:10.1515/cclm-2012-0410
 110. Vickers AJ, Gupta A, Savage CJ, et al. A panel of kallikrein marker predicts prostate cancer in a large, population-based cohort followed for 15 years without screening. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* 2011;20(2):255-261. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-1003
 111. Borley N, Feneley M. Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J Androl.* 2009;11(1):74-80. doi:10.1038/AJA.2008.19
 112. Marusch F, Koch A, Schmidt U, et al. Routine use of transrectal ultrasound in rectal carcinoma: results of a prospective multicenter study. *Endoscopy.* 2002;34(5):385-390.
doi:10.1055/S-2002-25292
 113. Munjal A, Leslie SW. Gleason Score. *Encycl Genet Genomics Proteomics Inform.* Published online May 3, 2022:800-800. doi:10.1007/978-1-4020-6754-9_6908
 114. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs - PubMed. Accessed October 14, 2023.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12431819/>
 115. Leroy BE, Northrup N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Vet J Lond Engl* 1997. 2009;180(2):149-162. doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.012
 116. Smith J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology.* 2008;70(3):375-383.
doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.039
 117. Ryman-Tubb T, Lothion-Roy JH, Metzler VM, et al. Comparative pathology of dog and

- human prostate cancer. *Vet Med Sci.* 2021;8(1):110-120. doi:10.1002/vms3.642
118. Kuropka P, Dobrzyński M, Herman K, et al. The Assessment of the Receptors for Advanced Glycation and Products in the Odontogenic Organ of Rat Offspring Originating from Rat Females Exposed to 2,3,7,8-TCDD - Preliminary Study. *Pol J Environ Stud.* 2015;24(6A):183-187.
119. Ebaid H, Duk M, Gamian A. Antibodies against *Citrobacter braakii* O37 cells recognize the N-glycan of the band 3 glycoprotein of human erythrocyte membrane. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;52(3):352-361. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00380.x
120. Korzeniowska-Kowal A, Kochman A, Gamian E, et al. Antibodies against *Escherichia coli* O24 and O56 O-Specific Polysaccharides Recognize Epitopes in Human Glandular Epithelium and Nervous Tissue. *PloS One.* 2015;10(6):e0129492. doi:10.1371/journal.pone.0129492
121. Ghai S, Haider MA. Multiparametric-MRI in diagnosis of prostate cancer. *Indian J Urol IJU J Urol Soc India.* 2015;31(3):194-201. doi:10.4103/0970-1591.159606
122. Konopka C, Woźniak M, Hedhli J, et al. Quantitative imaging of the receptor for advanced glycation end-products in prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2020;47(11):2562-2576. doi:10.1007/S00259-020-04721-1
123. Grönberg H, Adolfsson J, Aly M, et al. Prostate cancer screening in men aged 50-69 years (STHLM3): a prospective population-based diagnostic study. *Lancet Oncol.* 2015;16(16):1667-1676. doi:10.1016/S1470-2045(15)00361-7
124. Hong F, Haldeman BD, Jackson D, Carter M, Baker JE, Cremona CR. Biochemistry of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase. *Arch Biochem Biophys.* 2011;510(2):135-146. doi:10.1016/j.abb.2011.04.018
125. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, et al. p63 Is a Prostate Basal Cell Marker and Is Required for Prostate Development. *Am J Pathol.* 2000;157(6):1769-1775.
126. Li Y, Yao J, Han C, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients.* 2016;8(3):167. doi:10.3390/nu8030167