НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Методичні рекомендації до практичних занять
із дисципліни

«ПРИНЦИПИ ПАТОМОРФОЛОГІЧНОЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПУХЛИННОГО РОСТУ»

Київ - 2025

Установа-розробник: Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Рекомендовано до друку Вченою радою Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (протокол № 12 від 30 вересня 2025 р.)

Укладачі:

Лук'янова Наталія Юріївна, д. б. н. , ст. досл.

Задворний Тарас Володимирович, к. б. н.

Борікун Тетяна Вікторівна, к. б. н.

Чехун Василь Федорович, д. мед. н., професор, академік НАН України

Рецензент:

Кротевич Михайло Станіславович, к. мед. н., медичний директор ТОВ «УКРПАТЕКСПЕРТ»

Методичні рекомендації містять матеріали щодо проведення практичних занять із дисципліни «Принципи патоморфологічної та молекулярної діагностики пухлинного росту» для підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії зі спеціальності І2(222) Медицина» та доктора філософії зі спеціальності Е1(091) Біологія та біохімія.

.

ЗМІСТ

ВСТУП 5
Практичне заняття № 1. Тема: Основи цитоморфологічних досліджень (2 години)..... 6
Перелік питань для обговорення: 6
Протокол гістологічного проведення тканини 6
Протокол зафарбування тканини гематоксиліном та еозином 9
Мікроскопічне дослідження морфологічних особливостей доброякісних та злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози 11
Питання для самоперевірки та самоконтролю: 12
Рекомендовані джерела: 13
Практичне заняття № 2. Тема: Принципи гістохімічних досліджень (2 години)..... 14
Перелік питань для обговорення: 14
Методика трихромного забарвлення за Масоном 14
Методика трихромного забарвлення за Малорі 15
Використання гістохімічного методу для диференційної діагностики доброякісних та злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози 16
Питання для самоперевірки та самоконтролю: 19
Рекомендовані джерела: 19
Практичне заняття № 3. Тема: Принципи імуногістохімічних досліджень (2 години)..... 21
Перелік питань для обговорення: 21
Протокол проведення імуногістохімічного дослідження 22
Імуногістохімічні особливості молекулярних підтипів раку молочної залози .. 25
Питання для самоперевірки та самоконтролю: 27
Рекомендовані джерела: 27
Практичне заняття № 4 Тема: Основні молекулярні методи дослідження біомаркерів (2 години). 29

Перелік питань для обговорення: 29
Протокол проведення ІФА (на прикладі IL-6 у хворих на рак передміхурової залози)..... 29
Протокол проведення зворотньо-транскрипційної ПЛР у реальному часі для визначення експресії мРНК у сироватці крові хворих на рак передміхурової залози..... 32
Питання для самоперевірки та самоконтролю:..... 33
Рекомендовані джерела: 34

ВСТУП

Навчальна дисципліна «**Принципи патоморфологічної та молекулярної діагностики пухлинного росту**» забезпечує професійний розвиток майбутнього здобувача наукового ступеню в галузі охорони здоров'я і біології та спрямована на підготовку аспірантів як ефективних дослідників і викладачів вищої школи, здатних аналізувати спеціальну літературу та застосовувати отриману інформацію і знання у науковій та викладацькій роботі; досягти певного розвитку професійних навичок і вмінь та вміло здійснювати самоконтроль, самоаналіз, об'єктивну самооцінку своєї наукової, освітньо-наукової та науково-організаційної діяльності.

В рамках дисципліни «**Принципи патоморфологічної та молекулярної діагностики пухлинного росту**» аспіранти отримають знання щодо основних принципів ранньої діагностики та скринінгу злоякісних пухлин різного гістогенезу з урахуванням їх цитоморфологічних особливостей, а також молекулярно-біологічних характеристик з урахуванням ступеня поширеності пухлинного процесу. Поряд з цим, детально будуть розглянуті питання патогенетичних основ та механізмів розвитку злоякісних новоутворень, молекулярно-генетичних аспектів прогресії, метастазування та особливостей формування медикаментозної резистентності.

При викладанні дисципліни «**Принципи патоморфологічної та молекулярної діагностики пухлинного росту**» особлива увага зосереджена на сучасних методологічних підходах з використанням цитоморфологічних досліджень для ідентифікації ознак доброякісних та злоякісних пухлин, імуногістохімічних та гістохімічних досліджень для діагностики та визначення ступеня злоякісності новоутворень, а також молекулярних методів дослідження біомаркерів для прогнозування перебігу пухлинного процесу.

Практичні заняття за змістом відповідають навчальній програмі із дисципліни «**Принципи патоморфологічної та молекулярної діагностики пухлинного росту**», мають обсяг 8 академічних годин. Заплановані заняття проводяться у вигляді традиційних практичних занять, на яких аспіранти за допомоги викладача опановують принципи та методики цитоморфологічних, гістохімічних, імуногістохімічних досліджень доброякісних та злоякісних новоутоворень, а також основних молекулярно-біологічних методів дослідження маркерів пухлинного росту для діагностики та прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

Практичне заняття № 1

Тема: Основи цитоморфологічних досліджень (2 години).

Мета заняття: детально ознайомитись та опанувати основні методичні підходи до цитоморфологічних досліджень для диференційної діагностики та прогнозування перебігу злоякісних новоутворень. Дослідити морфологічні особливості доброякісних та злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози з використанням методу світлової мікроскопії.

Перелік питань для обговорення:

- Правила забору матеріалу для цитоморфологічних досліджень
- Принципи фіксації біологічного матеріалу
- Особливості підготовки біологічного матеріалу для виготовлення гістологічних зрізів.
- Техніка виготовлення гістологічних зрізів
- Типи гістологічних барвників
- Мікроскопічна техніка для аналізу мікропрепаратів
- Мікроскопічне дослідження цитоморфологічних особливостей доброякісних та злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози

Протокол гістологічного проведення тканини

Робота проводиться у витяжній шафі у захисному одязі. Зразки експериментального, післяопераційного чи біопсійного матеріалу дістають із фіксатора.

Примітка: *зразки тканини одразу після проведення забору матеріалу були поміщені до ємності із фіксатором, об'єм якого мінімум у 20 разів перевищує об'єм тканини. Фіксацію проводять продовж 4-6 днів за температури 25-26^{o}С. як фіксатор зазвичай використовується нейтральний 10% формалін.*

Для подальшого дослідження проводять вирізання шматочків тканини в діаметрі не більше як 5-7 міліметрів. Окремі зразки вирізаної тканини розміщують у гістологічних касетах, попередньо промаркованих та підписаних відповідно до кодування зразка. Надалі касети поміщають до ємності та ставлять під слабкий потік проточної води. Промивання від фіксатора проводять впродовж 60 хвилин. В подальшому досліджуваний

матеріал в гістологічних касетах проводять через серію розчинів для дегідратації, ущільнення, та просочення парафіном (Рис. 1):

1. Етанол 50° – 60 хвилин
2. Етанол 70° – 60 хвилин / залишити на ніч
3. Етанол 80° – 60 хвилин / залишити на ніч
4. Етанол 96 (1) – 30 хвилин
5. Етанол 96 (2) – 30 хвилин
6. Целоїдин-касторова суміш – 3 доби

Примітка: *для пришвидшення процесу гістологічного проведення тканини та оптимізації протоколу гістологічні блоки слід викласти на фільтрувальний папір та залишити на 10 хвилин для видалення надлишку целоїдин-касторової суміші.*

7. Суміш етанолу та хлороформу у об'ємному співвідношенні 1:1 – 30 хвилин
8. Хлороформ 1 – 30 хвилин
9. Хлороформ 2 – 30 хвилин
10. Хлороформ 3 – 30 хвилин
11. Парафінова каша (суміш хлороформу та парафіну у об'ємному співвідношенні 1:1) – 45 хвилин
12. Парафін 1 – 30 хвилин
13. Парафін 2 – 30 хвилин
14. Парафін 3 – 30 хвилин

Примітка: *Критично важливо щоб ємності із парафіном були розігріті до 56-58^{o}C впродовж усього часу відповідно до протоколу для підтримання його у розплавленому стані.*

Надалі із використанням форм для заливки гістологічного матеріалу кожну окрему касету із зразком дістають із парафіну, розміщують по центру форми для заливки потрібним боком до дна форми та вносимо розплавлений парафін. Зверху накривають касетою для заливки та залишають до повного застигання на 15-30 хвилин.

Примітка: *для пришвидшення застигання форму для заливки із матеріалом можна помістити до холодильника на 2-8^{o}C.*

Готові парафінові блоки зберігаються у сухому прохолодному місці при кімнатній температурі. Критично важливим є захист готових гістологічних парафінових блоків від постійної дії сонячних променів, адже це може вплинути на подальшу якість досліджень.

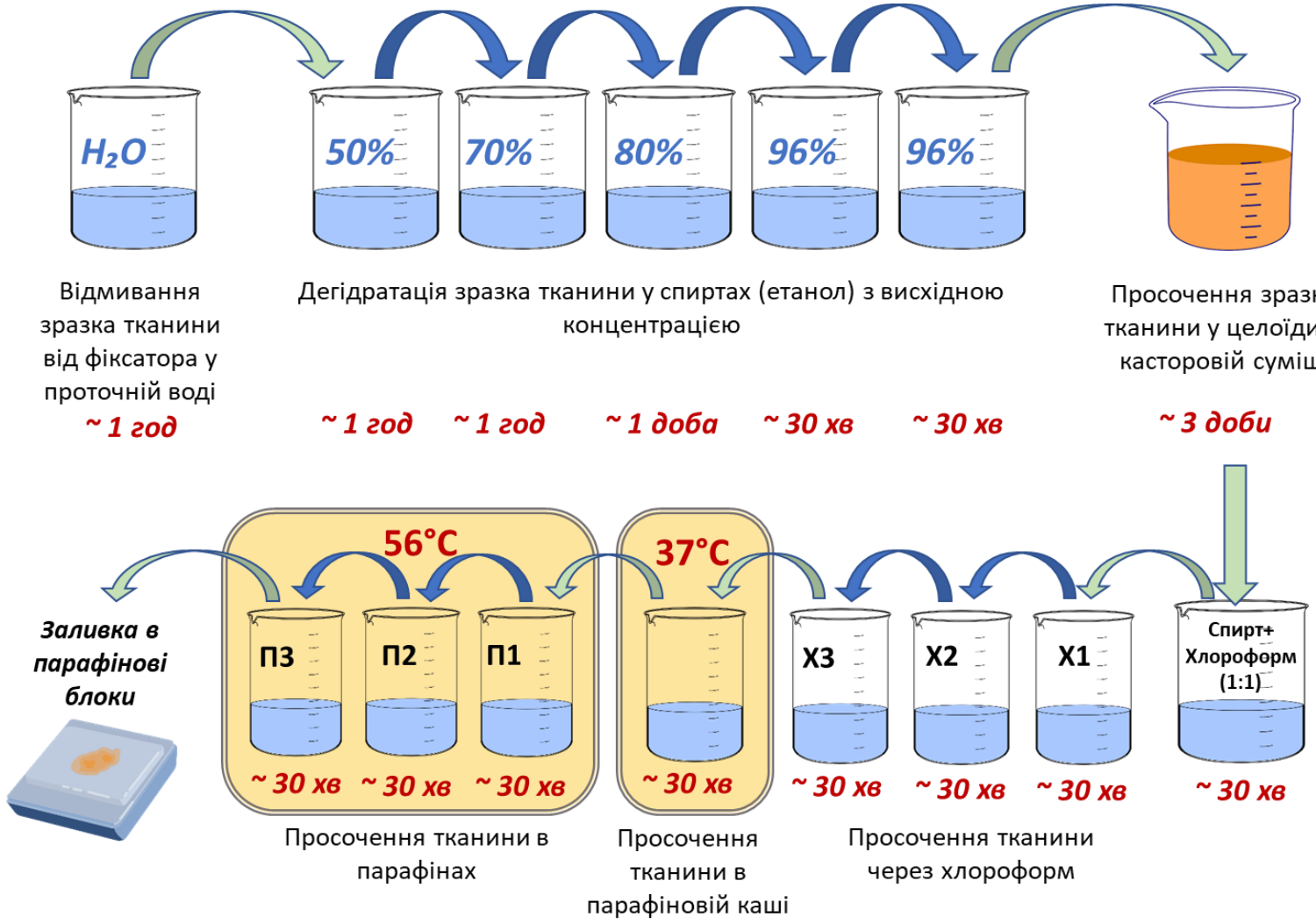


Рис. 1. Узагальнений протокол гістологічного проведення тканини новоутворень молочної та передміхурової залоз людини

Протокол зафарбування тканини гематоксиліном та еозином

Предметні скельця із попередньо виготовленими гістологічними зрізами занурити у ксилол або його замінник для видалення парафіну (Рис. 2):

Ксилол 1 - 15-20 хвилин
Ксилол 2 - 15-20 хвилин

Фільтрувальним папером зібрати забрати надлишок ксилолу з препаратів та занурити скельця в етанол:

Етанол 1 (96%) – 15-20 хвилин
Етанол 2 (96%) – 15-20 хвилин

Промити препарати в дистильованій воді (занурити скельця в стакан із дистильованою водою до повного покриття зрізів) - 5 хвилин.

Нанести крапельним методом гематоксилін (час інкубації встановлюється емпірично) та інкубувати 3 хвилини.

Надлишок гематоксиліну злити в ємність для фарби, скельця промити в проточній воді впродовж 5-8 хвилин.
Нанести крапельним методом еозин (час інкубації встановлюється емпірично) та інкубувати 1 секунду.

Занурити скельця в суміш етанолу та еозину (1:1) на інкубувати 10 хвилин.

Фільтрувальним папером зібрати забрати залишки розчину еозину з препаратів та занурити в чистий етанол (96%) на 15-20 хвилин

Фільтрувальним папером зібрати надлишок етанолу з препаратів та у ксилол або його замінник:

Ксилол 1 - 20 хвилин
Ксилол 2 - 20 хвилин

Заключити препарати в канадський бальзам або його синтетичні аналоги.

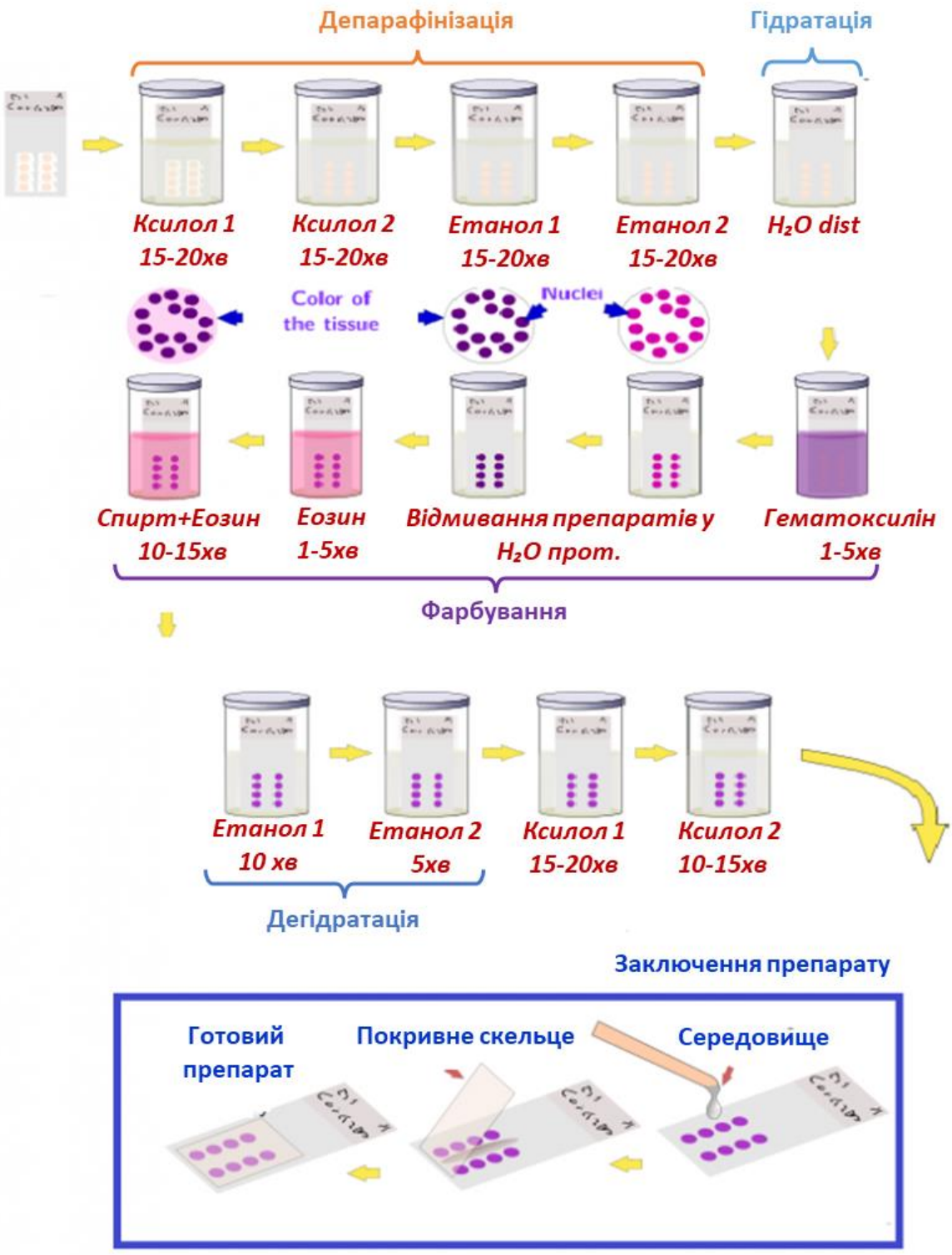


Рис. 2. Узагальнений протокол зафарбування препаратів тканини новоутворень молочної та передміхурової залоз людини гематоксиліном та еозином для морфологічних досліджень

Мікроскопічне дослідження морфологічних особливостей доброякісних та злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози

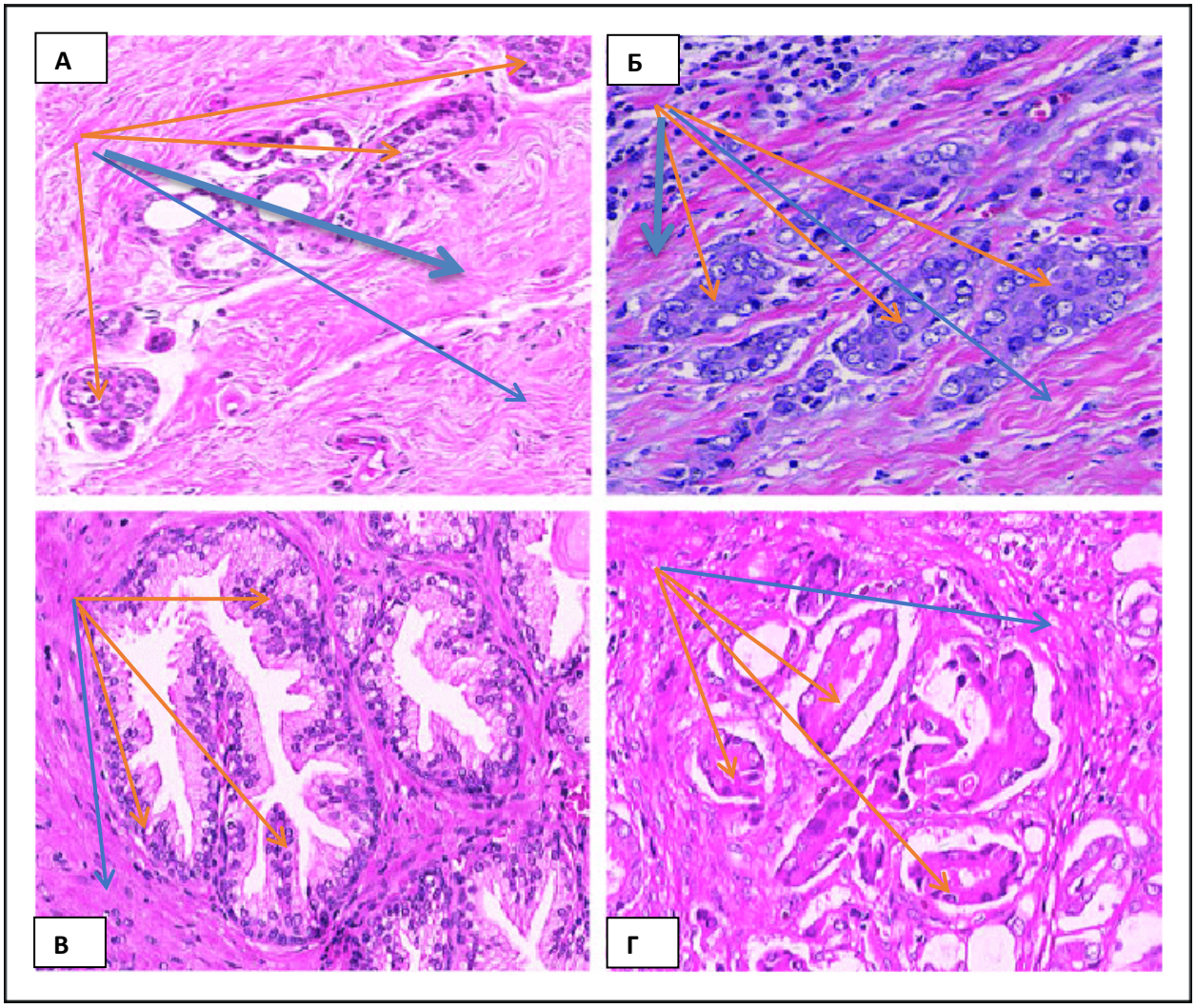


Рис. 3. Репрезентативні мікрофото тканини доброякісних (А та Б) та злоякісних (В та Г) новоутворень молочної та передміхурової залози зафарбованої гематоксиліном та еозином (х400): **А** – доброякісна пухлина молочної залози (фіброаденома); **Б** – злоякісна пухлина молочної залози (аденокарцинома); **В** – доброякісна пухлина передміхурової залози (аденома або доброякісна гіперплазія); **Г** – злоякісна пухлина передміхурової залози (аденокарцинома). Синіми стрілками відмічено пухлинні клітини, а помаранчевими – строму новоутворень.

Як видно з наведених мікрофото, наведених на Рис. 3. клітини доброякісних новоутворень молочної та передміхурової залози набагато менші за розміром у порівнянні з клітинами злоякісних новоутворень. У доброякісних новоутвореннях частково збережена структура органів: присутні залози, міститься велика кількість стромального компоненту. У

тканині фіброаденоми молочної залози переважають округлі і овальні залозисті структури, часто згруповані у вигляді часточок з вогнищевим розгалуженням кінцевих залоз, в той час як у тканині аденоми передміхурової залози присутні папілярні залозисті структури, а також зустрічаються епітеліальні сосочки істинного і псевдоістинного типів.

Клітини злоякісних пухлин молочної та передміхурової залози набагато більші за розміром у порівнянні з клітинами доброякісних новоутворень. Злоякісні новоутворення молочної та передміхурової залози представлені клітинами різного ступеню поліморфізму: від малих правильних з круглим ядром та близьким до норми ядерно-цитоплазматичним співвідношенням до анапластичних, великих клітин неправильної форми з об'ємними, гіперхромними чи гіпертрофічними ядрами, та помітно редукованою цитоплазмою. Крім того, у злоякісних новоутвореннях молочної та передміхурової залози міститься менша кількість строми, зустрічаються структури епітеліальних пластів, що нерідко повністю заповнюють просвіти залоз і розміщуються безсистемно. Клітини злоякісних новоутворень, як правило, не формують структур, характерних для молочної та предміхурової залози в нормі, їм властива часткова втрата адгезивних властивостей та тенденція до формування тонких лінійних тяжів.

Питання для самоперевірки та самоконтролю:

1. Що таке цинковий формалін та гель-формалін?
2. Яким чином здійснюють маркування країв резекції в гістології?
3. Як здійснюють дегідратацію тканин в гістології?
4. Перерахуйте основні етапи гістологічного проведення тканин?
5. Від яких параметрів залежить час фарбування гістологічних зрізів?
6. З яких клітин розвивається аденома передміхурової залози та фіброаденома молочної залози?
7. Які відмінні ознаки аденоми та фіброаденоми?
8. Що таке ступінь злоякісності раку передміхурової залози за шкалою Глісона?
9. З яких клітин розвивається дольковий та протоковий рак молочної залози?

Рекомендовані джерела:

1. He L, Long LR, Antani S, Thoma GR. (2012). Histology image analysis for carcinoma detection and grading. Computer methods and programs in biomedicine, 107(3), 538-556.
2. Titford M. (2006). A short history of histopathology technique. Journal of Histotechnology, 29(2), 99-110.
3. Veta M, Pluim JP, Van Diest PJ, Viergever MA. (2014). Breast cancer histopathology image analysis: A review. IEEE transactions on biomedical engineering, 61(5), 1400-1411.
4. Lindberg MR. (2017). Diagnostic Pathology: Normal Histology-E-Book: Diagnostic Pathology: Normal Histology-E-Book. Elsevier Health Sciences.
5. Culling CFA. (2013). Handbook of histopathological and histochemical techniques: including museum techniques. Butterworth-Heinemann.
6. Tan, P. H., Ellis, I., Allison, K., Brogi, E., Fox, S. B., Lakhani, S., Lazar, A. J., Morris, E. A., Sahin, A., Salgado, R., Sapino, A., Sasano, H., Schnitt, S., Sotiriou, C., van Diest, P., White, V. A., Lokuhetty, D., Cree, I. A., & WHO Classification of Tumours Editorial Board (2020). The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. Histopathology, 77(2), 181–185. https://doi.org/10.1111/his.14091
7. Surintrspanont, J., & Zhou, M. (2022). Prostate Pathology: What is New in the 2022 WHO Classification of Urinary and Male Genital Tumors?. Pathologica, 115(1), 41–56. https://doi.org/10.32074/1591-951X-822
8. Ondič O. (2022). The changes and updates in the fifth edition of the WHO Classification of prostate tumors. Zmeny a novinky vo WHO klasifikácii nádorov prostaty z roku 2022. Ceskoslovenska patologie, 67(4), 205–206.
9. Panhofer, P., Ferenc, V., Schütz, M., Gleiss, A., Dubsky, P., Jakesz, R., Gnant, M., & Fitzal, F. (2014). Standardization of morbidity assessment in breast cancer surgery using the Clavien Dindo Classification. International journal of surgery (London, England), 12(4), 334–339. https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.01.012
10. Zepeda-Castilla, E. J., Recinos-Money, E., Cuéllar-Hubbe, M., Robles-Vidal, C. D., & Maafs-Molina, E. (2008). Clasificación molecular del cáncer de mama [Molecular classification of breast cancer]. Cirugia y cirujanos, 76(1), 87–93.

Практичне заняття № 2

Тема: Принципи гістохімічних досліджень (2 години).

Мета заняття: детально ознайомитись та опанувати основні методичні підходи до гістохімічних досліджень в онкології. Дослідити морфологічні особливості доброякісних та злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози з використанням методу світлової мікроскопії.

Перелік питань для обговорення:

- Основні принципи гістохімічного дослідження
- Вибір фіксатора та його вплив на результати гістохімічного дослідження.
- Гістохімія та цитохімія: спільні риси та ключові відмінності.
- Автоматизовані системи для гістохімічних досліджень: переваги, недоліки та принцип роботи.
- Типові помилки та артефакти при проведенні гістохімії, як їх уникнути та інтерпретувати.
- Способи оцінки результатів гістохімічного дослідження.
- Типові методи гістохімічного виявлення ліпідів, білків, вуглеводів, ферментів амінокислот та іонів.
- Використання гістохімічних методів у діагностиці та прогнозуванні перебігу найбільш розповсюджених гормонозалежних злоякісних новоутворень

Методика трихромного забарвлення за Масоном

Етап пробопідготовки:
Предметні скельця із попередньо виготовленими гістологічними зрізами занурити у ксилол або його замінник для видалення парафіну (Рис. 2):
Ксилол 1 - 15-20 хвилин
Ксилол 2 - 15-20 хвилин
Фільтрувальним папером зібрати забрати надлишок ксилолу з препаратів та занурити скельця в етанол:
Етанол 1 (96%) – 15-20 хвилин
Етанол 2 (96%) – 15-20 хвилин
Промити препарати в дистильованій воді (занурити скельця в стакан із дистильованою водою до повного покриття зрізів) - 5 хвилин.

З метою диференціації структурних елементів пухлинної тканини, використовують метод фарбування за Масоном. Зафарбування пухлинної тканини здійснюється із застосуванням комерційного набору Masson-Goldner Trichrome Staining Kit (DiaPath, Італія), дотримуючись рекомендацій виробника:

1. На кожне предметне скло нанести по 8 крапель залізного гематоксиліну Вейгерта А та додати 8 крапель залізного гематоксиліну Вейгерта В після чого інкубувати 10 хвилин.
2. Промити препарати у проточній воді протягом 2 хвилин.
3. Нанести на зрізи тканини по 8 крапель насиченого спиртового розчину пікринової кислоти та інкубувати 5 хвилин.
4. Препарати відмити в дистильованій воді протягом 30 секунд.
5. На зрізи нанести по 8 крапель кислого фуксину та інкубувати 10 хвилин.
6. Без промивання надлишок барвника обережно усунути фільтрувальним папером.
7. На зрізи нанести 8 крапель фосфорно-молібденової кислоти та інкубувати 4 хвилини.
8. Надлишок реагенту також прибрати фільтрувальним папером.
9. Нанести по 8 крапель світлого зеленого барвника та інкубувати 3 хвилини.
10. Препарати просушити фільтрувальним папером до повного висихання, після чого занурити в ксилол на 20 хвилин, далі — заключити в канадський бальзам або його синтетичний аналог.

Примітка: *кінцевим результатом зафарбування є ядра чорного кольору, цитоплазма клітин світло-червоного, креатин, еластинові і м'язові волокна – червоного, колаген, мукополісахариди, базофільні гранули – зеленого, а еритроцити – жовтого кольору.*

Методика трихромного забарвлення за Малорі

Етап пробопідготовки:
Предметні скельця із попередньо виготовленими гістологічними зрізами занурити у ксилол або його замінник для видалення парафіну (Рис. 2):
Ксилол 1 - 15-20 хвилин
Ксилол 2 - 15-20 хвилин
Фільтрувальним папером зібрати забрати надлишок ксилолу з препаратів та занурити скельця в етанол:
Етанол 1 (96%) – 15-20 хвилин

Етанол 2 (96%) – 15-20 хвилин
Промити препарати в дистильованій воді (занурити скельця в стакан із дистильованою водою до повного покриття зрізів) - 5 хвилин.

З метою диференціації структурних елементів пухлинної тканини, використовують метод фарбування за Малорі. Зафарбування пухлинної тканини здійснюється із застосуванням комерційного набору Masson-Goldner Mallort Staining Kit (DiaPath, Італія), дотримуючись рекомендацій виробника:

1. На кожне предметне скло нанести по 8 крапель залізного гематоксиліну Вейгерта А, додати 8 крапель залізного гематоксиліну Вейгерта В, інкубувати 15 хвилин.
2. Промити препарати у проточній воді протягом 10 хвилин.
3. На зрізи нанести по 2 краплі насиченого спиртового розчину пікромалорі та інкубувати 3 хвилини.
4. Препарати відмити в дистильованій воді протягом 10 секунд.
5. На скельця додати по 8 крапель кислого фуксину та інкубувати 10 хвилин.
6. Без промивання надлишок барвника обережно усунути фільтрувальним папером.
7. На зрізи нанести 8 крапель фосфорно-молібденової кислоти, інкубувати 15 хвилини.
8. Надлишок реагенту прибрати фільтрувальним папером.
9. Нанести по 8 крапель анілінового синього та інкубувати 3 хвилини.
10. Препарати просушити фільтрувальним папером до повного висихання, після чого занурити в ксилол на 20 хвилин, далі — заключити в Cytoseal.

Примітка: *кінцевим результатом зафарбування є ядра чорного кольору, цитоплазма клітин світло-червоного, креатин, еластинові і м'язові волокна – червоного, колаген, мукополісахариди, базофільні гранули – синього, а еритроцити жовтого кольору.*

Використання гістохімічного методу для диференційної діагностики доброякісних та злоякісних новоутворень молочної та передміхурової залози

Гістохімічні методи дослідження є важливим інструментом морфологічної оцінки тканин, особливо у випадках, коли потрібно здійснити диференційну діагностику між доброякісними та злоякісними новоутвореннями. Вони дозволяють виявити та локалізувати білки,

ферменти, вуглеводи, ліпіди та інші макромолекули, що відображають функціональний стан клітин і тканин (Рис. 4 та 5).

У контексті молочної залози, гістохімічні методи сприяють диференціації між:

- Фіброаденомою (доброякісна) — характеризується щільною сполучнотканинною стромою, відсутністю клітинної атипії та мітозів.
- Інвазивною дуктальною карциномою (злоякісна) — морфологічно відзначається інфільтративним ростом, клітинною атипією, поліморфізмом ядер, деструкцією тканини.

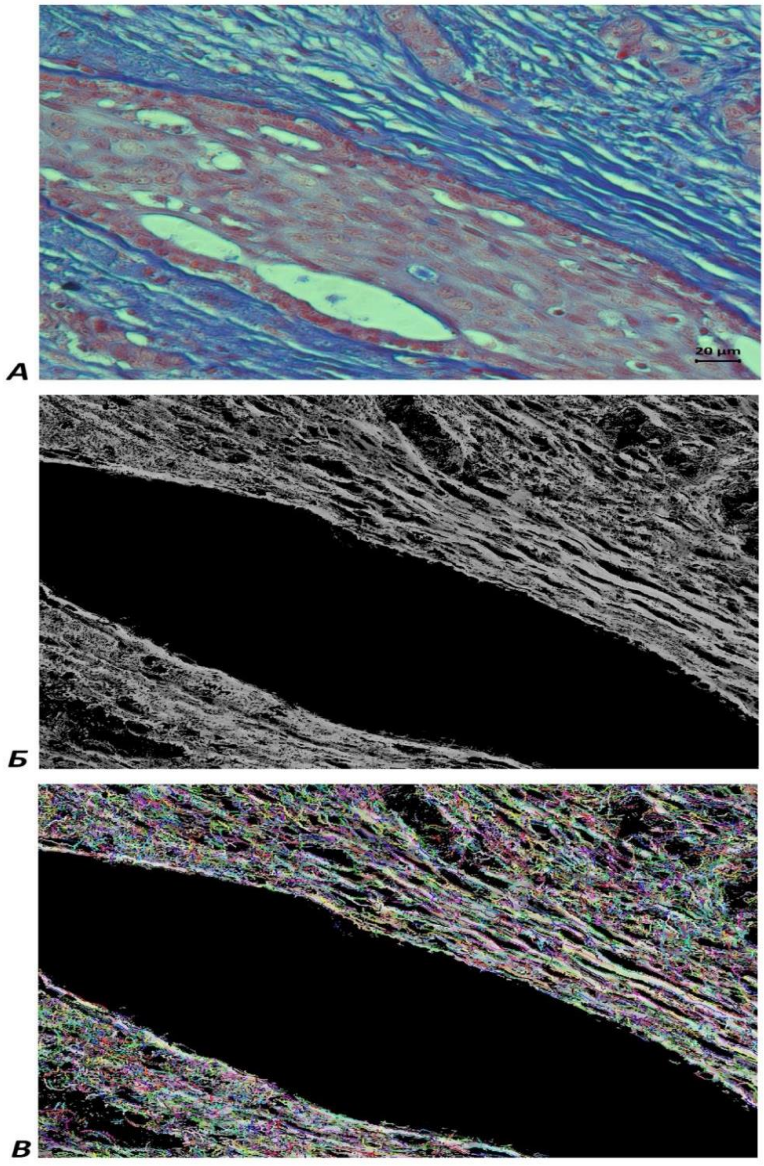


Рис. 4. А – мікрофотографія тканини раку молочної залози, зафарбування за Малорі, х400; Б – монохромна маска на основі мікропрепарату; В – фотографія після маркування колагенових волокон у програмі CurveAlign v. 4.0. beta.

Для передміхурової залози гістохімія дозволяє:

- Відрізнити доброякісну гіперплазію (із збереженим двошаровим епітелієм, наявністю базальних клітин).
- Виявити аденокарциному простати, для якої характерна відсутність базального шару, клітинна атипія, підвищене співвідношення ядерно-цитоплазматичного об’єму.

Застосування трихромних методів (Масона, Малорі) дозволяє візуалізувати колагенові волокна, м’язову тканину, цитоплазму, ядра, що є критично важливим для оцінки ступеня стромальної реакції, інвазії, десмоплазії. У разі злоякісного процесу — часто спостерігається надлишок колагену (фіброз), деформація структури строми, втрата архітектоніки.

Таким чином, гістохімія не лише доповнює рутинну гістологію, а й забезпечує більш глибоке розуміння функціональної та структурної трансформації тканин у процесі пухлинного росту.

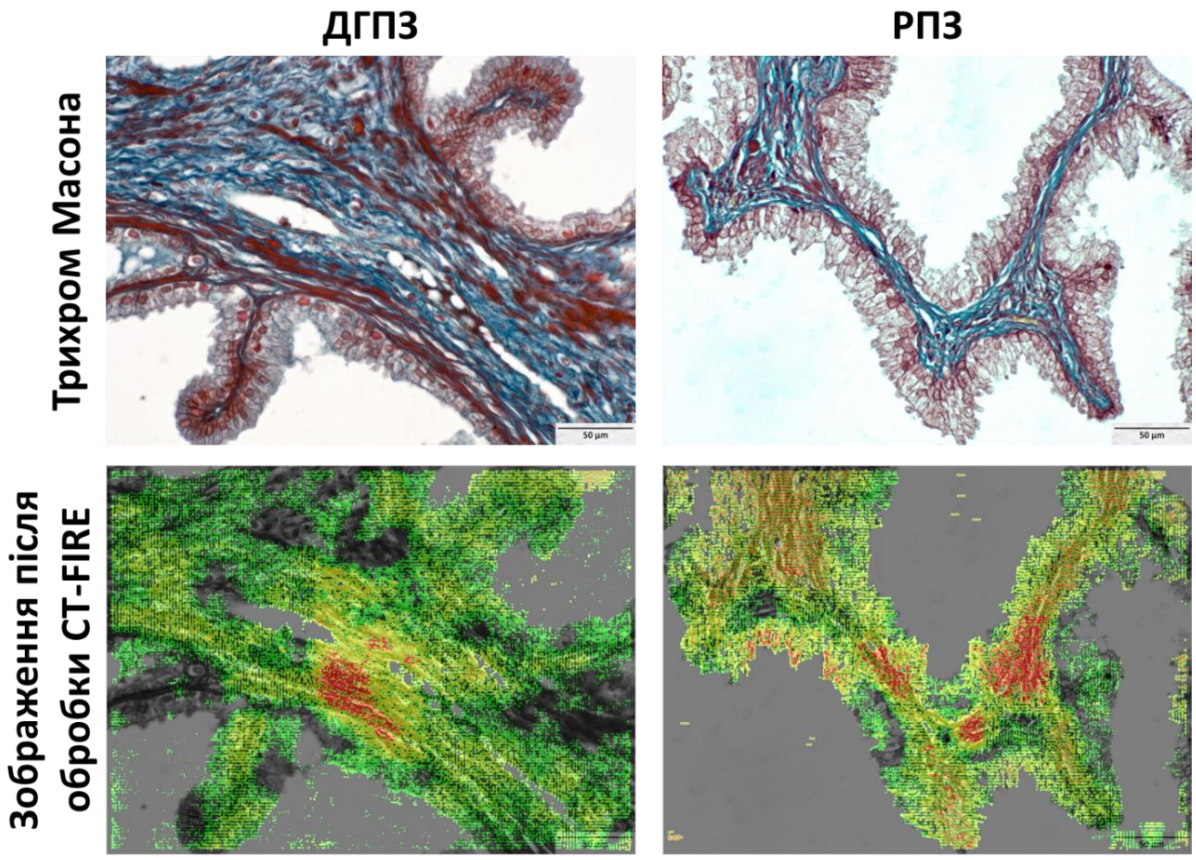


Рис. 5. Репрезентативні зображення морфології колагенових волокон у тканині доброякісної гіперплазії передміхурової залози (ДГПЗ) та раку передміхурової залози (РПЗ) при зафарбуванні за Масоном (х400) та маркуванні їх програмою для аналізу колагенових волокон CurveAlign v. 4.0. beta.

Питання для самоперевірки та самоконтролю:

1. Яку роль відіграє фіксатор у гістохімічному дослідженні і чим зумовлений його вплив на результат?
2. У чому полягає принцип методу фарбування за Масоном? Які структурні компоненти тканини він дозволяє диференціювати?
3. Чим забарвлюються ядра клітин при трихромному фарбуванні за Масоном і за Малорі?
4. Які компоненти пухлинної тканини набувають зеленого або синього кольору відповідно при методах Масона та Малорі?
5. Чим гістохімія відрізняється від цитохімії? Назвіть одну спільну рису та одну відмінність.
6. Які переваги мають автоматизовані системи для гістохімії порівняно з ручними методами?
7. Назвіть типову помилку під час гістохімічного фарбування та поясніть, як її можна уникнути.
8. Які гістохімічні методи використовують для виявлення білків у тканинах?
9. Які доброякісні та злоякісні новоутворення характерні для молочної та передміхурової залози?
10. Яке значення має гістохімічне дослідження в прогнозуванні перебігу гормонозалежних пухлин?

Рекомендовані джерела:

1. Troyer, H. (1980). Principles and Techniques of Histochemistry. Little, Brown and Company.
2. Kiernan, J. A. (2015). Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice (5th ed.). Scion Publishing Ltd.
3. Pearse, A. G. E. (1960). Histochemistry: Theoretical and Applied. J. & A. Churchill Ltd.
4. Lison, L. (1953). Histochimie animale: Principes et méthodes. Gauthier-Villars.
5. Bancroft, J. D., & Stevens, A. (1977). Theory and Practice of Histological Techniques (2nd ed.). Longman Inc.
6. Sargaiyan, V., & Bansal, A. (2014). Enzyme Histochemistry: A Review. Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research, 2(2), 191–195
7. Lukianova, N., Mushii, O., Zadvornyi, T., & Chekhun, V. (2024). Development of an algorithm for biomedical image analysis of the spatial organization of collagen in breast cancer tissue of patients with different

clinical status. FEBS open bio, 14(4), 675–686. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13773

8. Zadvornyi, T., Lukianova, N., Mushii, O., Pavlova, A., Voronina, O., & Chekhun, V. (2023). Benign and malignant prostate neoplasms show different spatial organization of collagen. Croatian medical journal, 64(6), 413–420. https://doi.org/10.3325/cmj.2023.64.413
9. Lukianova, N., Zadvornyi, T., Mushii, O., Pyatchanina, T., & Chekhun, V. (2022). Evaluation of diagnostic algorithm based on collagen organization parameters for breast tumors. Experimental oncology, 44(4), 281–286. https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-4.19137

Практичне заняття № 3

Тема: Принципи імуногістохімічних досліджень (2 години).

Мета заняття: детально ознайомитись та опанувати основні методичні підходи до імуногістохімічних досліджень для диференційної діагностики та прогнозування перебігу злоякісних новоутворень. Дослідити особливості експресії молекулярних маркерів та ідентифікувати молекулярний підтип раку молочної залози.

Перелік питань для обговорення:

- Основні принципи імуногістохімічного дослідження.
- Імуногістохімія та імуноцитохімія, спільні риси та ключові відмінності.
- Варіанти модифікацій імуногістохімічного методу.
- Демаскування антигенів: мета, способи та їх вплив на результати імуногістохімічного дослідження.
- Типи антитіл, що використовуються для імуногістохімічного дослідження: переваги та недоліки моноклональних і поліклональних антитіл.
- Способи оцінки результатів імуногістохімічного дослідження. Якісна, напівкількісна та кількісна оцінка.
- Контроль якості в імуногістохімії: позитивні та негативні контролі, їх значення та приклади.
- Автоматизовані системи для імуногістохімічного дослідження: переваги, недоліки, принцип роботи.
- Типові помилки та артефакти в імуногістохімії: як їх уникнути та інтерпретувати.
- Дослідження імуногістохімічних особливостей різних молекулярних підтипів раку молочної залози.

Протокол проведення імуногістохімічного дослідження

Узагальнений протокол постановки імуногістохімічних реакцій представлено на Рис. 6.

1. *Депарафінізація тканини та її регідратація*

Занурити скельця із зрізами тканини у ксилол або його замінник для видалення парафіну:
Ксилол 1 – 15-20 хвилин
Ксилол 2 – 15-20 хвилин
Промокнути скельця фільтрувальним папером з метою зняття надлишку ксилолу або його замінника та занурити сельця у етанол:
Етанол 1 (96%) – 15-20 хвилин
Етанол 2 (96%) – 15-20 хвилин
З метою регідратації тканини занурити скельця у проточну воду на 5 хвилин.

2. *Демаскування антигенів*

Для демаскування антигенів скельця із гістологічними зрізами необхідно занурити у буферний розчин рекомендований виробником первинних антитіл (*Цитратний буфер/EDTA-буфер*), які використовуються для досліджень та помістити на 20 хвилин у водяну баню при температурі 96°C.

Охолодити скельця при кімнатній температурі (~ 20 хвилин) та промити в фосфатно-сольовому буфері (PBS, pH=7,4). Фільтрувальним папером зібрати краплі навколо зрізів тканини

Нанести *пероксидний блок* (~ 20µl на зріз) та інкубувати 10 хвилин при кімнатній температурі. Промити в PBS, pH=7,4.

Нанести *протеїновий блок* (~ 20µl на зріз) та інкубувати 5 хвилин при кімнатній температурі. Прибрати фільтрувальним папером надлишок реагенту зі скелець.

3. *Нанесення первинних антитіл*

Перед нанесенням первинних антитіл обвести зрізи гістологічним гідрофобним маркером. Антитіла у рекомендованому виробником розведенні нанести на зрізи тканини та інкубувати ~30-60 хвилин (згідно рекомендацій виробника) при кімнатній температурі у вологій камері.
Промити в PBS, pH=7,4.
Фільтрувальним папером зібрати краплі навколо зрізів тканини.

4. *Нанесення вторинних антитіл*

На кожний зріз нанести по 20µl вторинних антитіл передбачених системою детекції та інкубувати 10 хвилин при кімнатній температурі.
Промити в PBS, pH=7,4.
Фільтрувальним папером зібрати краплі навколо зрізів тканини

5. *Нанесення кон'югованого з пероксидазою хрону полімеру (HRP)*

На кожний зріз нанести по 20µl HRP та інкубувати 10 хвилин при кімнатній температурі.
Промити в PBS, pH=7,4.
Фільтрувальним папером зібрати краплі навколо зрізів тканини.

6. *Нанесення DAB.*

На кожний зріз нанести по 20µl попередньо приготованого DAB (готується із розрахунку 30 µl DAB-хромогену на 1 ml готового розчину) та інкубувати 10 хвилин при кімнатній температурі
Скельця із зрізами промити в дистильованій воді.

З метою контрастного забарвлення ядер та гістологічних структур проводимо підфарбовування тканини гематоксиліном. На скельця, крапельним шляхом, необхідно нанести по 1 ml барвника та інкубувати 2-5 хвилин. Надлишок барвника злити та промити препарати в проточній воді з метою диференціювання забарвлення.

7. *Дегідратація тканини та заключення препаратів*

Промокнути скельця фільтрувальним папером з метою зняття води та занурити сельця у етанол:
Етанол 1 (96%) – 15-20 хвилин
Етанол 2 (96%) – 15-20 хвилин
Промокнути скельця фільтрувальним папером з метою зняття надлишку етанолу та занурити сельця у ксилолу або його замінник:
Ксилол 1 - 20 хвилин
Ксилол 2 - 20 хвилин

8. *Заключити препарати в канадський бальзам або його синтетичні аналоги.*

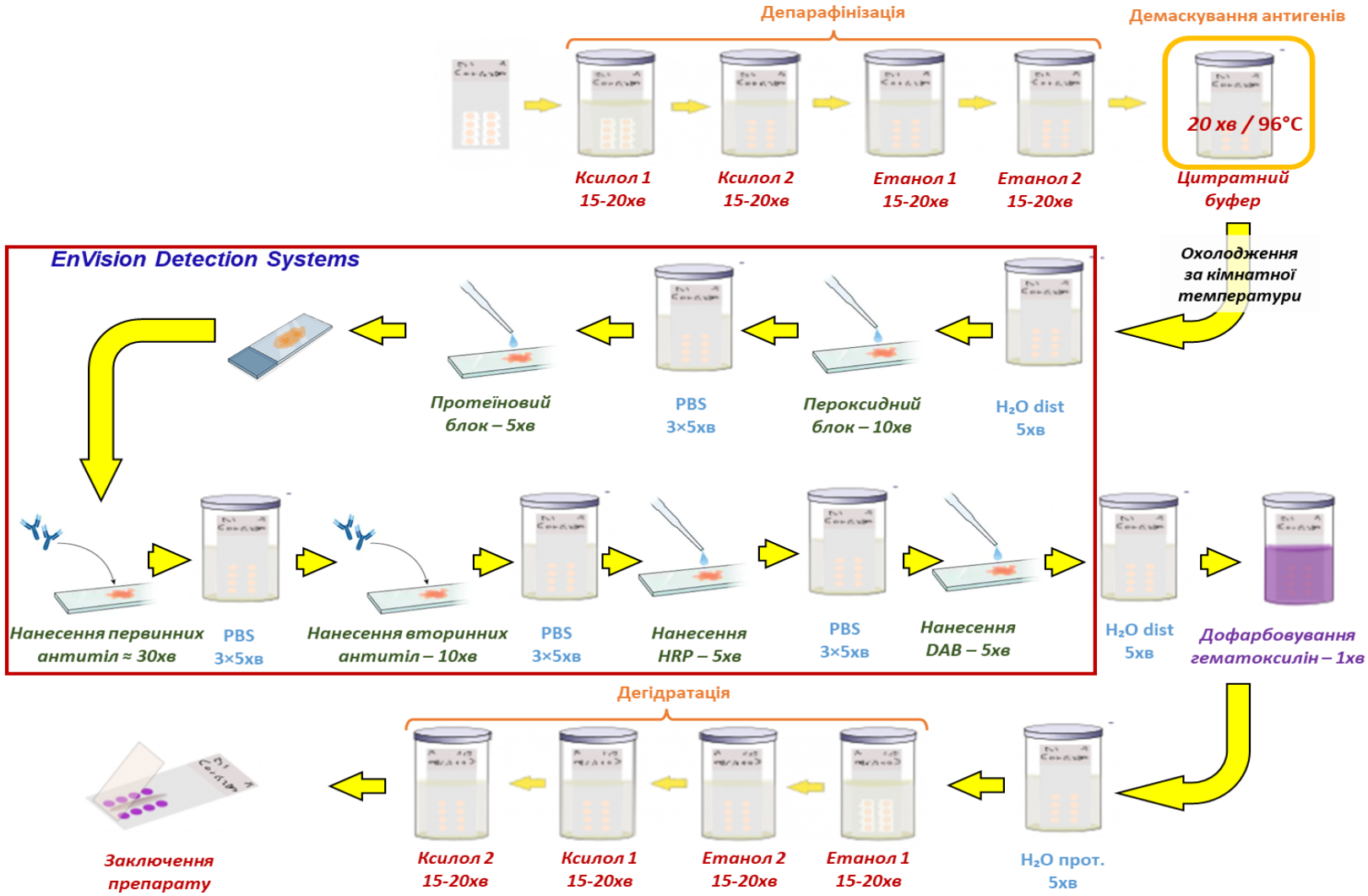
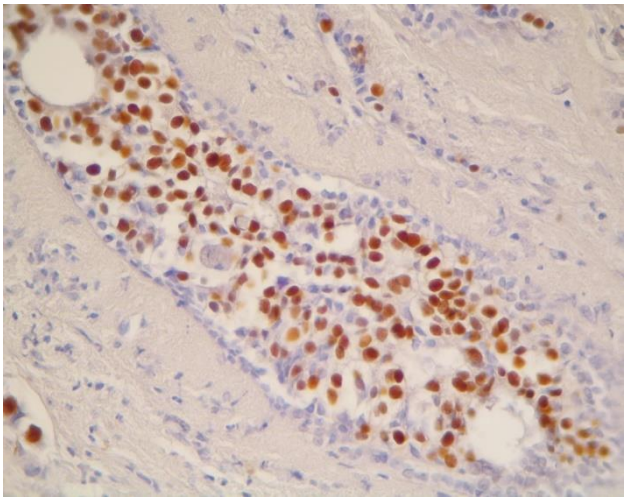
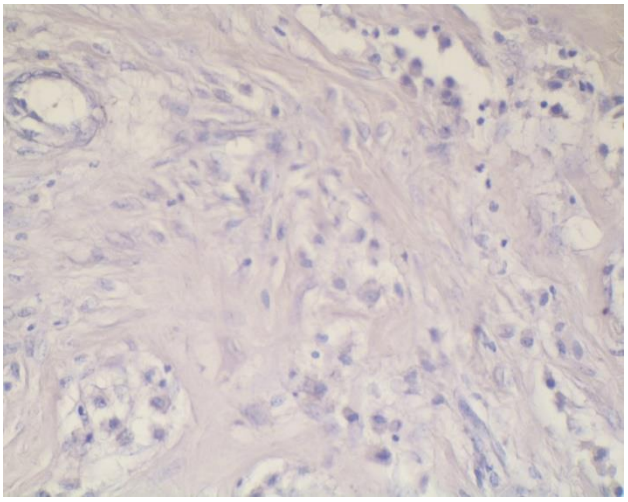


Рис. 6. Узагальнений протокол постановки імуногістохімічних реакцій

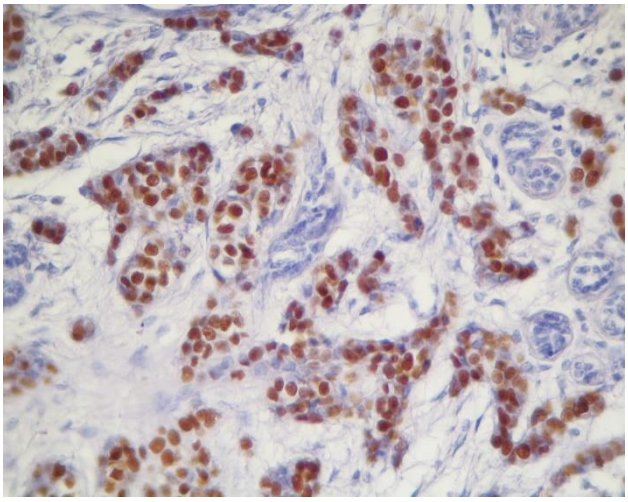
Імуногістохімічні особливості молекулярних підтипів раку молочної залози



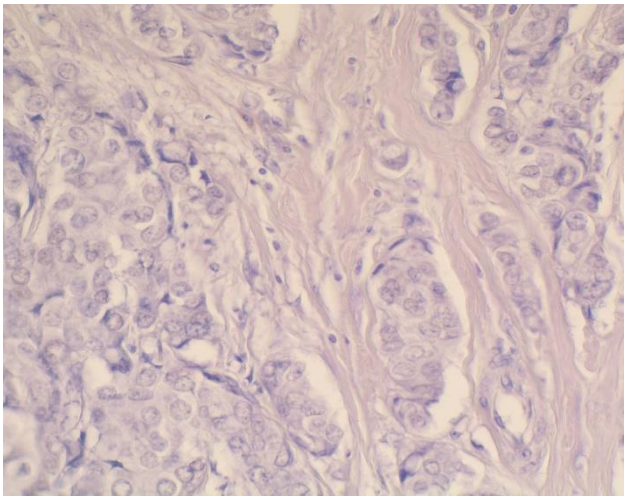
РЕ-позитивна пухлина



РЕ-негативна пухлина

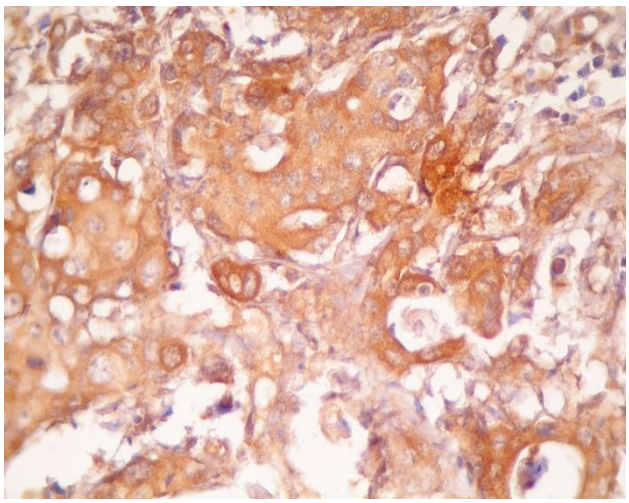


РП-позитивна пухлина

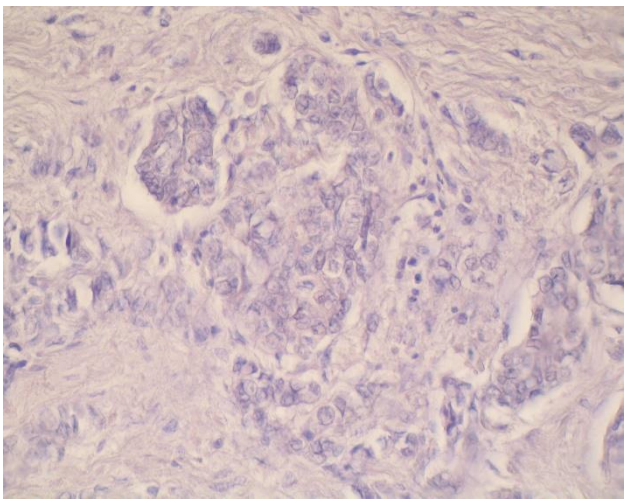


РП-негативна пухлина

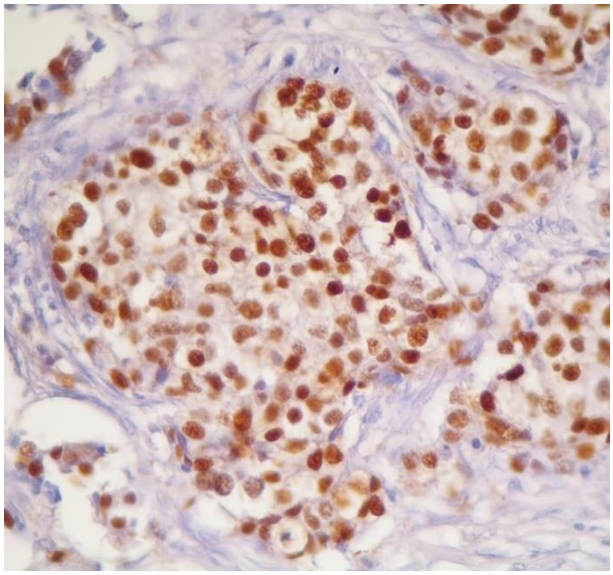
Рис. 7. Експресія молекулярних маркерів у клітинах раку молочної залози (РЕ – Рецептор естрогену; РП – Рецептор прогестерону). Імуногістохімія, дофарбовано гематоксиліном, х400



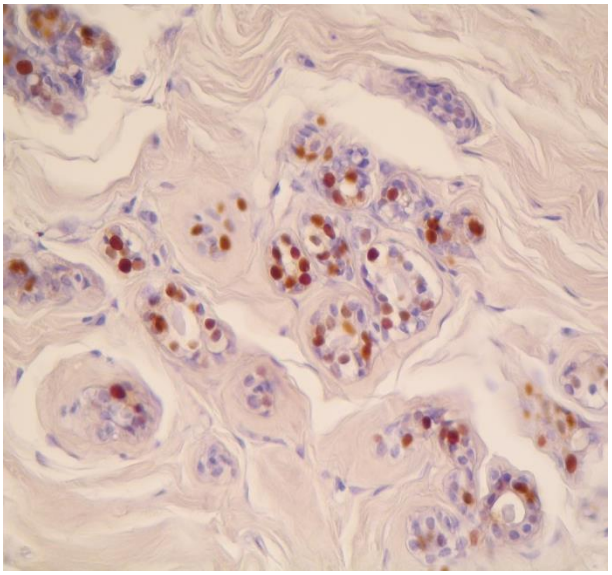
HER2/neu-позитивна пухлина



HER2/neu-негативна пухлина



Ki-67 (високий рівень експресії)



Ki-67 (низький рівень експресії)

Рис. 8. Експресія молекулярних маркерів у клітинах раку молочної залози. Імуногістохімія, дофарбовано гематоксиліном, х400.

Як видно, з наведених мікрофото, експресія рецепторів естрогену та прогестерону, а також Ki-67 виявляється у ядрах пухлинних клітин (продукт реакції у вигляді гранул коричневого кольору), в той час експресія HER2/neu виявляється на поверхні та у цитоплазмі пухлинних клітин (продукт реакції у вигляді гранул коричневого кольору). Негативні за експресією молекулярних маркерів пухлини синього кольору не містять гранул коричневого кольору, тобто у цих пухлинах відсутній продукт імуногістохімічної реакції, який виявляє DAB.

Питання для самоперевірки та самоконтролю:

1. Який вчений заснував імуногістохімію?
2. Що таке прямий та неприямий методи імуногістохімії?
3. Які маркери клітинного циклу використовують для ідентифікації молекулярного підтипу раку молочної залози?
4. Для чого використовують DAB в імуногістохімії?
5. Чим дофарбовують зрізи в імуногістохімії?
6. Як здійснюють депарафінізацію тканин в імуногістохімії?
7. Для чого використовують цитратний буфер в імуногістохімії?
8. Перерахуйте маркери, що використовують для прогнозування перебігу раку молочної залози
9. Що таке Her2/neu-позитивний молекулярний підтип раку молочної залози? Як він ідентифікується?
10. Які маркери клітинного циклу використовують для ідентифікації молекулярного підтипу раку молочної залози?

Рекомендовані джерела:

1. Lin F, Prichard JW, Liu H, Wilkerson ML. (Eds.). (2022). Handbook of practical immunohistochemistry: frequently asked questions. Springer Nature.
2. Taylor CR, Shi SR, Barr NJ, Wu N. (2013). Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. Diagnostic immunohistochemistry, 2, 1-42.
3. Lin F, Shi J. (2022). Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry. In: Lin F, Prichard JW, Liu H, Wilkerson ML. (eds) Handbook of Practical Immunohistochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83328-2_2
4. Blythe PJD. (2012). Immunohistochemical techniques. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques: Expert Consult: Online and Print, 381.
5. Buchwalow IB, Böcker W. (2010). Immunohistochemistry: basics and methods. Springer Science & Business Media.
6. Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. (2006). Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. Archives of pathology & laboratory medicine, 130(7), 1026-1030.
7. Kim SW, Roh J, Park CS. (2016). Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. Journal of pathology and translational medicine, 50(6), 411-418. https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08
8. Yeo SK, Guan, JL. (2017). Breast cancer: multiple subtypes within a tumor?. Trends in cancer, 3(11), https://doi.org/753-760. 10.1016/j.trecan.2017.09.001

9. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. Journal of clinical oncology, 28(10), 1684-1691. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.9284
10. Zaha DC. (2014). Significance of immunohistochemistry in breast cancer. World journal of clinical oncology, 5(3), 382. https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1651901
11. Bonacho TRFLJ, Rodrigues F, Liberal J. (2020). Immunohistochemistry for diagnosis and prognosis of breast cancer: a review. Biotechnic & Histochemistry, 95(2), 71-91. https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.382
12. Gulzar R, Shahid R, Saleem O. (2018). Molecular subtypes of breast cancer by immunohistochemical profiling. International Journal of Pathology, 16(2), 129-134.
13. Holm J, Yu NYL, Johansson A, Ploner A, Hall P, Lindström LS, Czene K. (2021). Concordance of immunohistochemistry-based and gene expression-based subtyping in breast cancer. JNCI cancer spectrum, 5(1), pkaa087. https://doi.org/10.1093/jncics/pkaa087
14. Chekhun SV, Zadvorny TV, Tymovska YO, Anikusko MF, Novak OE, Polishchuk LZ. (2015). CD44+/CD24- markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Experimental oncology*, 37(1), 58-63.
15. Kovalevska L, Kashuba E, Zadvornyj T, Astrid K, Lukianova N, Chekhun V. (2023). Differential expression patterns of AIP, UCKL1, and PKN1 genes in breast cancer of different molecular subtypes. *Experimental Oncology*, *43*(4), 298–305. https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-4.17067
16. Chekhun S, Bezdenezhnykh N, Shvets J, Lukianova N. (2013). Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. Experimental oncology, 35 (3), 174-179.
17. Chekhun VF, Lukianova NY, Chekhun SV, Bezdieniezhnykh NO, Zadvorniy T V, Borikun TV, Klyusov OM. (2017). Association of $cd44^{+}$ $cd24^{-}$/low with markers of aggressiveness and plasticity of cell lines and tumors of patients with breast cancer. Experimental Oncology, 39(3), 203-211.

Практичне заняття № 4

Тема: Основні молекулярні методи дослідження біомаркерів (2 години).

Мета заняття: детально ознайомитись та опанувати основні методи молекулярних досліджень, що використовуються для диференційної діагностики та прогнозування перебігу злоякісних новоутворень. Дослідити особливості експресії циркулюючих біомаркерів раку передміхурової залози.

Перелік питань для обговорення:

- Принципи виявлення пухлин-асоційованих антигенів методом імуноферментного аналізу (ІФА). Які типи зразків можуть використовуватися?
- Типи ІФА (прямий, непрямий, сендвіч, конкурентний).
- Особливості підготовки зразків крові та інших біологічних рідин до ІФА з метою виявлення онкомаркерів. Значення визначення рівня специфічних білків (онкомаркерів) методом ІФА для моніторингу перебігу онкологічних захворювань.
- Чинники, які впливають на якість ІФА.
- Основні типи полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (якісна, напівкількісна, в реальному часі, зворотньо-транскрипційна) та способи оцінки результатів.
- Контроль якості проходження ПЛР: позитивні та негативні контролі, їх роль та приклади.
- Особливості пробопідготовки біологічного матеріалу для виділення ДНК та РНК для проведення ПЛР-аналізу.
- Клінічне використання різних типів ПЛР для виявлення мутацій ключових онкогенів та прогнозу перебігу пухлинного процесу.
- Роль мультиплексних ІФА та ПЛР-панелей у комплексному аналізі біомаркерів для персоналізованої терапії в онкології.
- Перспективи використання рідкої біопсії (на основі ІФА та ПЛР) для малоінвазивного моніторингу перебігу пухлинного процесу та чутливості до терапії.

Протокол проведення ІФА (на прикладі IL-6 у хворих на рак передміхурової залози)

1. Дослідження проводиться за допомогою комерційних наборів IL-6 ELISA Kit (Elabscience, USA).
2. Сироватку крові хворих отримуємо шляхом центрифугування протягом 20 хвилин при 1500 обертах на хвилину. До проведення дослідження

матеріал зберігається за температури -20°С. Для дослідження не можна використовувати повторно заморожені зразки.

3. В лунки планшетів вносимо стандарти та зразки (сироватку крові) в кількості 100 мкл/лунку та інкубуємо 90 хвилин при 37°С.
4. Далі біотинільовані детекторні антитіла, специфічні до IL-6 людини та кон'югата авідин-пероксидази хріну (HRP) додаємо послідовно в кількості 100 мкл до кожної лунки планшета та інкубємо відповідно до інструкції виробника.
5. Проводимо відмивку вільних компонентів розчином для відмивки, передбаченим комерційним набором.
6. Вміст зв'язаних мічених антитіл вимірюємо завдяки ферментативній реакції при додаванні розчину хромогенного субстрату.
7. Розчин субстрату додаємо до кожної лунки у кількості 90 мкл та інкубований 15 хвилин при 37°С. Лунки в яких містився певна концентрація IL-6, біотинільоване детекторне антитіло та кон'югат авідин-HRP забарвлюються в блакитний колір.
8. Реакцію між субстратом і ферментом зупиняємо за допомогою додавання стоп-розчину у кількості 50 мкл/лунку.
9. Оптичну густину (ОГ) вимірюємо спектрофотометрично за допомогою аналізатора (Synergy™ HT, США) при довжині хвилі 450 нм. Значення ОГ є пропорційним концентрації IL-6 людини (Рис. 9).

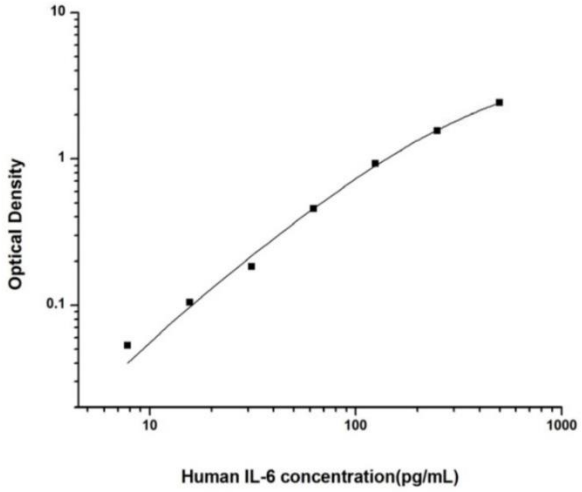


Рис. 9. Калібрувальна крива для визначення IL-6.

10. Рівні IL-6 в сироватці крові в кожному зразку визначаємо за допомогою калібрувальної кривої (Табл. 1.)

Таблиця 1.

Калібровка стандартної кривої для визначення IL-6

Концентрація (пг/мл)	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	0
ОГ	2,475	1,624	0,995	0,523	0,251	0,172	0,121	0,068
Відкоректована ОГ	2,407	1,556	0,927	0,455	0,183	0,104	0,053	-

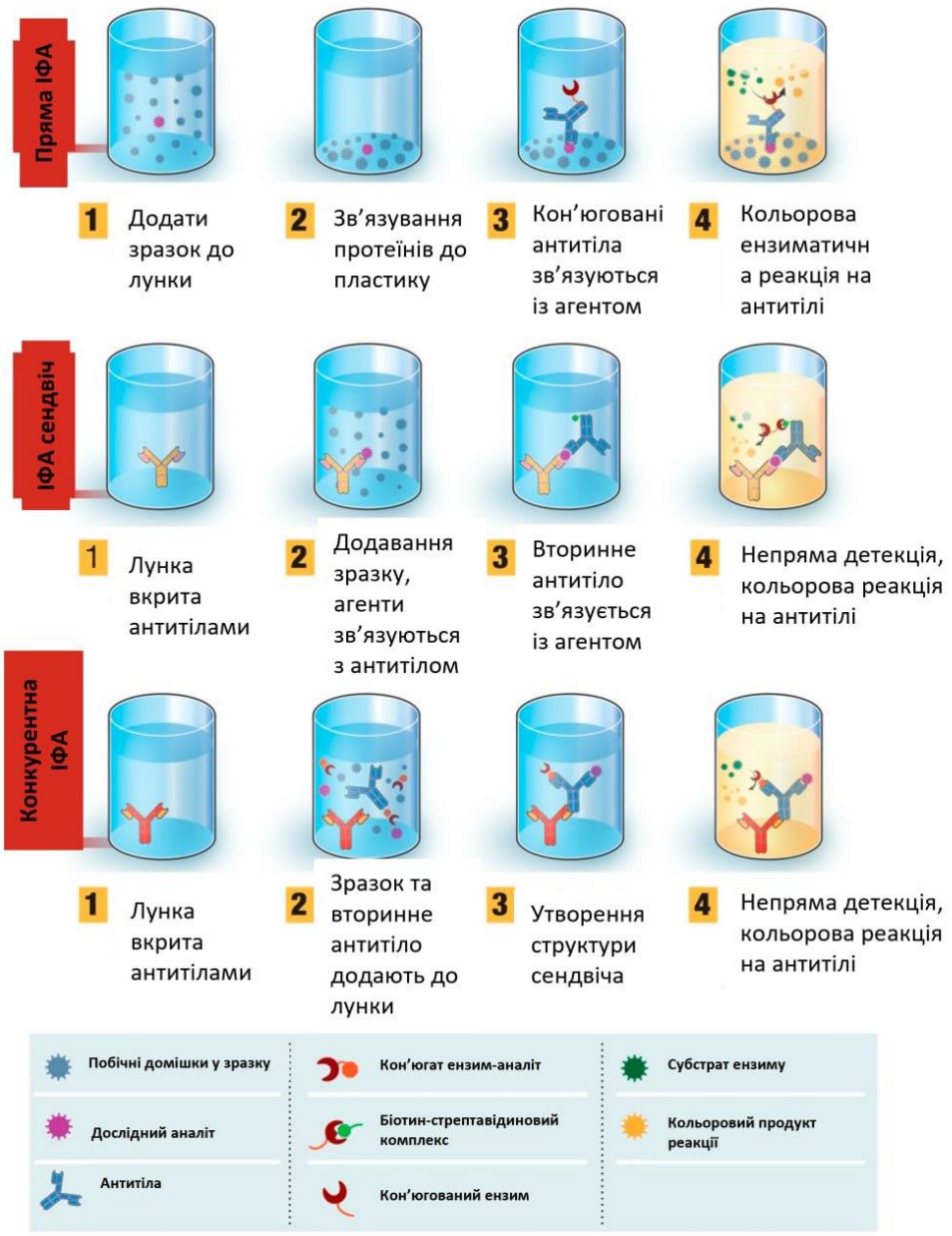


Рис. 10. Узагальнений протокол постановки ІФА залежно від типу реакцій

У таблиці 2 наведено середні рівні IL-6 у сироватці крові умовно здорових донорів та хворих на рак передміхурової залози, отримані при проведенні ІФА.

Таблиця 2

Рівні IL-6 у сироватці крові хворих на рак передміхурової залози, пкг/л

	Здорові донори	Хворі на РПЗ
Середнє значення	20,94	122,41
Стандартне відхилення	0,89	11,12

Протокол проведення зворотньо-транскрипційної ПЛР у реальному часі для визначення експресії мРНК у сироватці крові хворих на рак передміхурової залози

Виділення загальної РНК із клінічного матеріалу

Тотальну РНК із сироватки крові виділяємо за допомогою комерційного набору «NucleoSpin RNA» (MACHEREY-NAGEL, Німеччина) за протоколом виробника.

Кількість виділеної РНК визначаємо на спектрофотометрі "NanoDrop 2000c Spectrophotometer" (ThermoScientific, США).

Чистоту виділеної РНК контролюємо, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у трис-ЕДТА буфері та до проведення ПЛР зберігаємо при 20^{o}C.

Постановка зворотно-транскрипційної ПЛР у реальному часі

Першим етапом є синтез кДНК із мРНК. кДНК синтезуємо з 100 нг загальної РНК з використанням набору LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs, Inc., США) для зворотної транскрипції. В якості ендогенного контролю для визначення експресії мРНК використовуємо мРНК β-актину (ген *AKTB*).

Для проведення ПЛР необхідним кроком є конструювання праймерів досліджуваного гена. Для цього необхідно скористатися. На першому етапі отримують послідовність цільового гена з відкритих баз даних, таких як NCBI. Далі з використанням онлайн-інструментів, наприклад, Primer-BLAST або Primer3, підбирають відповідні праймери, дотримуючись основних критеріїв: довжина 18–24 нуклеотиди, температура плавлення (Tm) близько 58–62°C, відсутність комплементарності між праймерами (для уникнення димерів), та оптимальний GC-вміст (40–60%). Після генерації декількох пар праймерів обирають найоптимальніші за передбаченою специфічністю та ефективністю. Отримані праймери замовляють у спеціалізованих лабораторіях або компаніях для подальшого використання для проведення ПЛР аналізу (Таблиця 3.).

Таблиця 3.

Послідовності праймерів для визначення експресії мРНК

ген	праймер	
В-актин	Forvard	5'- TGTTACCAACTGGGACGACA-3'
	Reverce	5'- GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3'
IL-6	Forvard	5'- AGACAGCCACTCACCTCTTCAG -3'
	Reverce	5'- AGACAGCCACTCACCTCTTCAG -3'

ПЛР у реальному часі проводимо на системі виявлення QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System (ThermoScientific, USA) з використанням Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, США) за протоколом виробника (Рис.11).

Для кожної проби ставимо 3 повтори реакції.

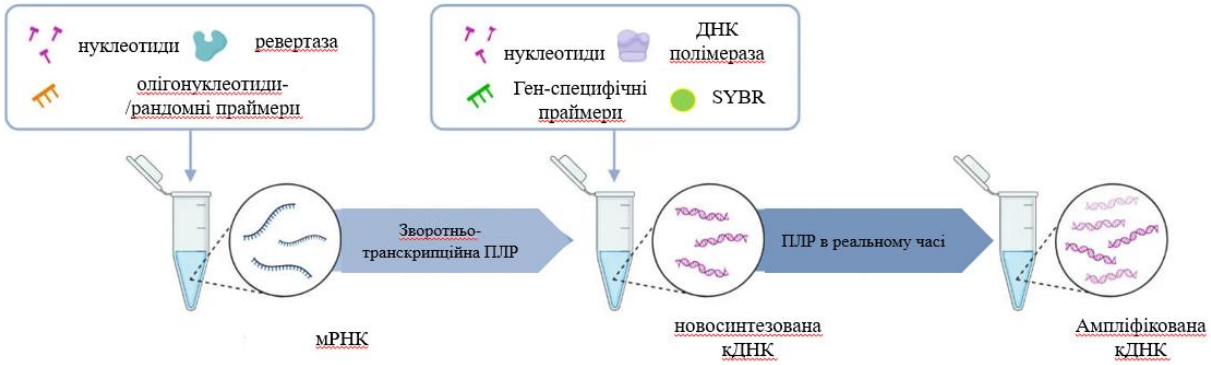


Рис. 11. Узагальнений протокол постановки ЗТ-ПЛР у реальному часі

Обрахунок результатів ПЛР

Пороговий цикл усереднюємо в усіх повторах кожного зразка. Відмінності експресії між досліджуваною мРНК відносно контролю обчислюємо за формулою $2^{-\Delta Ct}$, де Ct(мРНК) – середнє значення трьох лунок із праймерами до *IL6*, Ct(β-актин) - середнє значення трьох лунок із праймерами до β-актину, ΔCt=Ct(мРНК)-Ct(β-актин).

Результати визначення рівнів мРНК IL-6 в сироватці крові хворих на рак передміхурової залози

У таблиці 4 наведено середні рівні мРНК *IL6* у сироватці крові здорових донорів та хворих на рак передміхурової залози, отримані при проведенні ІФА.

Таблиця 4

Експресія мРНК IL-6 у сироватці крові

	Здорові донори	Хворі на РПЗ
Середнє значення	24,42	27,5
Стандартне відхилення	2,69	4,27

Питання для самоперевірки та самоконтролю:

11. Які основні типи ІФА вам відомі? Опишіть принцип кожного з них.
12. У чому полягає різниця між прямим та непрямим ІФА? Які переваги та недоліки кожного методу?
13. Що таке сендвіч-ІФА? Для виявлення яких типів аналітів він найчастіше використовується?

14. Які реагенти є ключовими в проведенні ІФА? Опишіть роль кожного з них (наприклад, антитіла, фермент, субстрат).
15. Що таке кон'югат в ІФА? Які ферменти найчастіше використовуються для кон'югації?
16. Що таке позитивний та негативний контроль в ІФА? Яке їхнє значення для інтерпретації результатів?
17. Як кількісно оцінюються результати ІФА? Які методи детекції використовуються?
18. Наведіть приклади застосування ІФА в медицині, біології та інших галузях.
19. Що таке ELISA? Чим цей термін відрізняється від загального поняття ІФА?
20. Який основний принцип лежить в основі методу ПЛР?
21. Назвіть три основні етапи кожного циклу ПЛР. Що відбувається на кожному з цих етапів (температура, дія ферменту)?
22. Які основні компоненти реакційної суміші для ПЛР? Опишіть роль кожного компонента (ДНК-матриця, праймери, ДНК-полімераза, дезоксинуклеотидтрифосфати, буфер).
23. Які термостабільні ДНК-полімерази найчастіше використовуються в ПЛР? Чому важлива термостабільність ферменту? Наведіть приклад такої полімерази.
24. У чому полягає принцип зворотної транскрипції в ЗТ-ПЛР? Який фермент використовується на цьому етапі? Для чого застосовується ЗТ-ПЛР?
25. Що таке кількісна ПЛР (кПЛР) або ПЛР в реальному часі? Як відбувається детекція ампліфікованого продукту в кПЛР? Які типи барвників або зондів використовуються?
26. Які переваги кількісної ПЛР порівняно зі звичайною ПЛР? Яку інформацію можна отримати за допомогою кПЛР?
27. Які існують методи детекції продуктів ПЛР після завершення реакції (end-point detection)? Який метод є найбільш поширеним?
28. Які фактори можуть призвести до хибнопозитивних або хибнонегативних результатів ПЛР? Як можна мінімізувати ризик їх виникнення?
29. Наведіть приклади застосування ПЛР у діагностиці захворювань, криміналістиці, наукових дослідженнях.

Рекомендовані джерела:

1. "What is an ELISA?". R&D Systems. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/.

2. Терещенко ОВ, Рябінін СВ. (2009) Метод імуноферментного аналізу та його використання у практиці. Міжвідомчий науковий тематичний збірник «Птахівництво», 63, 12-15.
3. Lengfeld J, Zhang H., Stoesz, S., Murali, R., Pass, F., Greene, M. I., ... & Grover, P. (2021). Challenges in detection of serum oncoprotein: relevance to breast cancer diagnostics. Breast Cancer: Targets and Therapy, 575-593.
4. Vordermark D, Said HM, Katzer A, Kuhnt T, Hänsgen G, Dunst J, Bache M. (2006). Plasma osteopontin levels in patients with head and neck cancer and cervix cancer are critically dependent on the choice of ELISA system. BMC cancer, 6, 1-6.
5. Štefatić D, Riederer M, Balić M, Dandachi N, Stanzer S, Janesch B, ... & Bauernhofer T. (2008). Optimization of diagnostic ELISA-based tests for the detection of auto-antibodies against tumor antigens in human serum. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 8(3), 245.
6. Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. (2004). Serum levels of IL-6 and TNF-α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. British journal of cancer, 90(12), 2312-2316.
7. Schmittgen TD, Livak KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature protocols, 3(6), 1101-1108.
8. Yuan JS, Wang D, Stewart Jr CN. (2008). Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification (Vol. 3, No. 1, pp. 112-123). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
9. Bernard PS, Wittwer CT. (2002). Real-time PCR technology for cancer diagnostics. Clinical chemistry, 48(8), 1178-1185.
10. Schostak M, Krause H, Miller K, Schrader M, Weikert S, Christoph F, ... & Kollermann J. (2006). Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. BMC urology, 6, 1-7.
11. Zhang L, Wang CY, Yang R, Shi J, Fu R, Chen L, ... & Zhang J. (2008, November). Real-time quantitative RT-PCR assay of prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in peripheral blood for detection of prostate cancer micrometastasis. In Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 26(6), 634-640).
12. "PCR". Genetic Science Learning Center, University of Utah. https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/