

**UNIVERZITA KARLOVA
FAKULTA FARMACEUTICKÁ**

Katedra biologických a lékařských věd



Imunohistologická charakteristika nádorů prostaty
An immunohistologic characterization of human prostate cancer
(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce : Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry : Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové, květen 2008

Kateřina Kotlabová

Děkuji Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému za odborné vedení a poskytnutí informací a studijních materiálů, jež jsem využila při sestavování této diplomové práce.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

O B S A H

strana

SOUHRN	1
ABSTRACT	2
1. ÚVOD	3
2. PROSTATA	5
2.1. Základní informace	6
2.2. Funkce	7
2.3. Stavba	7
3. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ PROSTATY	9
3.1. Adenokarcinom prostaty	11
3.1.1. Prostatický duktální adenokarcinom	13
3.1.2. Adenokarcinom s neuroendokrinními buňkami	14
3.1.3. Mucinózní adenokarcinom	15
3.1.4. Basocelulární adenokarcinom	15
3.1.5. Adenokarcinom z prstenčitých buněk	16
3.1.6. Sarkomatoidní (metaplastický) karcinom	17
3.1.7. Karcinom podobný lymfoepiteliomu	17
3.1.8. Neuroendokrinní karcinom	17
3.1.9. Dlaždicobuněčný a adenosquamózní karcinom	18
3.1.10. Adenokarcinom s onkocytárními rysy	18
3.1.11. Komedokarcinom	18
3.2. Uroteliální karcinom	19

3.3. Fyloidní tumor	19
3.4. Další primární nádory prostaty	20
4. HISTOLOGICKÉ METODY	
V DIAGNOSTICE KARCINOMU PROSTATY	21
4.1. Histologie – historie oboru	22
4.2. Příprava vzorku pro histologické vyšetření	23
4.2.1. Odběr materiálu	23
4.2.2. Fixace	23
4.2.3. Zalévání	25
4.2.4. Krájení	27
4.2.5. Přehledné barvení hematoxylinem-eosinem	27
5. IMUNOHISTOLOGICKÉ (IMUNOHISTOCHEMICKÉ, IMUNOCYTOLO- GICKÉ) METODY V DIAGNOSTICE KARCINOMU PROSTATY	30
5.1. Základní pojmy v imunohistochemii	31
5.1.1. Antigen	31
5.1.2. Protilátka	32
5.2. Imunohistochemické metody detekce antigenů	33
5.2.1. Zpracování tkání	33
5.2.2. Markery	34
5.2.3. Metoda přímá	36
5.2.4. Metoda nepřímá	36
5.2.5. Metoda amplifikační	36
5.2.6. Vizualizace konjugovaných enzymů	37
5.3. Imunohistologické markery karcinomu prostaty	38
5.3.1. Prostatická kyselá fosfatáza (PAPH)	38
5.3.2. Prostatický specifický antigen (PSA)	40
5.3.3. Prostatický specifický membránový antigen (PSMA)	43

5.3.4. Prostate stem cell antigen (PSCA)	45
5.3.5. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP).....	47
5.3.6. Prostatic inhibin peptide (PIP)	48
5.3.7. Protein p63	49
5.3.8. High-molecular-weight cytokeratins (HMW-CK)	50
5.3.9. α -methylacyl-CoA racemáza (AMACR)	51
5.3.10. Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP 3)	54
5.3.11. Klasické markery neuroendokrinních buněk	55
5.3.12. Claudin-1	58
5.3.13. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)	59
5.3.14. Interleukin 6 a receptory pro interleukin 6	61
5.3.15. S100 proteiny – S100A8, S100A9	63
5.3.16. Prostate-specific human kallikrein 2 (hK2)	64
5.3.17. E-kadherin	65
5.3.18. α , β , γ -kateniny	66
5.3.19. δ -katenin	68
5.2.20. p120 ^{ctn}	70
6. ROZLIŠENÍ KARCINOMU PROSTATY A	
BENIGNÍ HYPERPLÁZIE PROSTATY	71
6.1. Stručná charakteristika benigní hyperplázie prostaty (BHP)	72
6.2. Doporučený postup vyšetření v diagnostice onemocnění prostaty	73
6.2.1. Stanovení sérové koncentrace PSA	76
6.2.2. Histologické vyšetření vzorků prostatické tkáně	77
6.2.3. Imunohistochemie v diferenciální diagnostice karcinomu prostaty	78
7. KLINICKÉ A IMUNOHISTOLOGICKÁ ANALÝZA	
VZORKŮ TKÁNÍ	82
7.1. Příprava a zpracování vzorků prostatické tkáně	83

7.2. Stanovení gradingu nádorového ložiska	84
7.3. Stanovení diagnózy pacientů	85
8. DISKUZE	89
9. ZÁVĚR	94
SEZNAM ZKRATEK	96
SEZNAM LITERATURY	97

S O U H R N

Rakovina prostaty se v posledních třech letech dostala na první místo žebříčku v počtu nově hlášených nádorových onemocnění v mužské populaci. Ačkoli jde ve většině případů o poměrně dobře léčitelnou afekci, je výzkum nových metod a postupů v diagnostice karcinomu prostaty velmi intenzivní, neboť stěžejním bodem úspěšné léčby je záchyt časných (kurabilních) stádií onemocnění. Tato diplomová práce poskytuje ucelený přehled histologických a imunohistologických metod, které je možné použít v diagnostice karcinomu prostaty.

Histologické vyšetření na základě zhodnocení tvaru buněk a charakteristických buněčných struktur umožňuje vynést soud o přítomnosti či nepřítomnosti nádorových změn, což má vysokou diagnostickou i prognostickou hodnotu. V případech, kde klasická histologická analýzy selhává, jsou klinickými pracovníky využívány speciální metody imunohistochemické.

Imunohistochemie je založena na reakci specifické protilátky a antigenu, který má v buňce funkci receptoru, enzymu nebo transkripčního faktoru, a jehož přítomnost (nepřítomnost) či intenzita jeho exprese jsou charakteristické pro maligní nebo benigní tkáň, která je vyšetřována. Náplní této práce je zejména přehledný výčet používaných imunohistochemických markerů i s jejich stručnou charakteristikou a zhodnocení jejich využitelnosti a výpovědní hodnoty v diagnostice karcinomu prostaty.

Pozornost je rovněž věnována praktickému využití imunohistochemie v případech, kdy je klasickými postupy nemožné rozlišit benigní hyperplázii a karcinom prostaty.

ABSTRACT

In the last three years prostatic carcinoma reaches the first place in the ladder of number of new reported tumour diseases in male population. Although in most cases it is a relatively well curable affection, the research of new methods and procedures in the prostatic carcinoma diagnostics is very intensive, because the main point of successful therapy is the disclosure of early (curable) stages of disease. This graduate work gives the integral summary of histological and immunohistochemical methods, which are possible to be used in the prostatic carcinoma diagnostics.

Histological examination based on the appraisal of the cell shape and characteristic cell structures permits to pass a judgement over the presence or absence of tumour changes, which has a high diagnostic and prognostic value. In the cases where the classic histological analysis failed, the special immunohistochemical methods are used by the clinical workers.

Immunohistochemistry is based on the reaction of specific antibody and antigen, which has a receptor, enzymatic or transcription factor function in the cell and its presence (absence) or the expression intensity is characteristic for malignant or benign tissue which is examined. The content of this work is primarily synoptic enumeration of using immunohistochemical markers with their utility and notice value in prostate carcinoma diagnostics.

The attention is also given to the practical use of immunohistochemistry in cases when it is impossible to distinguish benign hyperplasia and tumour of the prostate by classic methods.

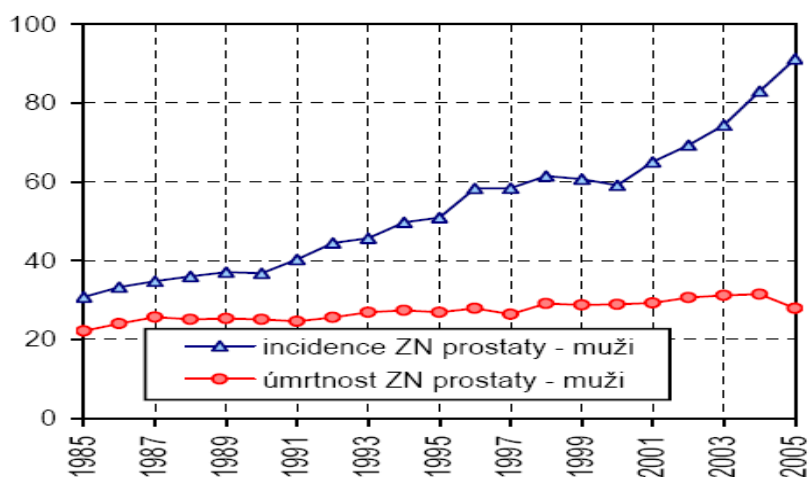
1. ÚVOD

V roce 2005 bylo do Národního onkologického registru ČR nově nahlášeno celkem 71 449 případů zhoubných novotvarů a novotvarů in situ, z toho 36 823 u mužů a 34 628 případů u žen.

Zhoubný nádor prostaty byl v roce 2005 nejčastěji diagnostikovaným onkologickým onemocněním u mužů (Tab. 1) , neboť počet nově hlášených případů (4 846) byl v tomto roce poprvé vyšší než počet nových případů karcinomu plic (4 632). Rapidní nárůst incidence nádoru prostaty je v ČR stejně jako ve světě pozorován od začátku 90. let, po roce 2000 nárůst ještě akceleroval. Vyšší výskyt nádorů prostaty je vysvětlován souvislostí se stárnutím populace a zejména se zlepšením a dostupností diagnostických metod. Zatímco úroveň incidence novotvarů prostaty v dlouhodobém pohledu roste, úmrtnost na tento typ nádoru vykazuje mírně klesající trend (Obr. 1) (64).

Tab. 1 Počet nově zjištěných případů zhoubných novotvarů (ČR, 2005)

novotvar	absolutní počet onemocnění	počet onemocnění na 100 000 mužů
prostata	4 846	97,1
plice, průdušnice	4 632	92,8
tlusté střevo	2 622	52,5
konečník	2 124	42,5
močový měchýř	1 880	37,6
ledvina	1 821	36,5
mízní a krvetvorná tkáň	1 602	32,0



Obr. 1 Graf vývoje incidence a úmrtnosti na zhoubný novotvar prostaty na 100 000 mužů v letech 1985-2005 (64)

2. PROSTATA

2.1. Základní informace

Prostata nebo také předstojná žláza je exokrinní orgán, přídatná pohlavní žláza, která je umístěna pod močovým měchýřem a jako prstenec obkružuje močovou trubici. Je vklíněna do prostoru mezi stydkou kostí a konečníkem, po jehož přední stěně probíhají některé důležité cévy a nervy zajišťující například naplnění corpora cavernosa krví při erekci. Z tohoto důvodu mohou mít hyperplastické i neoplastické změny prostatické tkáně vliv na funkci střev a sexuální a močové funkce pacienta.

Za normálních okolností váží prostata u zdravého jedince asi 20 až 25g (má velikost vlašského ořechu, přibližně 4x3x3cm). Je tvořena souborem 30-50 větvených tuboalveolárních žlázek, jejichž vývody se otevírají do prostatické části uretry. Žlázky jsou vystlány jednovrstevným nízcí cylindrickým epitelem. Prostor mezi žlázkami (stroma) je vyplněn vazivem a buňkami hladké svaloviny. Z hlediska rozložení těchto jednotlivých komponent je stroma soustředěno v blízkosti močové trubice, která žlázou prochází, a exokrinní žlázky se nacházejí převážně na periferii prostaty.

Na základě biomedicínského zhodnocení lze prostatické žlázky rozdělit do dvou základních skupin. Jedna, slizniční žlázky, je umístěna v přední a laterální části uretry bezprostředně pod její epitelovou výstelkou. Druhá skupina, submukózní a hlavní žlázky, zaujímají zbytek žlázy.

V lumen prostatických žlázek se poměrně často vyskytují malá sférická tělíska glykoproteinové povahy o průměru 0,2 – 2,0mm, která často kalcifikují. Jsou označována jako prostatické konkrementy neboli corpora amylacea. Jejich význam je prozatím nejasný, jisté však je, že jejich počet s věkem narůstá.

K svému růstu a správné funkci potřebuje prostata mužské pohlavní hormony – androgeny, z nich pak především testosteron. Testosteron vázaný na krevní bílkoviny je štěpen 5-alfa reduktázou na dihydrotestosteron, který se váže na cytoplazmatický specifický androgenní receptor. Dochází k transkripci androgen-dependentních genů a tvorbě specifických bílkovin, které působí na stroma i žlázové buňky a udržují prostatu v činnosti. Při nedostatku hormonů žláza involuje.

Z anatomického hlediska se prostata dělí na pět žlázových laloků, které jsou zřetelné pouze během vývoje a v dospělosti jsou spojeny v kompaktní žlázu. Na povrchu prostaty jsou patrné dva laterální laloky (levý a pravý) a dále zadní lalok. Střední lalok leží za uretrou mezi oběma ductus ejaculatorii, přední lalok, tvořený převážně vazivem a svalovinou, před uretrou.

2.2. Funkce

Prostatické žlázy vylučují sekret, který je v prostatě skladován a během ejakulace se mísí se spermiemi a tvoří 10-30% ejakulátu. Samotný výměšek je bezbarvá nebo slabě opaleskující tekutina, se slabě kyselou reakcí (pH 6,4). Každá ze složek sekretu nějakým způsobem umožňuje nebo zvyšuje šanci na oplodnění. Zinek ovlivňuje metabolismus testosteronu v prostatě, mimo to se v komplexu přikládá na buněčnou membránu spermií. Kyselina citrónová ve formě citrátů má funkci pufru, prostaglandiny stimulují svalovinu dělohy a přispívají tím k transportu spermií, spermin a spermidin ovlivňuje pohyblivost spermií a jejich schopnost oplodnit vajíčko, proteázy a prostatický specifický antigen udržují vhodnou konzistenci ejakulátu.

2.3. Stavba

Žláza vzniká u mužského plodu v 9. týdnu nitroděložního vývoje modifikací stěny močového měchýře. Materiálem pro vznik prostaty je močová trubice, Wolffův vývod a okolní mezenchym.

Prostata je obklopena fibroelastickým pouzdrém, bohatým na hladkou svalovinu a opředeným sítí cév a nervů. Septa vznikající v tomto pouzdru se zanořují do nitra prostaty a rozdělují ji na laloky, které jsou u dospělých mužů málo zřetelné; rozlišitelné jsou prakticky jen dva laloky, levý a pravý. Žláza má tvar komolého, předozadně mírně oploštělého kužele, obráceného bazí k močovému měchýři a apexem ke stydké kosti.

V urologické praxi se pro charakterizaci jednotlivých částí prostaty používá její dělení podle McNeala na tři zóny (Obr. 2) :

1) Periferní zóna

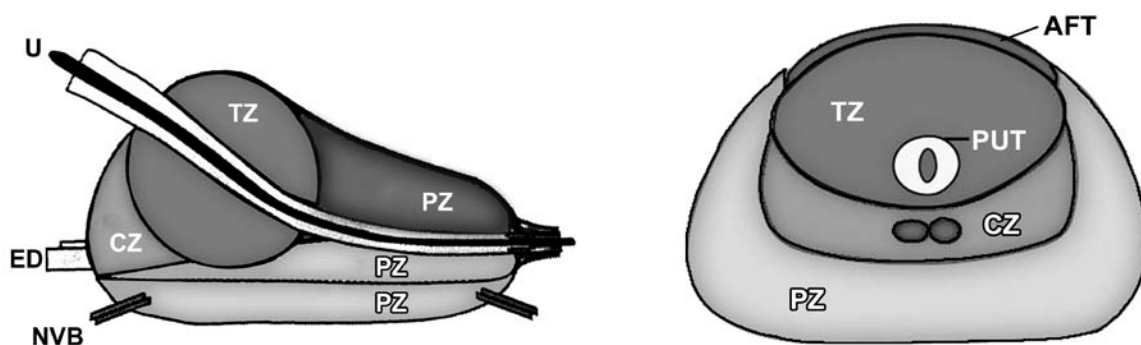
Zahrnuje tu část prostaty, která obklopuje distální část močové trubice, epitel žlázek pochází z urogenitálního sinu. Představuje největší část (65%) prostaty a je rovněž oblastí s největším procentem karcinomů prostaty (70%).

2) Centrální (vnitřní) zóna

Nachází se kolem ejakulačních vývodů, epitel žlázek pochází z urogenitálního sinu i Wollfova vývodu. Tvoří 25% objemu prostaty a je místem vzniku čtvrtiny všech karcinomů prostaty.

3) Tranzitorní (přechodná) zóna

Obklopuje proximální část močové trubice a představuje 5% objemu prostaty. Ve vyšším věku se pravidelně stává místem vzniku benigní hyperplazie prostaty.



Obr. 2 Podélný a příčný řez prostatou

U - uretra; PZ - periferní zóna; CZ - centrální zóna; TZ - tranzitorní zóna; NVB - neurovaskulární svazek; ED - ductus ejaculatorii; AFT - přední fibromuskulární tkáň; PUT - periuretrální tkáň

3. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ PROSTATY

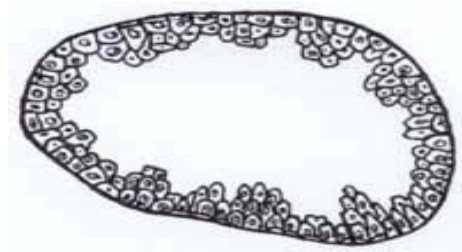
Rakovina prostaty se vyvíjí na základě nahromadění genetických změn, které vedou k vzestupu buněčné proliferace na úkor přirozené buněčné smrti, dochází k zástavě buněčné diferenciaci a buňky získávají schopnost invazivního růstu a šíření do vzdálených míst.

Histologické změny v prostatické tkáni je možno detekovat u mužů již od 20. roku života, typické jsou pro 3. a 4. dekádu, což dokazuje, že rozvoj onemocnění je víceúrovňovým procesem. Na jeho počátku stojí genetické změny, zahrnující bodové mutace, delece, chromozomální přestavby a metylaci DNA, které způsobí ztrátu ochrany před působením karcinogenů, změnu androgenových signálních drah a změny exprese řady regulačních genů, což vyústí uvnitř prostatických ductů v rozvoj premaligní afekce označované jako prostatická intraepiteliální neoplázie (PIN).

Rozeznáváme dvě základní kategorie PIN : low-grade, která se objevuje v mladších věkových skupinách, a high-grade, jejíž výskyt vzrůstá společně s věkem. Některé klinicko-patologické studie udávají více než desetiletou periodu mezi přítomností low-grade PIN a vznikem invazivního karcinomu.

Jedná se o prekancerózu, která je lokalizována především v periférii prostaty, kde se vyskytuje jednak samostatně (ve 43%) a dále pak, a to mnohem častěji (v 82%), v blízkosti invazivního adenokarcinomu. PIN je charakterizována intraluminální proliferací sekretorických buněk s cytologickými atypiami. Dle architektury ložiska lze vymezit 4 základní varianty PIN :

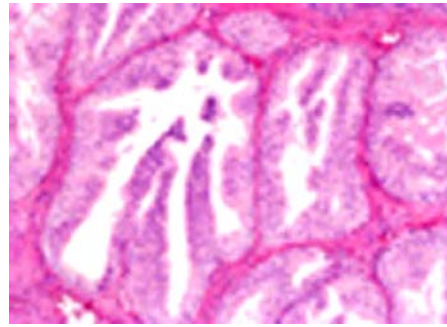
- a) trsovité (tufting) PIN (Obr. 3)
- b) plochý typ PIN (Obr. 4)
- c) mikropapilární PIN (Obr. 5)
- d) kribriformní PIN (Obr. 6)



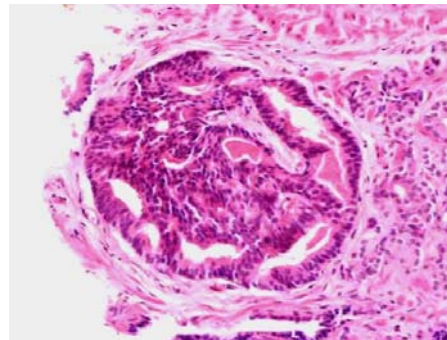
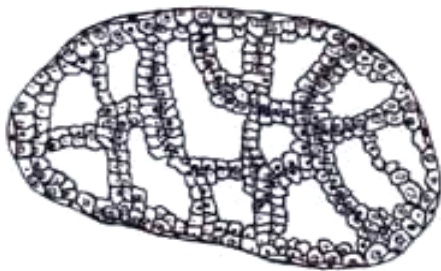
Obr. 3 PIN - trsovitý typ růstu (65)



Obr. 4 PIN - plochý typ růstu (65)



Obr. 5 PIN - mikropapilární typ růstu (65)



Obr. 6 PIN - kribriformní typ růstu (65)

Hlavním diagnostickým znakem pro stanovení PIN je vedle charakteristického vzhledu ložiska i tvar jader. Jádra jsou zvětšená, hyperchromatická s nepravidelným chromatinem, parachromatinovým projasněním, s nepravidelnou jadernou membránou a typická jsou rovněž zvětšená jádérka, která mohou být nepravidelná a vyskytují se i v hojnějším počtu. V cytoplazmě se může nacházet amorfni eosinofilní sekrece, eosinofilní krystaloidy, corpora amylacea a vzácně lipofuscin, výjimkou není ani přítomnost mucinu v lumen žlázek.

Nejtypičtějším a nejčastějším nádorovým onemocněním prostaty, které se vyvine na základě PIN, je adenokarcinom, který představuje více než 95% všech případů maligních prostatických afekcí.

3.1. Adenokarcinom prostaty

Rakovina prostaty (adenokarcinom prostaty) je v současné době 3. nejčastější příčinou úmrtí muže na zhoubný nádor v ČR a lze očekávat, že se stárnutím mužské populace se

mohou tyto trendy zhoršovat. V České republice narostl výskyt karcinomu prostaty z 22,51/100 000 mužů v roce 1977 na 86,11/100 000 mužů v roce 2004, úmrtnost na toto onemocnění se zvýšila z 5,25/100 000 mužů v roce 1977 na 29,07/100 000 mužů v roce 2004. Adenokarcinom prostaty je velmi vzácný ve věku do 40 let, poté jeho incidence pozvolna stoupá. U mužů starších 50 let se odhaduje prevalence karcinomu mezi 30 a 50%, u mužů ve věku 70-80 let je pak okultní ložisko dobře diferencovaného karcinomu prostaty přítomno v 70% případů.

Původ rakoviny prostaty není dosud zcela objasněn, na rozvoji se však spolupodílí celá řada rizikových faktorů jako věk, rasa, pozitivní rodinná anamnéza, dieta (strava bohatá na tuky), přítomnost kadmia či sexuálně přenosné choroby.

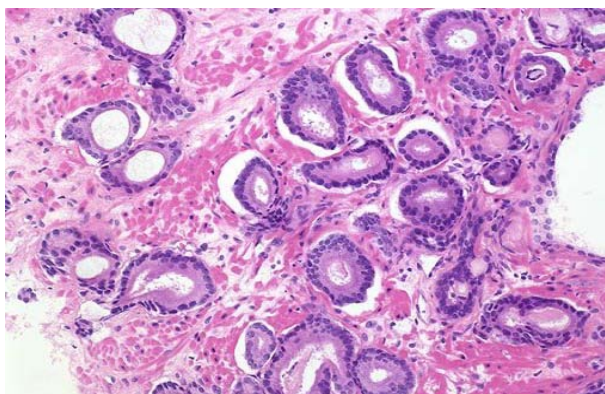
Onemocnění lze úspěšně léčit (rektální operací nebo ozářením) tehdy, pokud je diagnostikováno včas, kdy nádor ještě nepřestoupil hranice prostatické žlázy. Je však třeba zdůraznit, že nádor v tomto stádiu, nevyvolává zpravidla žádné varovné příznaky. Proto více než 2/3 nemocných přicházejí poprvé k lékaři až tehdy, když se u nich vyskytne některý z klinických příznaků. Onemocnění však v této době dosáhlo vyššího stádia, jehož léčba je zdoluhavá, obtížná a s nejistým výsledkem. Největší význam má dostatečná informovanost a systém preventivních prohlídek a vyšetření (krevní test PSA, pohmatové vyšetření prostaty), které na toto onemocnění mohou upozornit včas.

Klinické příznaky adenokarcinomu prostaty nejsou nikterak specifické a úzce souvisejí se stádiem choroby. Vzhledem k tomu, že ve většině případů se rakovina vyvíjí v periferních částech prostaty, nejsou zpočátku zřejmé ani obstrukční příznaky. Svým růstem však nádor může způsobovat obtíže s defekací, obtížnou nebo bolestivou stolicí. Dalším prorůstáním do okolních tkání způsobuje bolest na hrázi a v konečníku.

V pozdějších stádiích onemocnění jsou močové obtíže časté, výjimkou není ani příměs krve v moči. Prorůstáním karcinomu prostaty do močového měchýře nebo útlakem močovodů vzniká překážka v odtoku moče z horních močových cest s následným městnáním moče v močovodech a ledvinách. Konečným důsledkem může být selhání funkce ledvin.

U pokročilých stádií choroby je klinický obraz kromě močových obtíží dán i přítomností metastáz a jejich lokalizací (nejčastěji v plicích, kostech).

Histologický vzhled klasického acinárního adenokarcinomu prostaty (Obr. 7) je tvořen malými nahloučenými žlázkami, které jsou relativně uniformní, proto je vždy nutné věnovat zvýšenou pozornost zejména žlázkám, které se výrazně liší od svého okolí. Podezřelé jsou zejména žlázy infiltrující mezi jednoznačně benigní žlázy, dále glandulární struktury tvořící pruhy, splývající ve větší celky či naopak jednotlivé buňky mezi normální prostatickou tkání. Vždy je vysoce průkazné, pokud se nepodaří odhalit barvicími technikami vrstvu bazálních buněk. Z cytologických charakteristik je nutné věnovat pozornost buňkám s jadernou polymorfií, nápadnými jádérky a mitózami. Pro diagnózu karcinomu rovněž svědčí nález buněk s výrazně odlišnou cytoplazmou než v okolních benigních žlázkách, a dále i buněk s amfofilní a vodojasnou cytoplazmou. V lumen nádorových žlázek je možno rozeznat modravý hlen, jemně vločkovitý růžový materiál, krystaloidy či nekrotickou hmotu.



Obr. 7 Adenokarcinom prostaty, přehledné barvení hematoxylinem-eosinem (65)

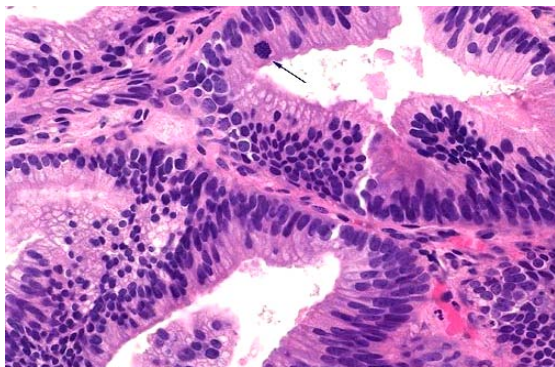
Dle typu buněk, díky jejichž malformaci a proliferativnímu růstu dochází k tvorbě adenokarcinomu prostaty, rozlišujeme celou řadu variant tohoto onemocnění.

3.1.1. Prostatický duktální adenokarcinom

Prostatický duktální adenokarcinom tvoří 0,2-0,8% všech adenokarcinomů prostaty. Častěji se nachází u starších mužů, průměrný věk je 65 let. Příznakem onemocnění bývá nejčastěji hematúrie a močová obstrukce či nucení na močení, retence moči je vzácná. U pacientů v počátečním stádiu bývají hladiny PSA v krvi normální, u pokročilejších případů s kostními metastázemi jsou hladiny PSA a PAPH zvýšené. Nádor je obvykle lokalizován

v prostatické uretře a velkých periuretrálních vývodech v oblasti verum montanum. Prognóza tohoto typu adenokarcinomu je obvykle špatná, neboť bývá diagnostikován v pokročilejších stádiích (při hodnocení dle Gleasona se udává typ 4 a 5).

Histologický obraz je charakteristický vysokou mitotickou aktivitou a jadernou polymorfií (Obr. 8), buňky jsou výrazně protáhlé, cylindrické. Imunohistochemicky je nádor pozitivní při barvení s anti-PSA a anti-PAPH protilátkou.

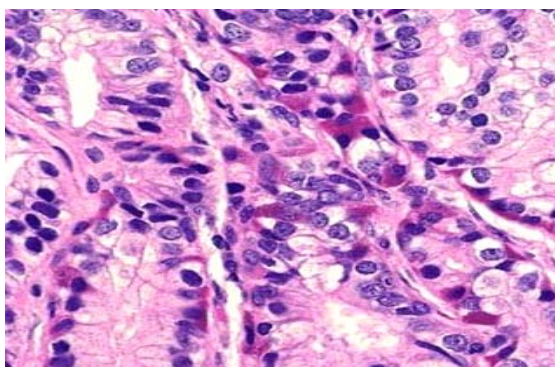


Obr. 8 Prostatický duktální adenokarcinom, šipka označuje mitotické jádro (65)

3.1.2. Adenokarcinom s neuroendokrinními buňkami

Jedná se o typ prostatického adenokarcinomu, který je charakterizován přítomností značného množství velkých buněk s eosinofilními granuly (Obr. 9), které svým vzhledem připomínají Penethovy buňky. Prognóza tohoto tumor je dobrá, komplikací může být nedostatečná reakce na hormonální terapii.

Imunohistochemicky prokazuje tento nádor pozitivní reakce se synaptophysinem, neuron specifickou enolázou (NSE), serotoninem, PSA a PAPH.



Obr. 9 Adenokarcinom s neuroendokrinními buňkami s eosinofilní granulací (65)

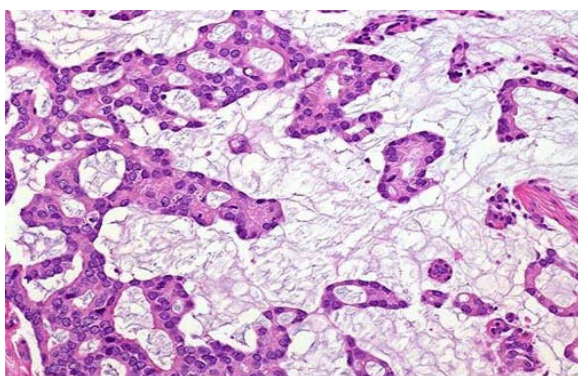
3.1.3. Mucinózní adenokarcinom

Mucin je možno prokázat u velkého počtu případů adenokarcinomu prostaty, a proto pro diagnózu mucinózního adenokarcinomu je nezbytné, aby byla splněna následující 3 kritéria :

- a) minimálně 25% nádorové hmoty musí tvořit nádorové buňky v mucinózním stromatu
- b) žlázky obsahující pouze intraluminární mucin se nesmí diagnostikovat jako mucinózní adenokarcinom
- c) je nutné vyloučit extraprostatický původ tumoru.

Prognóza je obdobná, jako u klasického acinárního adenokarcinomu, v případě pokročilejších stádií jsou metastázy nalézány především v kostech.

Mucinózní adenokarcinom (Obr. 10) je tvořen objemnými kolekcemi hlenu, ve kterých jsou přítomny shluky nádorových buněk. Prostatický hlen reaguje pozitivně při barvení Alcianovou modří a mucikarminem, nádorové buňky vykazují přítomnost PSA a PAPH.



Obr. 10 Mucinózní adenokarcinom (65)

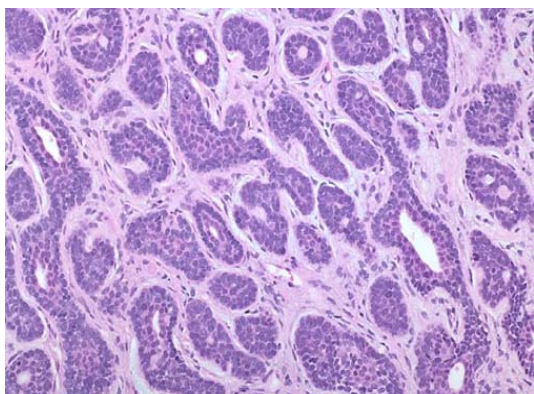
3.1.4. Basocelulární adenokarcinom

Klinickými příznaky se onemocnění neliší od běžného rámce adenokarcinomu prostaty, výjimkou je nezměněná hladina sérového PSA. Vyskytuje se u pacientů v poměrně širokém věkovém rozpětí od 28 do 72 let.

Rozlišujeme dva základní typy této afekce, a to adenoidně cystický typ tvořený nepravidelnými shluky basoloidních buněk, mezi kterými jsou přítomny kruhovitě prostory

často vyplněné hlenem, a basaloidní typ tvořený alveoly bazálních buněk na okraji s palisádováním. Oba typy růstu se mohou vyskytovat společně a vytvářet vzájemné kombinace (Obr. 11). Častou součástí bývá dlaždicobuněčná či sebaceózní metaplázie nádorové tkáně, která může nekrotizovat.

Imunohistochemicky reagují buňky tohoto tumoru s vysokomolekulárními cytokeratiny (K903, 34b-E12, ...). Vzácně mohou některé buňky reagovat s PSA a PAPH, velmi vzácně pak s chromograninem.



Obr. 11 Kombinace adenoidně cystického a basaloidního typu basocelulárního adenokarcinomu (65)

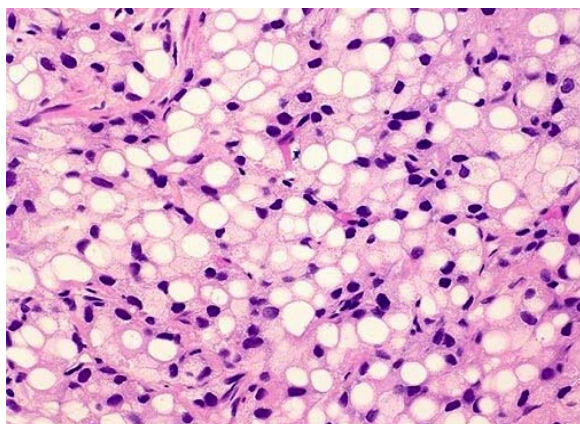
Diferenciálně diagnosticky je nutné odlišit především atypickou adenomatózní hyperplázií a sklerozující adenózu. Adenomatózní hyperplázie má méně nápadnou vrstvu bazálních buněk a tato vrstva není celistvá. Slerozující adenóza nemá přítomna vlákna hladké svaloviny ve stromatu. Pro diagnózu basocelulárního karcinomu je nezbytné prokázat jednoznačnou invazi do stromatu.

3.1.5. Adenokarcinom z prstenčitých buněk

Jedná se o velmi vzácný typ tumoru (popsáno bylo méně než 25 případů), který se vyskytuje u starších pacientů (6.-9. dekáda). Vzhledem k závažnosti je prognóza tumoru velmi špatná.

Pro histologickou diagnózu karcinomu z prstenčitých buněk (Obr. 12) je nutné prokázat tuto komponentu minimálně v 25%-50% plochy nádoru, neboť skupiny prstenčitých buněk bývají prokazovány i v normálních acinárních adenokarcinomech.

Imunohistochemicky je možno prokázat PSA a PAPH pozitivní buňky, nicméně tento test není zcela 100% spolehlivý.



Obr. 12 Karcinom z prstenčitých buněk (65)

3.1.6. Sarkomatoidní (metaplastický) karcinom

Sarkomatoidní karcinom se vyskytuje u starších mužů pod příznakem urinární obstrukce. Nejčastěji jde o špatně diferencovaný, invazivně rostoucí karcinom, který má velmi špatnou prognózu.

Histologicky se jedná většinou o adenokarcinom kombinovaný s osteosarkomovou či leiomyosarkomovou komponentou. Imunohistochemicky lze v epitelové složce prokázat cytokeratiny a PSA, sarkomatoidní komponenta obvykle reaguje s vimentinem či desminem.

3.1.7. Karcinom podobný lymfoepiteliomu

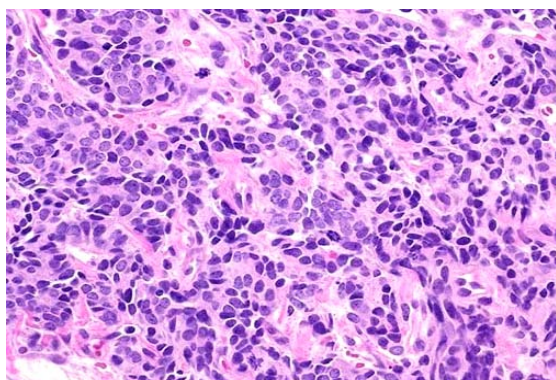
Svojí stavbou odpovídá lymfoepiteliomu nasofaryngeální oblasti; v případě prostaty byl popsán jediný případ, kdy byl zaznamenán výskyt lymfoepiteliální tkáně kombinované s acinárním adenokarcinomem, přičemž obě struktury zůstaly oddělené a vzájemně neprorůstaly.

3.1.8. Neuroendokrinní karcinom (malobuněčný karcinom, karcinoid)

U tohoto onemocnění bývají přítomny paraneoplastické syndromy – nejčastěji Cushingův syndrom, maligní hyperkalcémie, Eatonův-Lambertův syndrom či příznaky

vyplývající z porušené sekrece antidiuretického hormonu. Biologické chování je poměrně nepříznivé, zejména u malobuněčného karcinomu.

Histologicky jde o nádory (Obr. 13), které jsou morfologicky prakticky identické s malobuněčným karcinomem plic či karcinoidem. Imunohistochemicky bývají prokazovány neurosekreční markery, PSA a PAPH.



Obr. 13 Neuroendokrinní karcinom (65)

3.1.9. Dlaždicobuněčný a adenosquamózní karcinom

V prostatě jde o velmi vzácné nádory, které tvoří méně než 0,5% maligních nádorů prostaty. Tento typ nádorů často vzniká jako následek hormonální terapie či ozařování pro zhoubný tumor jiné lokalizace. Hladiny PSA a PAPH v séru bývají normální i v době metastatického rozsevu, který postihuje zejména kosti, kde působí osteolyticky. Biologické chování tumorů, zejména dlaždicobuněčného, je vysoce agresivní.

3.1.10. Adenokarcinom s onkocytárními rysy

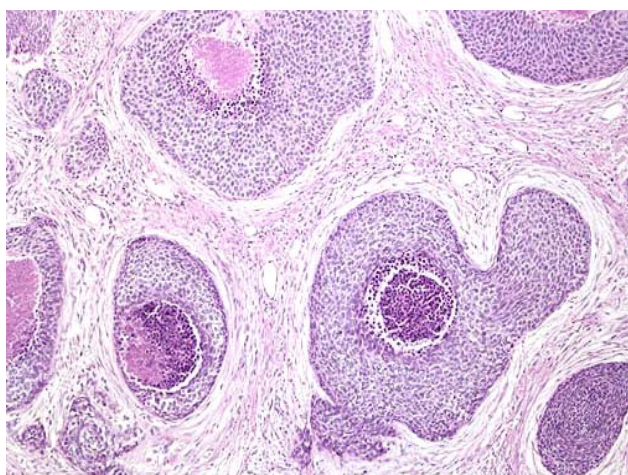
Tato podjednotka je tvořena vzácnými případy karcinomu s výraznou onkocytickou přeměnou nádorových buněk, které reagují pozitivně s PSA a PAPH.

3.1.11. Komedokarcinom

Jde o špatně diferencovanou variantu acinárního adenokarcinomu s centrální nekrózou v luminální části.

3.2. Uroteliální karcinom

Primární uroteliální karcinom prostaty (Obr. 14) je velmi vzácný, převážná většina případů má souvislost s uroteliálním karcinomem močových cest. Klinickými příznaky jsou nejčastěji hematurie, močová obstrukce či známky prostatitidy. Sérové hladiny PSA a PAPH nebývají výrazně zvýšené.



Obr. 14 Primární uroteliální karcinom prostaty (65)

3.3. Fyloidní tumor

**(nádor ze specializovaného prostatického stromatu,
cystadenoleiomyofibrom)**

Fyloidní tumor je velmi vzácnou afekcí, která může recidivovat a je schopna šíření mimo prostatu. Vyskytuje se častěji v mladších věkových skupinách a může dorůst obrovských rozměrů. Pacienti mají disurické potíže, objevuje se hematurie a příznaky močové obstrukce.

Histologicky je afekce tvořena celulární stromální komponentou, která obklopuje cystické prostory s epitelovou výstelkou. Celulární stroma často vytváří papilární útvary kryté cylindrickým až kubickým epitelem. Stromální buňky jsou obvykle větvenité, někdy uložené v myxoidní hmotě.

Dle klasifikace založené na poměru zastoupení stromatu a epitelu, na rozsahu nekróz, atypii a mitotické aktivitě, se tento tumor dělí na low-grade a high-grade skupinu. High-grade tumory mohou vznikat při recidivách dobře diferencovaných tumorů, často zakládají vzdálené metastázy. Low-grade tumory někdy, i přes kompletní odstranění, lokálně recidivují.

V diferenciální diagnostice je nutné vyloučit hyperplázii stromatu s bizardními buňkami, kongenitální či získané cysty semenných váčků a dále tzv. obrovskou multilokulární cystickou hyperplázií prostaty.

3.4. Další primární nádory prostaty

V dětském věku se může velice vzácně vyskytovat rhabdomyosarkom, který vychází ze svalové tkáně v prostatické žláze. U nemocných převažují příznaky spojené s močením, ale i s obtížným vyprazdňováním stolice a zácpou. Nádory často dorůstají značné velikosti a jsou hmatné přes břišní stěnu. Prognosticky spadá tento tumor do nepříznivé skupiny.

V dospělosti se z mezenchymálních nádorů vyskytuje leiomyosarkom, který roste velice rychle a často metastazuje, hlavně do plic. V histologickém obraze se objevuje jaderná nepravidelnost s četnými mitózami, vyskytují se obrovské nádorové buňky, nekrózy a hemoragie.

4. HISTOLOGICKÉ METODY V DIAGNOSTICE KARCINOMU PROSTATY

4.1. Histologie – historie oboru

Histologie je nauka o mikroskopické skladbě organismu. Vzhledem k tomu, že lidský organismus je složitý systém, skládající se z mnoha orgánů, tkání a buněk, je histologie dále členěna na konkrétní obory dle předmětu jejich studia. Nauka o mikroskopické stavbě orgánů je označována jako mikroskopická anatomie, nauka o stavbě tkání jako histologie v užším slova smyslu a nauka o skladbě buňky jako cytologie.

Rozvoj histologie jako vědního oboru je úzce spjat s vynálezem světelného mikroskopu, jeho dalším zlepšováním a konstrukcí nových typů mikroskopů včetně mikroskopu elektronového, které nabízí až 100x větší zvětšení než mikroskop světelný. Samotný vývoj dokonalejší pozorovací techniky by však nepřinášel požadované výsledky, pokud by se současně nerozvíjel i další související obor, histologická technika, která se zabývá přípravou histologických preparátů.

Metody histologické techniky byly zpočátku velmi prosté; histologický preparát byl například připravován rozcupováním malého kousku tkáně pomocí jehel nebo rozmělněním mezi dvěma sklíčky. Tyto metody však byly postupně zdokonalovány a obohacovány o techniky nové, přistoupilo se ke zhotovování tenkých řezů z požadovaných objektů pomocí nově zkonstruovaného přístroje – mikrotomu, který umožnil krájení řezů silných tisícin milimetru. Současně s tím se začalo používat metodiky barvení řezů různými barvivy, což umožnilo vizualizaci a zvýraznění struktur, které zůstávaly u běžného preparátu nezřetelné či zcela utajené.

V současné době tloušťka histologických řezů kolísá mezi 6-10 mikrometry, pro elektronový mikroskop jsou pomocí ultramikrotomu připravovány ultratenké řezy silné 60-70 nanometrů.

Histologický obraz konkrétního typu tkáně zdravého člověka slouží k poznání a pochopení správné funkce tkání a orgánů. Porovnáním tohoto histologického obrazu a nálezu pacienta lze odhalit změny orgánů a tkání vyvolané chorobným procesem. V klinické praxi je histologické vyšetření se všemi svými modifikacemi hojně využíváno především k posouzení tkáně potenciálně nádorově změněné. Na základě zhodnocení tvaru buněk a

charakteristických buněčných struktur je možno vynést soud o přítomnosti či nepřítomnosti nádorových změn, což má vysokou diagnostickou i prognostickou hodnotu (56).

4.2. Příprava vzorku pro histologické vyšetření

4.2.1. Odběr materiálu

Odběr materiálu musí být proveden tak, aby představoval reprezentativní vzorek vyšetřovaného orgánu či patologické změny tkáně. Materiál pro zpracování se nejčastěji získává operativně (biopsie), dále se uplatňuje i metoda seškrabování, odtlačení či odsátí. Vzorek musí být odebrán v co nejkratším čase, aby nedošlo k destrukci tkáně autolytickými procesy a byla zachována ultrastruktura buněk.

Tkáň určená pro vyšetření musí být bezprostředně po odběru fixována ve fixačním roztoku nebo zmrazovací směsi, aby nedošlo k poškození struktury buněk a tkání.

4.2.2. Fixace

Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky či zpomalení metabolických dějů v buňce způsobené zmražením, které má zabránit samovolnému rozkladu tkáně (autolýze).

Účelem fixace je zachovat strukturu buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, jaký mají zaživa. Úspěšná fixace je dána rychlostí penetrace fixativa do tkáně, proto je nutno odebírat poměrně malé kousky tkáně (tloušťka 4-6mm), k jejichž prosycení fixativem dojde ve velmi krátkém čase. Fixace často zvyšuje propustnost buněčné membrány a umožňuje průnik látek (např. barviv) přes semipermeabilní buněčnou membránu do buňky.

Metody fixace tkáňových řezů se dělí dle charakteru na fyzikální (fixace teplem či chladem) a chemické (využívají fixačních médií).

a) fyzikální fixace

a₁) tepelná

Jde o fixaci pomocí mikrovlnné trouby, kdy vzorek povaříme v chemickém fixativu po dobu milisekund až několika sekund (max. 60), což výrazně urychlí fixaci a usnadňuje i průkaz antigenů.

a₂) chladová

Zmražení musí být velmi rychlé, proto volíme co nejnižší teplotu (kapalného dusíku), jež vede ke vzniku velmi malých krystalků či amorfní vody, která nepoškodí membrány buněk a morfologii tkání.

b) chemická fixace

b₁) fixace ve formolu (formaldehydu)

Formol je dobrý fixační prostředek, vhodný zejména pro přehledné histologické preparáty. Rychle proniká, tkáň se po formolu dobře barví, při krátkodobé fixaci nerozpouští tuky. K fixaci se používá 10% nebo 20% formol, tkáň se fixuje 24-48 hodin, tkáňové bločky se mohou ponechat i déle. Po fixaci je nezbytně nutné dokonalé vyprání tkáňových bločků před zalévání po speciálních médiích.

Formol tvoří methylenovými můstky mezi zásaditými aminokyselinami ve tkáni prostorovou síť, která brání průniku protilátky k epitopu. Antigenní součásti molekuly je tedy třeba obnažit natrávením proteolytickými enzymy (pepsin, papain), použitím detergentů nebo metodou regenerace antigenu („antigen retriever“), která spočívá v povaření řezů v citrátovém nárazníku v mikrovlnné troubě.

- fixační roztok : 40% formaldehyd 100 ml
destilovaná voda 900 ml
4g NaH₂PO₄ · H₂O
6,5g Na₂HPO₄

b₂) fixace v Bouinově tekutině

Fixační roztok jen slabě proniká do tkaniva a snižuje se ochrana determinant buněčných membrán, intermediární filament; tkáně jsou křehké a řezy obtížně adherují na sklíčko.

Doba fixace je obvykle 4-24 hodin (dle velikosti tkáňového bločku), po fixaci se tkáň přenesse do bezvodého 80% ethanolu, kde dochází k vypírání fixativa. Tkáň se nikdy nesmí vypírat ve vodě, neboť by došlo k zbobtnání vaziva.

- fixační roztok : 40% formaldehyd 250 ml
1% kys. pikrová 750 ml
ledová kys. octová 5 ml

b₃) fixační tekutiny se sublimátem

Tento typ fixačních tekutin rychle proniká do tkání a usnadňuje barvení tkání po fixaci. Nevýhodou ovšem je, že po fixaci často vznikají v tkáni černě zbarvené nerozpustné amorfni sraženiny, které musí být odstraněny z tkáně jodováním.

c) speciální fixační postupy

Využívají se pro důkaz antigenů na subcelulární úrovni (56) :

- pre-embedding : imunohistochemická reakce proběhne před zalitím do parafínu
- post-embedding : imunohistochemická reakce proběhne po nařezání řezů přímo na sítkách.

4.2.3. Zalévání

Aby bylo možno zhotovit dostatečně tenké řezy, je nutné tkáně zpevnit zalitím do zalévacích medií, nejčastěji parafínu či celoidinu (nitrocelulosa). Tkáně, které byly pouze zmrazeny, je možno krájet na kryostatu i bez zalití.

Většina zalévacích medií není mísitelná s vodou, proto je nutno tkáně před zalitím dokonale odvodnit stoupající řadou alkoholů a prosytit rozpouštědlem zalévacího média (toluen, aceton, ...), které současně vzorek projasní - učiní ho transparentním.

a) zalévání do parafínu

Princip zalévání tkáně do parafínu je založen na prosycení odvodněné tkáně rozehřátým parafínem při teplotě 56-58°C. Parafín vyplní všechny mikroskopické štěrby v tkáni, takže je pak možno tkáň krájet v tenkých řezech i v souvislých sériích řezů, silných několik tisíc milimetrů.

Zalévání do parafínu se skládá ze čtyř etap : 1. odvodnění tkáně, 2. prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín, 3. prosycení tkáně parafínem, 4. vlastní zalití.

a₁) odvodnění tkáně

Odvodňování tkáně se provádí stoupající řadou etanolů, to znamená, že se postupně přenáší tkáňový bloček do etanolu o vyšší koncentraci, kde je ponechán po stanovenou dobu (viz. Tab. 2). Tento postup je dodržován, neboť se tak vyhneme negativnímu smrštění tkáně, k němuž by došlo, kdybychom tkáň vložili přímo do koncentrovaného etanolu.

Tab. 2 Přehled odvodňování
pozn. lázně 100% etanolu nejméně 2x vyměníme (I, II, III)

Koncentrace etanolu	Bloček menší než 0,5 cm ³	Bloček od 0,5 cm ³ do 1 cm ³	Bloček přes 1 cm ³
etanol 70%	2h	2h	4h
etanol 80%	2h	4h	6h
etanol 96%	6h	6h	6h
etanol 100% (I)	1h	2h	4h
etanol 100% (II)	1h	2h	4h
etanol 100% (III)	1h	2h	4h

a₂) prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín

Pro dokonalé odstranění etanolu z tkáně se tkáň prosycuje látkou, která dobře rozpouští parafín, ale zároveň se mísí s bezvodý etanolem. Z látek rozpouštějících parafín se k prosycení tkání používají buď látky s nižším bodem varu, které se dají dobře odstranit v parafínové lázni v termostatu (benzen, xylen), nebo látky s vyšším bodem varu, které se úplně odstranit nedají, tvoří však s parafínem dobře krájitelnou hmotu (methylbenzoát, methylsalicylát).

a₃) prosycení tkáně parafínem

Po prosycení tkáně benzenem přeneseme tkáňový bloček do tekutého parafínu, vyhřátého v termostatu na 56°C. Parafínem se prosycuje tkáň v otevřených nádobkách, a to postupně třemi lázněmi čistého parafínu, abychom z tkáně dokonale odstranili benzen. V první lázni se nechává bloček 2-4 hodiny, v druhé 4-6 hodin a ve třetí 8-12 hodin.

a₄) vlastní zalití do parafínu

Zalití se provádí v zalévací komůrce, do níž se nalije parafín zahřátý na 60°C a rychle se do něho přenesou pinzetou tkáňový bloček. Následuje ochlazení parafínu, které musí být rychlé a stejnoměrné, nejčastěji se děje ponořením zalévací komůrky do studené vody. Když je parafín zcela ztuhlý, zalévací komůrka se odstraní a parafínový bloček je připraven k dalšímu zpracování krájením.

b) zalévání do celoidinu

Celoidin je nitrát celulózy rozpustný v éteru a etanoléteru. Princip zalití do celoidinu

(Tab. 3) spočívá v prosycení odvodněné tkáně postupně koncentrovanějšími roztoky celoidinu při pokojové teplotě. Po prosycení tkáně se bloček zalije do koncentrovaného celoidinu a ztuhlý bloček se následně tvrdí v 70% etanolu.

Velmi výraznou nevýhodou tohoto typu zalévání je, že trvá dlouho a krájení v tenkých řezech je poměrně obtížné.

Tab. 3 Princip zalití do celoidinu

	Teplota	Čas
1. Odvodnění vzestupnou řadou etanolů	pokojová	viz. zalévání do parafínu
2. Etanoléter (odvodnění)	pokojová	6 - 8 h
3. Celoidin 2% (2,5%)	pokojová	24 - 48 h
4. Celoidin 4% (5%)	pokojová	3 dny - 1 týden
5. Celoidin 8% (10%)	pokojová	1 týden i déle
6. Zalití do 10% celoidinu	pokojová	3 - 4 h
7. Tvrzení v 70% etanolu	pokojová	48h

4.2.4. Krájení

Řezy se krájí na sáňkových nebo rotačních mikrotomech s ocelovými, skleněnými nebo diamantovými noži; pro imunohistochemii jsou využívány co nejtěsnější řezy (5 μ m). Řezy jsou po nakrájení přeneseny na podložní sklo a nataženy na kapce vody; k lepení řezů na podložní sklo se používají bílek-glycerin nebo želatina, či speciální syntetická lepidla (poly-L-lysin, APES-3-amino-propyl-triethoxysilan). Parafínové řezy jsou odparafínovány a převedeny do vody či nárazníkového roztoku, aby je bylo možno barvit nebo na nich provést histochemickou reakci.

4.2.5. Přehledné barvení hematoxylinem-eosinem

Materiál získaný biopsií prostaty, jenž má být vyšetřen na případnou přítomnost nádorových ložisek je zpracován běžnými technikami a ze vzniklého parafínového bloku jsou připravovány série řezů, které jsou, pro lepší orientaci a výběr vhodného řezu pro podrobnější a cílenější studium např. imunohistochemickými metodami, obarveny tzv. přehledným typem barvení, a to konkrétně kombinací dvou barviv, hematoxylinu a eosinu (Obr. 15 A-D).

Hematoxylin je jedno z mála dosud užívaných přírodních barviv; izoluje se ze dřeva stromu *Hematoxylon campechianum*. Barvivo samotné nemá barvicí schopnosti, získává je teprve oxidací (vzdušným kyslíkem nebo přidaným oxidačním činidlem), která z něho vytvoří tzv. hematein. Ani tento roztok ještě nemůže být použit k barvení pro svou nízkou afinitu ke tkáním, teprve po přidání mořidla (soli hliníku, železa nebo wolframu) se vytvoří komplex, který se dobře váže na bazofilní struktury, jako je například jaderný chromatin, který se hematoxylinem barví modře až černě.

Eosin je výborný v kombinaci s hematoxylinem jak pro výrazný barevný kontrast, tak i pro schopnost barvit cytoplazmu buněk a mezibuněčnou hmotu pojiv v různých odstínech růžové a červené, což výrazně ulehčuje jejich rozpoznání v mikroskopu.

Postup barvení hamatoxylinem-eosinem :

a) příprava roztoků

a₁) hematoxylin

destilovaná voda 1000 ml

hematoxylin 1g

jodičnan sodný 0,20 g

kamenec draselný 50,0 g

kyselina citrónová 1,0 g

chloralhydrát 50,0 g

a₂) eosin

Eosinů se vyrábí několik druhů, které se liší svým chemickým složením, barvou i rozpustností. Nejčastěji jsou používány vodné roztoky žlutého eosinu o 0,1% - 0,5% koncentraci.

b) odparafínování řezů

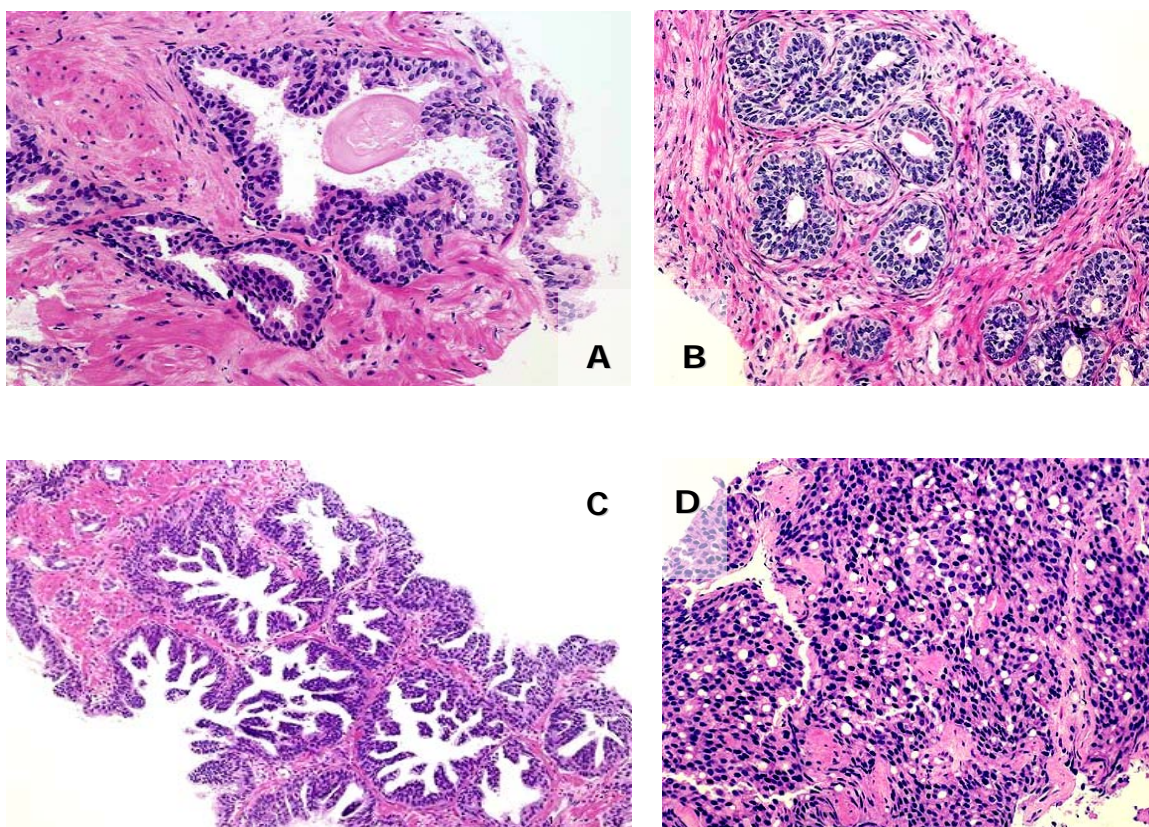
K odparafínování používáme dvou lázní xylenu po 5 minut. Protože další barvení bude probíhat ve vodných roztocích barviv, je nezbytné odstranit i použitý xylen, který se s vodou nemísí. Preparáty po rozpuštění parafínu přenášíme na 5 minut do bezvodého etanolu, následně na 5 minut do 96% etanolu a nakonec do vody.

c) vlastní barvení

Odparafinované řezy barvíme 3-10 minut v hematoxylinu v závislosti na druhu tkáně. Obarvené řezy opláchneme ve vodě. Vzhledem k tomu, že hematoxylin mimo jader přibarví i jiné tkáňové složky, je nezbytné provést tzv. diferencování kyselým etanolem (96% etanol 100ml + 3-5 kapek ledové kyseliny octové). Po diferencování se řezy musí vždy důkladně vyprat v tekoucí vodě. V dalším kroku je řez umístěn do kyvety s 0,1%-0,5% eosinem, kde je ponechán 1-5 minut. Následuje opláchnutí destilovanou vodou a diferenciací v 80% etanolu.

d) odvodnění řezů

Řezy jsou odvodňovány vzestupnou řadou etanolů (80%, 96%, 100%), v každé lázni zůstanou řezy 2-3 minuty. Z bezvodého etanolu přeneseme řezy do karbol-xylenu na 3-5 minut, čímž dokončíme odvodnění. Řezy projasníme dvěma lázněmi xylenu po dobu 5 minut. Obarvené řezy uzavíráme mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího média



Obr. 15 Přehledné barvení tkáňových řezů hematoxylinem-eosinem; A: obraz normální prostatické tkáně; B: benigní hyperplázie prostaty; C: high-grade PIN; D: adenokarcinom prostaty (65)

**5. IMUNOHISTOLOGICKÉ
(IMUNOHISTOCHEMICKÉ,IMUNOCYTOLOGICKÉ)
METODY V DIAGNOSTICE KARCINOMU PROSTATY**

Imunohistochemie je histologickým oborem, který využívá k detekci chemicky definovaných individuí in situ, tedy v buňkách, tkáňových kulturách a řezech z tkáňových bloků, afinitu antigenu a specifické protilátky a jejich vzájemnou vazbu.

Termínem imunohistochemie tedy označujeme všechny techniky využívající mono nebo polyklonální protilátky, kterými lokalizujeme a vizualizujeme příslušné tkáňové antigeny. Antigeny mají v buňce funkci receptorů, enzymů nebo transkripčních faktorů a jejich detekce má velký diagnostický význam; zejména detekce antigenů sdružených s nádorovými buňkami, která umožňuje imunohistochemickou klasifikaci nádorů podle původu. Výsledkem je histologický obraz, ve kterém je barevně znázorněna přítomnost vyšetřovaného antigenu. Imunohistochemické vyšetření je v současné době nedílnou součástí histopatologické diagnostiky, včetně diagnostiky karcinomu prostaty.

Možnost morfologicky přesně lokalizovat antigen, který exprimuje patologicky změněná buňka, je vysoce ceněna pro zkvalitnění diagnostického procesu. Nástup imunohistochemie můžeme datovat do roku 1941, kdy byly prvně detekovány antigeny ve tkáních pomocí fluoresceinem značené protilátky. Bouřlivý vývoj oboru nastal po roce 1976, kdy Milstein a Köhler připravili protilátky proti jednomu epitopu antigenní molekuly, tzv. monoklonální protilátky. Koncem sedmdesátých let byly imunohistochemické metody zdokonaleny natolik, že bylo možno využívat formolem fixované a do parafínu zalévané tkáňové bločky. Bylo tedy umožněno připravovat sériové řezy z jednoho bločku a aplikovat na ně nejen metody klasické histologie (přehledné barvení hematoxylinem-eosinem), ale i imunohistochemické postupy.

5.1. Základní pojmy v imunohistochemii

5.1.1. Antigen

Antigen v imunohistochemii je komplexní endogenní molekula (např. cytoskeletální antigeny, membránové antigeny, produkty onkogenů, ...), proti níž je možno připravit specifickou protilátku, která je schopna rozeznat tzv. antigenní determinantu (epitop) daného antigenu a vázat se na něj.

Epitop představuje malou část molekuly antigenu (5 – 8 aminokyselin nebo monosacharidových jednotek), která je vysoce specifická a záměna jen jedné aminokyseliny či monosacharidu způsobí změnu vazebného místa, což způsobí ztrátu vazebné schopnosti specifické protilátky.

5.1.2. Protilátka

Protilátka, nebo také imunoglobulin je glykoprotein produkovaný po imunizaci, tedy styku s antigenem, plazmatickými buňkami. Je tvořena dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci (vždy dva stejné lehké a dva těžké řetězce), které jsou spojeny jak disulfidickými můstky, tak nekovalentními vazbami. Každá jednotlivá protilátka má dvě stejná vazebná místa pro antigen.

a) Polyklonální protilátky

Pro získání protilátek využitelných v laboratorní diagnostice se nejčastěji používá metoda opakované imunizace zvířat konkrétním antigenem, proti němuž chceme získat protilátku. Takto vytvořené polyklonální sérum však představuje velmi heterogenní směs protilátek. Její složení se liší nejen u různých zvířat, ale i u téhož zvířete, mezi jednotlivými odběry. Směs obsahuje protilátky s různou specificitou (je dána prostorovou komplementaritou vazebného místa protilátky s epitopem), různou afinitou k antigenu, protilátky různých tříd a podtříd, různých biologických a fyzikálně-chemických vlastností.

b) Monoklonální protilátky

V roce 1975 Köhler a Milstein vyvinuli techniku, která umožňuje in vitro růst buněčné populace jednoho klonu produkujícího protilátky žádané specificity. První fáze přípravy monoklonálních protilátek probíhá stejně jako u protilátek polyklonálních, tedy imunizací zvířete (nejčastěji myši) vybraným antigenem. Ze sleziny imunizovaného zvířete je připravena buněčná suspenze, která je fúzována s relativně nesmrtnými myelomovými buňkami, které jsou odvozeny od mutantní buněčné linie nádorových B lymfocytů. Takto vzniklé klony (hybridomy) jsou dále množeny. Monoklonální protilátky produkované jednou hybridomovou linií jsou identické, tzn. že jsou jedné třídy (podtřídy), vykazují vazbu na

stejnou antigenní determinantu, váží se na ni se stejnou afinitou a mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Porovnání vlastností monoklonálních a polyklonálních protilátek

Příprava monoklonálních protilátek je značně technicky a časově náročná, nicméně podaří-li se získat hybridom produkující protilátku žádané kvality, je tak k dispozici standardní reagentie v prakticky neomezeném množství. Hybridomy je možné mrazit, dlouhodobě uchovávat v tekutém dusíku a v případě potřeby znovu rozmrazit. Nevýhodou však je, že monoklonální protilátka reprezentuje jen jednu složku polyklonální odpovědi a rozezná pouze jeden epitop antigenu, zatímco polyklonální protilátka většinou rozpozná více epitopů téhož antigenu. V případě změny epitopu tak monoklonální protilátka daný antigen nerozpozná, polyklonální protilátka však obvykle reaguje s jiným epitopem tohoto antigenu a prokáže tak jeho přítomnost (35).

5.2. Imunohistochemické metody detekce antigenů

5.2.1. Zpracování tkání

a) Odběr a fixace tkání, krájení řezů

Materiál pro zpracování se nejčastěji získává operativně (biopsie), dále se uplatňuje i metoda seškrabování, odtlačení či odsátí. Další zpracování tkání se řídí typem a stabilitou prokazovaných antigenů v jednotlivých prostředích a také technickým vybavením laboratoře, v níž je vyšetření prováděno.

Nejčastěji aplikovanou metodou fixace tkání je použití některého z běžných fixativ (alkoholové fixační roztoky, Bouinova tekutina, formol – podrobněji viz. kapitola 4), v kombinaci se zaléváním do parafínu. Takto vytvořené bločky jsou krájeny $4\mu\text{m}$ silné řezy na sáňkových či rotačních mikrotomech s ocelovými noži.

Odebíraná tkáň může být rovněž okamžitě a velmi rychle zmrazena, nejlépe v tekutém dusíku. Takto fixovaná tkáň je krájena na zmrazovacím mikrotomu – kryostatu (mikrotom umístěný v mrazícím boxu s teplotou -20°C); nakrájené řezy $4\mu\text{m}$ silné je pak třeba fixovat v chlazené směsi methanol-aceton 1:1 po dobu 10 minut.

K lepení řezů k podložnímu sklu je možno použít bílek-glycin nebo želatinu. Vzhledem k tomu, že jsou dostatečně účinná a nepůsobí nespecifické reakce, je však dáována přednost syntetickým lepidlům (poly-L-lysin, 3-aminopropyltrioxysilan). V případě polylysinových skel je podložní sklo přečištěno v saponátu a kyselém alkoholu, a poté se umístí na 5 minut do kyvety s poly-L-lysinem ředěným 1:10. Silanizovaná skla se připravují ponořením do 2% roztoku 3-aminopropyltrioxysilanu v acetonu.

b) Demaskování epitopů

V průběhu fixace i dalšího zpracování tkáňových bloků dochází ke změnám, maskování, někdy i zablokování antigenních determinant, a tím ke zkreslení výsledků imunohistochemických vyšetření. K demaskování zablokovaných epitopů v současné době slouží zejména digesce proteolytickými enzymy a využití působení mikrovlnné trouby.

Proteolytické enzymy (nejčastěji trypsin a pepsin) svým působením štěpí a uvolňují nežádoucí vazby, které se vytvářejí v průběhu fixace mezi různými skupinami aminokyselin. Nevýhodou jejich aplikace je ovšem fakt, že často působí uvolňování řezů, zejména kryostatových, z podložních skel. Tento problém je vyřešen v případě použití mikrovlnného ozáření v mikrovlnné troubě, kde dochází nejen k účinku tepelnému, který přispívá k fixaci, ale také k porušení některých peptidických vazeb, které mohou maskovat hledaný antigen. Na základě aplikace tohoto postupu byly odhaleny i antigeny či epitopy, které nemohou být v běžně zpracovaných parafinových řezech vůbec detekovány.

5.2.2. Markery

Abychom mohli pozorovat specifickou vazbu mezi příslušnou složkou tkáně a protilátkou, je třeba ji zvýraznit markerem – značkou (fluorochrom, biotin, enzym). Tato značka je kovalentně vázána k příslušné protilátce a detekována na základě svých vlastností ve světelné (biotin, enzymy) či fluorescenční (fluorochromy) mikroskopii. V imunohistochemických metodách zaměřených na detekci antigenů asociovaných s nádorovými buňkami je častěji využíváno značení pro světelnou mikroskopii.

a) Fluorochromy

Jde o barviva, která vykazují fluorescenci. Princip fluorescence spočívá v tom, že excitační světlo vede k přeskoku elektronů v molekule barviva na energeticky vyšší hladinu. Při následném skoku zpět se vysvítí světlo o jiné, delší vlnové délce. Fluorescence není stabilní a vybledne (vysvítí), preparát je proto nutno sledovat co nejdříve po proběhlé reakci. Orientace v preparátu pro fluorescenční mikroskop je těžší, protože se nedobarvují jádra. Pokud chceme mít jádra přibarvená, je nutno použít speciální filtr, dvojexpozici nebo konfokální mikroskop.

Barviva : ● fluorescein iso-thiocyanát (FITC) – zelené zbarvení

- rhodamin (tetramethylrhodamin-iso-thiocyanát – TRITC) – červené zbarvení
- texaská červeň (Texas red) – červené zbarvení
- Hoechst 33258 – modré zbarvení
- DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindol) pro barvení DNA – modré zbarvení

b) Biotin

Prokazuje se vazbou se značeným avidinem. Avidin má schopnost vázat čtyři molekuly biotinu; některá vazebná místa jsou volná (váže se biotinem značená protilátka) a některá vyplněná komplexem biotin-peroxidáza (resp. biotin-enzym). Enzym, navázaný ve výrazně vyšším počtu (o 2 molekuly enzymu více na každou značenou protilátku), štěpí specificky enzymatický substrát a vyvolává charakteristickou změnu zbarvení o značně větší intenzitě než bez vazby avidin-biotin.

c) Enzymy

Jako markery se používají velmi stabilní enzymy s relativně nenáročnými podmínkami pro úspěšný průkaz :

- alkalická fosfatáza (AP)
- křenová peroxidáza (HRP – horse radish peroxidase)
 - vizualizace se provádí pomocí DAB (diaminoazobenzidin) – působením peroxidázy vznikají nerozpustné černé (hnědé) elektrodenzní precipitáty
- glukózooxidáza
- β -galaktozidáza

5.2.3. Metoda přímá

Při přímé metodě je značka (marker – nejčastěji enzym) konjugován s protilátkou žádané specificity. Tato primární protilátka se přímo váže na hledaný antigen. Navzdory své zdánlivé jednoduchosti má tato metoda několik nevýhod. Vzhledem k nízké citlivosti musí být použita vyšší koncentrace primární protilátky. Některé protilátky (zvláště monoklonální) není možné s markery vůbec konjugovat, jelikož dochází k porušení vazebného místa a antigen pak není rozpoznán.

5.2.4. Metoda nepřímá

V prvním kroku se na antigen naváže specifická, neznačená primární protilátka, která může být jak polyklonální tak monoklonální. Teprve ve druhém kroku je první protilátka vázaná na antigen detekována druhou anti-Ig protilátkou konjugovanou s markerem.

Je-li například v prvním kroku použita myší protilátka, je aplikována sekundární značená králičí protilátka proti myšimu Ig. Výhodou této metody je, že jednu konjugovanou protilátku můžeme použít pro detekci mnoha antigenů. Pracujeme-li například s panelem několika myších monoklonálních protilátek, můžeme k jejich detekci užít jediný konjugát protilátky proti myšimu Ig.

5.2.5. Metoda amplifikační

Slouží k zesílení signálu v případě, že množství molekul antigenu ve tkáni je nízké.

a) PAP (peroxidáza-anti-peroxidáza)

Místo sekundárních protilátek konjugovaných jednoduše s křenovou peroxidázou jsou používány tzv. PAP komplexy. Peroxidáza je v těchto komplexech zachycena ve vazebném místě anti-peroxidázové protilátky. Při samotném průkazu antigenu jsou nejprve aplikovány primární protilátky (např. myší), které se na něj specificky naváží, následně je přidána neznačená sekundární protilátka (anti-myší) a také komplex myší protilátky s křenovou peroxidázou. Sekundární (anti-myší) protilátka se váže jak na primární specifickou

protilátku, tak na protilátku v PAP komplexu. Množství křenové peroxidázy navázané v PAP komplexu je několikanásobně vyšší než v případě jednoduché vazby enzymu na protilátku, díky tomu dochází k výraznému zesílení signálu.

b) APAAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza)

V tomto případě je enzym vázán na terciální protilátku, která byla vytvořena imunizací stejného zvířete, jako primární specifická protilátka. K navázání terciální protilátky dochází díky vazbě sekundární neznačené protilátky, která je namířena proti Ig zvířete, které bylo využito k produkci primární a terciální protilátky.

c) ABC (avidin-biotin komplex)

V této metodě se na primární specifickou protilátku naváže sekundární protilátka konjugovaná s biotinem. V dalším kroku se na biotin vázaný na sekundární protilátce vícenásobně váže komplex avidin-biotin-peroxidáza (nebo jiný enzym), který výrazně zesiluje signál.

5.2.6. Vizualizace konjugovaných enzymů

Enzym navázaný na protilátku nebo jinou molekulu (avidin, biotin) v průběhu imunologické reakce dopravíme a navážeme na vyšetřovaný objekt – tkáň nebo buňky. Konečným krokem k imunohistochemickému průkazu hledaného antigenu je vizualizace konjugovaného enzymu.

a) Křenová peroxidáza

Aktivním centrem peroxidázy (m.h. 40 kDa) je hemová skupina s navázaným železem – hematin, který tvoří komplex s peroxidem vodíku, který se tak rozpadá na vodu a atomární kyslík. Této vlastnosti peroxidázy se využívá k její vizualizaci, neboť může oxidovat různé substráty – donory elektronů, čímž způsobí změnu jejich zbarvení. Používanými donory elektronů jsou 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB), 3-amino-9-ethylkarbazol (AEC) a 4-chlor-1-naftol (CN).

b) Alkalická fosfatáza

Alkalická fosfatáza (m.h. 100 kDa) odštěpuje a transferuje fosfátové skupiny z organických esterů. Nejčastěji se prokazuje azokopulační reakcí s alfa-naftylfosfáty a Fast Blue BB (diazotát 4'-amino-2'-5'-dietoxybenzanilid; výsledkem je černá sraženina) nebo Fast Red TR (diazotát 5-chloro-o-toluidin; výsledné zbarvení je červenohnědé).

c) Glukózooxidáza

Prostetickou skupinou glukózooxidázy (m.h. 185 kDa) je flavoprotein. Flavin odnímá vodík z glukózy, kterou oxiduje, a odevzdává jej jinému receptoru, kyslíku. Ve tkáních savců není tento enzym přítomen, díky čemuž se nemusíme obávat endogenní aktivity. Nevýhodou je nižší citlivost ve srovnání s peroxidázou a požadavek asi 10x vyšší koncentrace primární protilátky. Glukózooxidáza se prokazuje tetrazoliovou reakcí s tetrazoliovými solemi : nitro-blue-tetrazolium (NBT), tetranitro-blue-tetrazolium (TNBT) a jodonitro-tetrazolium (INT).

d) β -galaktozidáza

Jako vhodný substrát ke znázornění β -galaktozidázy (m.h. 500 kDa) slouží 5-brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galaktozid, který poskytuje indigové zbarvení reakčního produktu.

5.3. Imunohistologické markery karcinomu prostaty

5.3.1. Prostatická kyselá fosfatáza

(prostate specific acid phosphatase, PAPH)

Role kyselé fosfatázy jako markeru rakoviny prostaty byla poprvé popsána již ve 30. letech 20. století (12), ale teprve v roce 1964 Shulman a spolupracovníci (50) charakterizovali prostatickou specifickou kyselou fosfatázu (PAPH), která se stala základem rozsáhlých imunochemických studií.

Lidská PAPH je fosfomonoesteráza, syntetizovaná a uvolňovaná do seminální tekutiny pod kontrolou androgenů. Jde o glykoprotein o molekulové hmotnosti 100kDa, tvořený

dvěma subjednotkami o hmotnosti 50kDa. Počátkem devadesátých let byla klonována cDNA a genomická struktura genu pro PSAP, který je uložen na chromozomu 3q21-23.

První studie, které se zabývaly stanovením prostatické kyselé fosfatázy v histologických preparátech, byly zaměřeny na odhalení míry specifity PAPH pro prostatickou tkáň. Jöbssis a kolektiv (25) studovali přítomnost PSAP na 30 vzorcích normální tkáně prostaty, 30 vzorcích adenokarcinomu prostaty, 20 případech metastáz prostatického původu a 50 případech metastáz jiného než prostatického původu. Pro přípravu specifické protilátky byla ze seminální tekutiny získána centrifugací a purifikací na gelu PAPH, která byla aplikována opakovanými intramuskulárními injekcemi samicím novozélandského bílého králíka. Po tříměsíční imunizaci bylo z králičí krve získáno antisérum, které bylo využito jako specifická primární protilátka, která se na tkáňových řezech vyvázala na antigen (PAPH). Během dalšího kroku imunohistochemické reakce byl přidán peroxidázou značený kozí anti-králičí imunoglobulin. Peroxidázová aktivita byla detekována přidáním 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridu. Výsledek (Tab. 4) ukázal pozitivitu PAPH v epiteliálních buňkách všech vzorků prostatické tkáně (normální i nádorové, 59/60), s výjimkou jednoho vzorku adenokarcinomu kribriformního typu, a rovněž u všech prostatických metastáz (20/20). Vzorky metastáz karcinomů jiného než prostatického původu byly negativní (50/50).

Tab. 4 Pozitivita PAPH
+ pozitivní, - negativní

Vzorky tkání		počet případů +	počet případů -
Prostata	epiteliální b.	30	0
	stroma	0	30
	adenokarcinom	29	1
Metastázy rakoviny	prostaty	20	0
	močového měchýře	0	10
	plic	0	10
	žaludku	0	10
	ledvin	0	10
	střev/rekta	0	10

Na základě této studie je patrné, že PAPH má pro prostatickou tkáň vysokou specifitu, díky čemuž její detekce napomáhá zejména k odhalení prostatického původu obtížně identifikovatelných metastáz. Využití PAPH v detekci a diagnostice karcinomu prostaty, či

odlišení karcinomu a benigní hyperplázie prostaty, není možné, neboť vzorky normální prostatické tkáně i adenokarcinomu prostaty vykazují téměř stejnou pozitivitu; nepatrně vyšší intenzita a jednotnost barvení je patrná u vzorků benigní hyperplázie, nicméně tento rozdíl není pro diagnostiku signifikantní.

Řada následujících výzkumů se zaměřila na výpovědní hodnotu stanovení intenzity a rozsahu barvení PAPH vzhledem k prognóze onemocnění. Ve studii (13) sledující vztah mezi intenzitou a rozsahem imunohistochemického barvení polyklonální protilátkou proti PAPH a dobou přežití pacientů, kteří onemocněli karcinomem prostaty, byla prokázána korelace mezi intenzitou zbarvení a dobou přežití (Tab. 5), z níž vyplývá, že pacienti s vyšší hladinou PAPH přežívají déle, pravděpodobně díky lepší odpovědi na hormonální léčbu. Vztah mezi rozsahem barvení a přežitím nebyl dostatečně prokázán.

Tab. 5 Intenzita pozitivní anti-PAPH reakce ve vztahu k době přežití pacientů

semikvantitativně stanovená intenzita zbarvení PAPH	počet pacientů	zemřeli do 7 let	přežili déle než 7 let
< 2	63	21 (33%)	42 (67%)
> 2	60	9 (5%)	51 (85%)

Pozdější studie, která využila k detekci PAPH monoklonální protilátku (49), vyloučila, že by intenzita či rozsah imunoreaktivity ve vzorcích adenokarcinomů prostaty mohly sloužit k předpovědi progresu onemocnění, neboť barvení prokázalo značnou variabilitu v expresi PAPH v daných vzorcích.

5.3.2. Prostatický specifický antigen (prostate specific antigen, PSA)

Objev molekuly PSA bývá připisován Wangovi (1979), avšak poprvé byl PSA identifikován v prostatické tkáni Ablinem a kol. již v roce 1970. V roce 1971 Hara a kol. popsali gama seminoprotein ve spermatu, když se snažili objevit marker využitelný v soudním lékařství k identifikaci pachatelů znásilnění. Později se ukázalo, že se jedná o identickou látku s PSA. Purifikován a charakterizován byl na gelové elektroforéze Wangem a kol. v roce 1979. Od doby, kdy začal být PSA široce používán v diagnostice karcinomu

prostaty, výrazně vzrostl počet provedených biopsií prostaty. Důsledkem je vyšší záchyt karcinomu prostaty a detekce časnějších stádií (48).

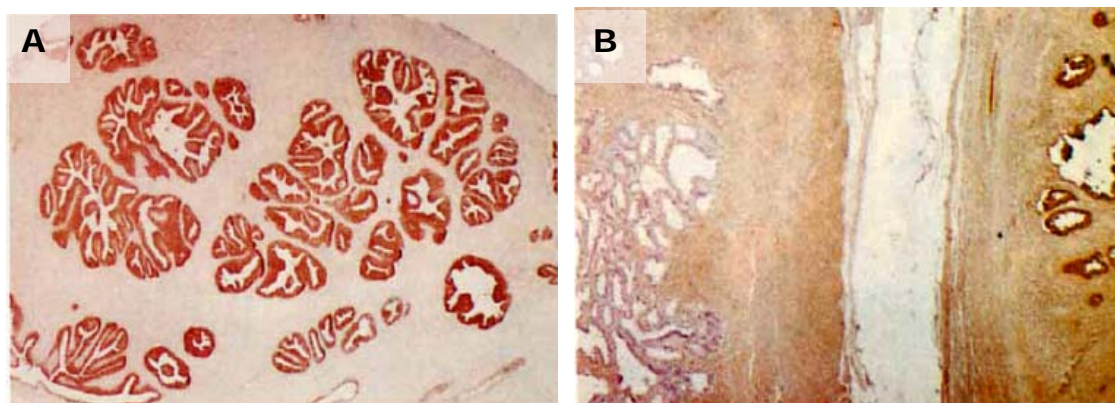
Prostatický specifický antigen je lidský kalikrein, glykoprotein o molekulové hmotnosti 33 kDa s aktivitou neutrální serinové proteázy. Jeho molekulu tvoří 237 aminokyselin a jeden uhlovodíkový řetězec, navázaný na aminoskupinu kyseliny asparagové.

PSA je secernován epiteliálními buňkami prostaty lemujícími aciny a dukty prostatické tkáně. Vyskytuje se především ve spermatu, kde je jeho koncentrace velmi vysoká (0,2-0,5 mg/ml); nejvyšší koncentrace PSA v těle je v lumen acinů. Gen pro PSA, který vykazuje více než 80% homologii s genem pro kalikrein, byl objeven na chromozomu 19. K jeho expresi dochází působení řady faktorů; v buněčné linii LNCaP prostatického karcinomu je exprese genu zvyšována přítomností androgenů a snižována 13-cis-retinovou kyselinou a extracelulární matrix, v tkáních benigní hyperplázie prostaty dochází k vyšší expresi PSA pod vlivem testosteronu, estradiolu, LH a FSH a nižší expresi díky prolaktinu.

Původní domněnka, že PSA je produkován pouze prostatickými buňkami byla vyvrácena průkazem tohoto proteinu v moči, séru a slinách žen. Rovněž byla zjištěna přítomnost mRNA typické pro PSA v některých nádorech kůže, slinných žláz, ledvin, vaječníků, plic a dalších.

V imunohistochemické analýze se ale PSA jeví jako téměř 100% specifický antigen pro prostatickou tkáň, neboť reakce protilátek byla prokázána pouze u vzorků prostatické tkáně či metastáz prostatického původu, zatímco u nádorových ložisek jiné lokalizace bylo barvení negativní. Nadji a kol. (41) ve své studii použili 73 vzorků primárních nádorů prostaty, 49 vzorků metastáz prostatického původu a 78 případů karcinomů jiného než prostatického původu. K detekci PSA byla použita neznačená králičí protilátka, jejíž vazba byla zvýrazněna užitím PAP techniky, kdy k vazbě králičího komplexu peroxidáza-anti-peroxidáza došlo prostřednictvím prasečího anti-králičího imunoglobulinu. K detekci a vizualizaci peroxidázové aktivity byl přidán 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid. Výsledek prokázal, že všech 78 případů karcinomů neprostatického původu se barvilo negativně (Obr. 16B), zatímco všechny vzorky prostatických karcinomů či metastáz vykazovaly pozitivitu (Obr. 16B). Na řezech s ložisky normální či hyperplastické tkáně byla rovněž potvrzena exprese

PSA v epiteliálních buňkách acinů a ductů prostaty (Obr. 16A), z čehož je patrné, že imunohistologický průkaz PSA není možné využít k odlišení benigní hyperplázie od karcinomu prostaty. Intenzita zbarvení sice od benigní hyperplázie přes PIN k adenokarcinomu klesá, ale procentuální zastoupení imunoreaktivních buněk se mezi vzorky BHP (81,3%) a karcinomu (74,2%) příliš neliší (4).



Obr. 16 A: pozitivní barvení PSA v duktech hyperplastické prostatické tkáně; B: v levé části je patrné negativní barvení v epiteliálních buňkách seminálních měchýřků, zatímco v pravé části se pozitivně barví buňky prostatického karcinomu (41)

Imunohistochemická analýza využívající protilátky proti PSA je v dnešní době široce rozšířena v histopatologické praxi k stanovení prostatického původu metastáz v různých lokalizacích. K detekci PSA je možno použít jak monoklonální, tak polyklonální protilátky, které se však liší svou senzitivitou a specificitou pro tento antigen. Varma a kol. (57) sledovali výhody a nevýhody obou typů protilátek na 60 vzorcích prostatického karcinomu, 40 vzorcích normálních seminálních váčků a 310 preparátech nádorů jiné než prostatické lokalizace. Nejprve byly připraveny přehledné preparáty barvené hematoxylinem-eosinem, v nichž bylo u vzorků prostatického karcinomu stanoveno Gleasonské skóre (20 preparátů se skóre 6, 20 se skóre 7-8, 20 se skóre 10). Z každého vzorku tkáně byly zhotoveny dva preparáty, z nichž jeden byl inkubován s anti-PSA monoklonální protilátkou a druhý s anti-PSA polyklonální protilátkou. K vizualizaci peroxidázové aktivity ABC (avidin-biotin komplex) byl použit diaminobenzidin. Výsledky prokázaly, že u vzorků s nižším skóre není rozdíl mezi senzitivitou obou protilátek patrný, avšak u preparátů s vyšším Gleasonským skóre byla patná nižší senzitivita monoklonální protilátky. V 310 preparátech nádorů jiné než

prostatické lokalizace nebyla prokázána žádná reaktivita s monoklonální protilátkou, což dokazuje její vysokou specifitu pro prostatickou tkáň. V případě polyklonální protilátky došlo k pozitivnímu barvení 90% (27/30) vzorků nenádorových buněk slinných žláz a 32% (13/40) vzorků seminálních váčků, díky čemuž byla polyklonální protilátka označena za méně specifickou. V souhrnu lze tedy stanovit, že polyklonální protilátka proti PSA je více senzitivní (detekuje PSA pozitivní buňky i ve špatně diferencovaných tumorech), ale méně specifická (pozitivita i ve tkáních jiné než prostatické lokalizace) než monoklonální protilátka. Pokud tedy chceme stanovit diferenciální diagnózu či původ metastáz nádorů, je vhodnější dát přednost monoklonální protilátce. Jestliže ale chceme odhalit přítomnost minimálního počtu nádorových buněk či buněk špatně diferencovaného karcinomu, poskytneme nám přesnější a významnější výsledky reakce s polyklonální protilátkou.

Rozsah ani intenzitu zbarvení PSA pozitivních vzorků nelze použít jako prognostický faktor další progresu onemocnění (49).

5.3.3. Prostatický specifický membránový antigen (prostate specific membrane antigen, PSMA)

PSMA byl poprvé identifikován Horoszewiczem a kol. (17) v roce 1987 jako marker prostatických epiteliálních buněk, který byl rozpoznán monoklonální protilátkou 7E11-C5.3.

Jedná se o transmembránový glykoprotein (m. h. 94kDa) tvořený 750 aminokyselinami, který je produkován epiteliálními buňkami prostatické tkáně. Gen pro PSMA je lokalizován na 11 chromozomu a vykazuje 54% homologii s genem pro transferinový receptor. PSMA je folát hydroláza, která vykazuje exopeptidázovou aktivitu a je silně exprimována v buňkách zejména těch prostatických karcinomů, které metastazovaly do kostí či lymfatické tkáně. Vzhledem k folát hydrolázové aktivitě PSMA vykazují buňky karcinomů prostaty, které tento antigen exprimují, rezistenci vůči terapii methotrexátem (45).

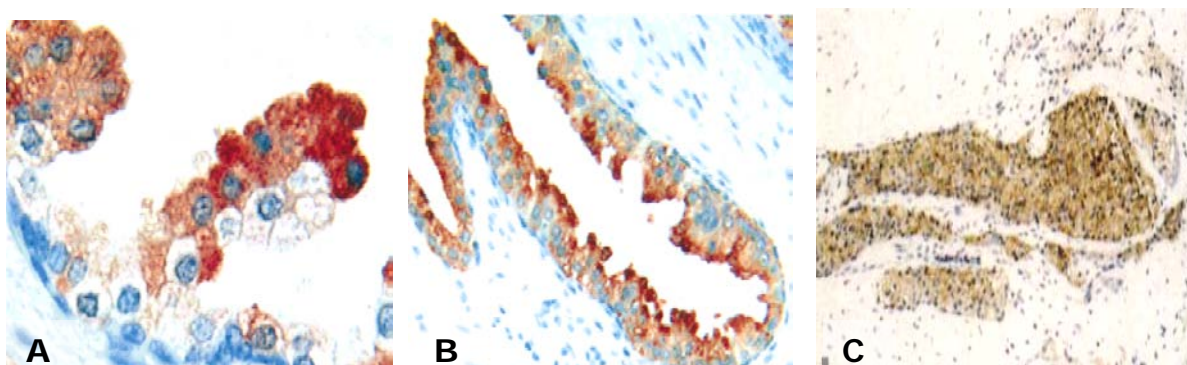
Imunohistochemické studie se v první řadě zaměřily na specifitu PSMA pro prostatickou tkáň a metastázy prostatického původu. Silver a kol. (53) analyzovali přítomnost PSMA ve vzorcích normální či hyperplastické tkáně prostaty, normálních tkání různých lokalizací a dále ve 35 vzorcích primárního prostatického karcinomu, 8 vzorcích

metastáz prostatického adenokarcinomu v lymfatických uzlinách a 18 vzorcích metastáz v kostech. Pro odhalení míry specificity PSMA pro prostatickou tkáň byla myší monoklonální protilátka 7E11-C5 aplikována i na série řezů karcinomů jiného než prostatického původu. K detekci primární protilátky byl přidán koňský anti-myší biotinylovaný imunoglobulin, na nějž se vyvázal avidin-biotinový peroxidázový komplex. Enzymová aktivita peroxidázy byla detekována přidáním 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridu. Výsledek (Tab. 6) ukázal značně vysokou specificitu PSMA pro prostatickou tkáň stejně jako pro metastázy prostatického původu (pozitivita jiných než prostatických tkání je pravděpodobně způsobena hydrolázovou aktivitou PSMA; dochází ke zkřížené reakci protilátky s jinou hydrolázou).

Tab. 6 Reakce PSMA ve vzorcích normálních a nádorových tkání různých lokalizací
- negativní, + pozitivní, +/- slabě pozitivní

normální tkáň			nádorová tkáň			
typ tkáně		detekce PSMA	typ tkáně	počet vzorků	pozitivní PSMA	
ledviny	glomeruly	-	prostata – primární karcinom			
	tubuly	+	prostata -	lymfatické uzliny	8	7
močový měchýř		-	metastázy	kost	18	8
prostata	epiteliální b.	+/-	ledviny			
	stroma	-	močový měchýř			
kůže		-	tlusté střevo			
nervový systém		-				
endokrinní orgány		-				
tlusté střevo		+				

Dalšími výzkumy bylo prokázáno, že není možné použít barvení PSMA v histologii k odlišení vzorků benigní hyperplázie prostaty a karcinomu stejné lokalizace. Bostwick a kol. (4) aplikovali monoklonální protilátku proti PSMA na 184 preparátů vytvořených ze vzorků prostatické tkáně pacientů s adenokarcinmem prostaty. Akceptovány byly pouze ty preparáty, na nichž se současně vyskytovala ložiska BHP, PIN a adenokarcinomu prostaty Na základě stanovení procentuálního zastoupení pozitivně se barvících buněk (BHP 69,5%; PIN 77,9%; adenokarcinom 80,2%) bylo odhaleno, že exprese PSMA stoupá od BHP přes PIN k adenokarcinomu (Obr. 17).



Obr. 17 PSMA pozitivní epiteliální buňky; A: BHP; B: PIN; C: primární adenokarcinom prostaty (4)

5.3.4. Prostate stem cell antigen (PSCA)

PSCA je glykoprotein tvořený 123 aminokyselinami, který je exprimován na povrchu epiteliálních buněk prostatické tkáně. Třebaže PSCA mRNA byla detekována specificky pouze v bazálních buňkách, glykoprotein se vyskytuje v bazálních, sekreторických i neuroendokrinních buňkách prostaty. K membráně buněk je vázán prostřednictvím glykosylfosfatidylinositolu (GPI). Funkce tohoto proteinu v organismu není dosud zcela známá, pravděpodobně se podílí na transdukci signálu a mezibuněčné adhezi, z čehož lze usuzovat, že změny v jeho expresi mohou ovlivnit proliferaci a schopnost apoptózy buněk (46).

Specifická PSCA pro prostatickou tkáň je vysoká, neboť pozitivní barvení bylo prokázáno u normální i nádorové prostatické tkáně včetně metastáz v různých orgánech, naproti tomu u většiny vzorků ostatních tkání nebyla zaznamenána reaktivita. Výjimku tvoří pouze slabě se barvící neuroendokrinní buňky tlustého střeva a žaludku, trofoblasty placenty, epiteliální buňky močového měchýře a buňky sběrných kanálků ledvin.

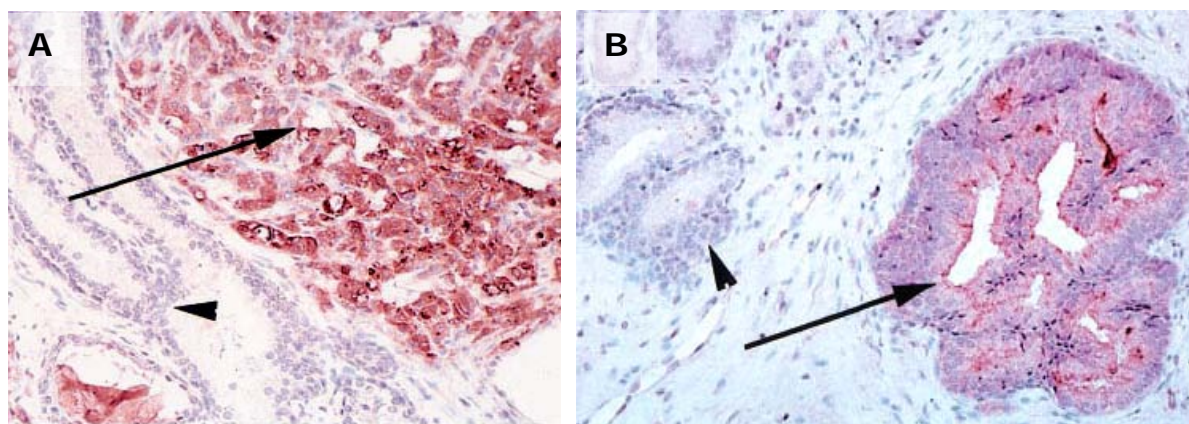
Vzhledem k tomu, že byla prokázána asociace PSCA nejen s normální prostatickou tkání, ale i s více než 80% případů rakoviny prostaty, byla věnována značná pozornost odhalení výpovědní hodnoty pozitivní imunoreaktivity v souvislosti s odlišením normální a nádorově změněné tkáně, popřípadě nalezením vztahu mezi intenzitou barvení a biologickými vlastnostmi nádoru. Gu a kol. (11) využili k analýze 112 vzorků primárních karcinomů prostaty a 9 vzorků metastáz prostatického původu v kostech. PSCA pozitivita byla prokázána

ve 105 (94%) případech karcinomu a 9 (100%) případech kostních metastáz. Intenzita zbarvení jednotlivých preparátů byla semikvantitativně posouzena a na základě porovnání s hodnotou gradingu a stagingu (Tab. 7) byla potvrzena signifikantní korelace mezi těmito hodnotami a úrovní exprese PSCA.

Tab. 7 Exprese PSCA v porovnání s gradingem a stagingem

Gleason skóre	počet pacientů	semikvantitativní zhodnocení intenzity barvení			
		0 (%) negativní	1-2 (%) slabě pozitivní	3-6 (%) pozitivní	9 (%) silně pozitivní
2-4	4	0 (0)	0 (0)	4 (100)	0 (0)
5-6	27	3 (11)	4 (15)	17 (63)	3 (11)
7	47	2 (4)	3 (6)	33 (70)	9 (19)
8-10	34	2 (6)	5 (15)	16 (47)	11 (32)

Ve stejných vzorcích byla porovnána i míra imunoreaktivity nádorových ložisek a přilehlých okrsků normální prostatické tkáně (Obr. 18).



Obr. 18 A: silně pozitivní imunoreaktivita buněk špatně diferencovaného karcinomu (šipka) v kontrastu se slabě pozitivními buňkami normální tkáně (špička); B: silně pozitivní imunoreaktivita buněk kribri-formního karcinomu (šipka) v kontrastu se slabě pozitivními buňkami normální tkáně (špička) (11)

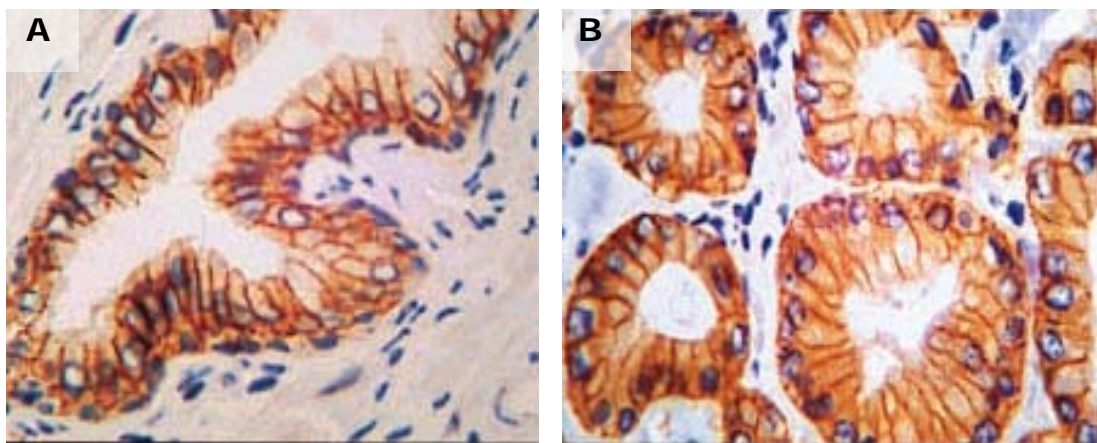
Výsledek ukázal, že buňky normální tkáně se barví výrazně slaběji než buňky nádorové, přičemž tento rozdíl je tím markantnější, čím vyšší je Gleasonské skóre posuzovaného nádorového ložiska.

V souhrnu tedy platí, že míra exprese PSCA v nádorových buňkách prostaty stoupá s vyšším gradingem a stagingem a rozdíl v intenzitě PSCA imunoreaktivity lze využít k odlišení normální a neoplastické prostatické tkáně.

5.3.5. Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP)

Při hledání nových genů, které jsou ve zvýšené míře exprimovány u metastazující rakoviny prostaty, byl objeven nový gen na 7. chromozomu, který je silně exprimován u pokročilých stádií karcinomu prostaty. Jeho produktem je protein, tvořený 339 aminokyselinami, který nevykazuje homologii s žádným známým proteinem. Biochemická analýza a stanovení sekundární struktury vedou k domněnce, že jde o buněčnou povrchovou molekulu s šesti transmembránovými doménami. Takovéto molekuly obvykle fungují jako iontové kanály. STEAP má tedy pravděpodobně vzhledem ke své membránové lokalizaci funkci mezibuněčného kanálu v oblasti buněčných spojů, díky čemuž se může podílet na zvýšené proliferaci a vyšší invazivitě buněk karcinomu prostaty.

Imunohistologická analýza přítomnosti STEAP byla provedena Hubertem a kol. (19) na formalinem fixovaných parafínových 4silých tkáňových řezech, které byly inkubovány s anti-STEAP polyklonální ovčí protilátkou. Následně byl přidán biotinylovaný králičí anti-ovčí imunoglobulin a reakce byla vizualizována přidáním avidin-konjugované peroxidázy. Jako pozitivní kontrola byly použity nádorové buňky LNCaP linie, u nichž byla prokázána výrazná imunoreaktivita v oblasti plazmatické membrány. Analýza 26 klinických vzorků prostatické tkáně ukázala střední až silnou pozitivitu epiteliálních buněk všech vzorků prostatického karcinomu. Signál byl evidentně nejsilnější v oblasti buněčné membrány, zejména v místech mezibuněčných spojů (Obr. 19).



Obr. 19 A: pozitivní STEAP ve vzorku normální prostatické tkáně; B: STEAP pozitivita karcinomu prostaty Gleason 3 (19)

STEAP je tedy exprimován ve všech vzorcích prostatické tkáně (normální, BHP, karcinom), což znemožňuje využití tohoto markeru k odlišení karcinomu od normální či hyperplastické tkáně. U většiny vzorků jiné než prostatické lokalizace nebyla přítomnost STEAP detekována, výjimku představuje pouze slabá cytoplazmatická pozitivita několika vzorků (Tab. 8), což dokazuje vysokou specifitu STEAP pro prostatickou tkáň.

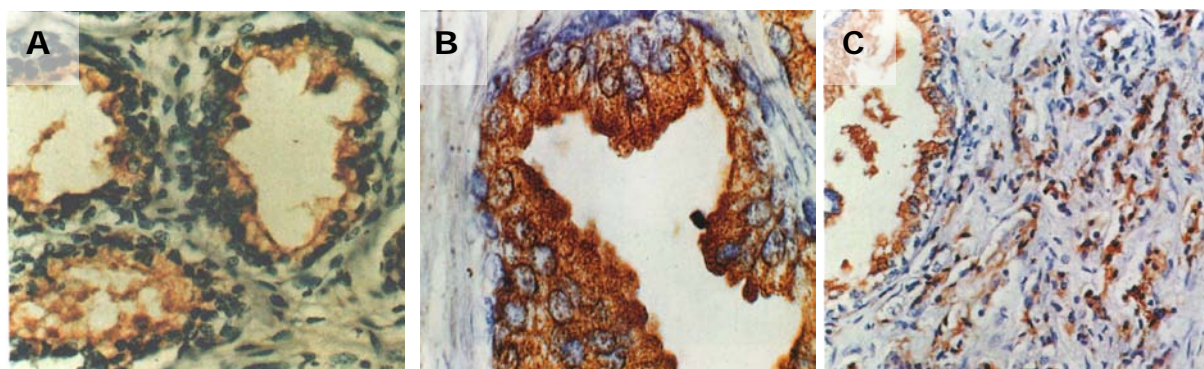
Tab. 8 Intenzita barvení STEAP ve vzorcích různých tkání
 - v případech, kdy byl analyzován více než jeden vzorek konkrétní tkáně, je uveden v závorce počet vzorků, popř. počet pozitivních vzorků/celkový počet vzorků

intenzita barvení	typ tkáně
žádná	mozeček, mícha, srdce, kosterní sval (2), arterie, brzlík, slezina (4), kostní dřeň, lymfatické uzliny (3), plíce (3), játra (4), ledviny (2), varlata (2), vaječníky, placenta, nadledvinky (2), štítná žláza (2), kůže (2)
slabá cytoplazmatická	močovod, rakovina močového měchýře, tlusté střevo (4/7), rakovina tlustého střeva (4/7), slinivka břišní, žaludek (1/2), děloha (1/2)
střední až silná membránová	prostata (6/6), BHP (5/5), močový měchýř (2/5), rakovina prostaty (15/15)

5.3.6. Prostatic inhibin peptide (PIP)

PIP je protein, tvořený 94 aminokyselinami (m.h. 105kDa), uvolňovaný prostatickými epiteliálními buňkami do séra a moči. Exprese PIP je nezávislá na androgenech, je však ovlivňována FSH a TRH.

Pozitivní imunohistologické barvení na přítomnost PIP bylo prokázáno v epiteliálních buňkách všech prostatických tkání : normální, hyperplastické i maligní (Obr. 20).



Obr. 20 Pozitivní imunoreaktivita PIP; A: normální prostatická tkáň; B: BHP; C: špatně diferencovaný adenokarcinom prostaty (10)

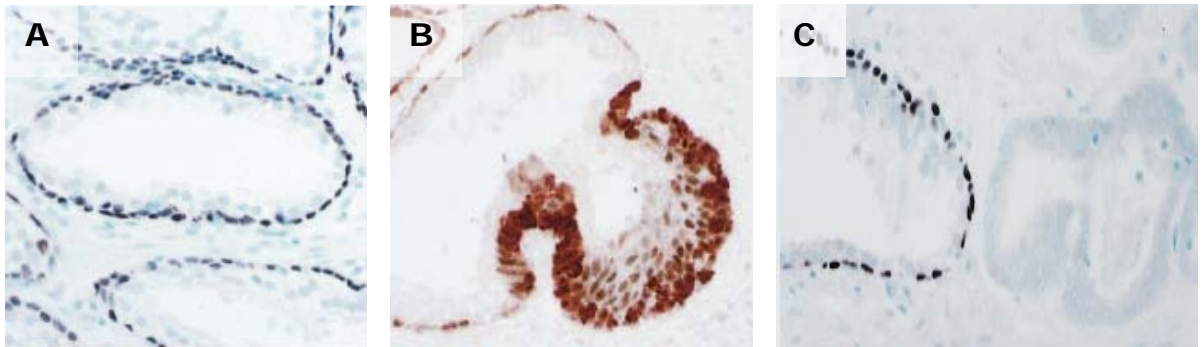
V imunoreaktivních buňkách je v cytoplazmě disperzně rozptýlen hnědý reakční produkt, který se nevyskytuje v jádře. U tkáně BHP byla prokázána v porovnání s normální a nádorovou tkání výrazně vyšší pozitivita, což může částečně přispívat k odlišení BHP a adenokarcinomu prostaty. Normální a hyperplastická prostatická tkáň se barví uniformně (difúzně nebo granulárně), na rozdíl od barvení u adenokarcinomů, které je méně intenzivní a v jednotlivých okrscích nádorové tkáně se výrazně liší intenzitou i charakterem. Intenzita barvení a počet pozitivních buněk vykazuje inverzní vztah s diferenciací tumoru.

Nevýhodou PIP jako markeru v diagnostice nádorových onemocnění je jeho nižší specificita pro prostatickou tkáň, neboť pozitivní imunoreaktivita s anti-PIP protilátkou byla odhalena i v dalších tkáních (nadvarle, seminální váčky, děloha, hypofýza, kůra nadledvinek, placenta) (10).

5.3.7. Protein p63

Protein p63, který vykazuje homologii s tumor supresorovým genem p53, je důležitým regulátorem růstu a rozvoje buněk kožních epitelí, děložního čípku, prsu a urogenitálního traktu a v neposlední řadě prostaty. Gen pro p63, uložený na 3.chromozomu, nese genetickou informaci nejméně pro šest izoform produkovaného proteinu, z nichž ty, které obsahují transaktivační doménu, jsou schopny aktivovat p53 gen a indukovat tak buněčnou apoptózu. p63 je selektivně exprimován bazálními buňkami mnoha epitelálních tkání, což snižuje jeho selektivitu pro prostatickou tkáň.

Signoretti a kol. (52) ve své studii prokázali rozhodující roli p63 v rozvoji normální prostatické tkáně a rovněž jeho výhradní expresi v jádrech bazálních buněk. Testování bylo podrobena 130 vzorků karcinomu prostaty, které byly zpracovány tradičními histologickými technikami a následně inkubovány s 4A4 anti-p63 protilátkou, která rozeznává všech šest izoform proteinu. V okrscích normální tkáně se bazální buňky, na rozdíl od buněk sekretorických a neuroendokrinních, barvily výrazně pozitivně (Obr. 21A). U 126 (97%) případů karcinomu prostaty byla zaznamenána negativní imunoreaktivita bazálních buněk s anti-p63 protilátkou (Obr. 21C).



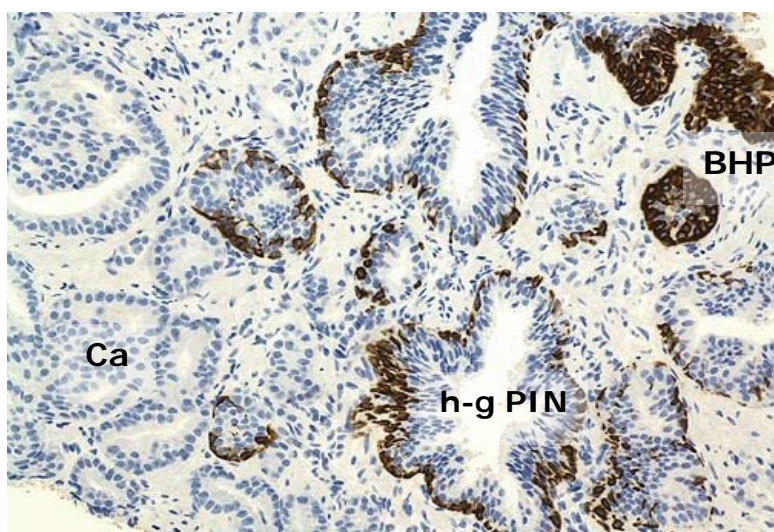
Obr. 21 p63 imunoreaktivita; A: normální prostatická tkáň; B: BHP, pozitivní reakce s anti-p63 a anti-HMWCK protilátkou; C: v pravé části negativně imunoreaktivní bazální buňky karcinomu, vlevo p63 pozitivní bazální buňky normální tkáně (52)

Z uvedeného vyplývá, že p63 není přítomen v buňkách karcinomu prostaty, zatímco v normální či hyperplastické tkáni je jeho přítomnost prokázána intenzivním barvením (8). Díky tomuto výraznému rozdílu patří p63 a jeho stanovení v bioptických preparátech prostatické tkáně ke stěžejním vyšetřením, která napomáhají k diagnostickému rozlišení BHP a karcinomu prostaty (44).

5.3.8. High-molecular-weight cytokeratins (HMW-CK)

Prostatické žlázy, stejně jako řada dalších tkání, exprimují cytokeratiny jednoduchých epitelů 8, 18 a 19, avšak vzhledem k diagnostice nádorových změn prostatické tkáně se značné pozornosti těší protilátky proti cytokeratinům o vyšší molekulové hmotnosti, tzv. HMW keratinům (cytokeratiny 1, 5, 10, 14). Tyto keratiny se vyskytují typicky v bazálních buňkách konkrétních epitelálních tkání, jejich výskyt tedy není omezen na prostatickou tkáň. Z tohoto důvodu jejich průkaz nelze využít k určení povahy metastáz neznámého původu.

Reakce s monoklonální anti-HMW cytokeratinovou protilátkou (34βE12) má však zásadní diagnostický přínos : v nádorových žlázkách (zpravidla) chybí, ve většině benigních proliferací je přítomna (Obr. 22). Tento poznatek je využíván k odlišení BHP od karcinomu prostaty v histologických analýzách.



Obr. 22 Reakce s 34βE12 protilátkou – v levé části nádorové žlázy bez reakce (Ca), uprostřed high-grade PIN žlázy s fragmentovanou vrstvou bazálních buněk (h-g PIN), vpravo nahoře žlázy BHP (BHP) se silnou pozitivitou v oblasti bazálních buněk (66)

O'Malley (43) pozoroval pozitivní zbarvení bazálních buněk u 47 případů benigních prostatických lézí (aplázie, fibroepiteliální uzol, postsklerotická hyperplázie, hyperplázie bazálních buněk, ..), zatímco 21 případů drobných acinární adenokarcinomů nevykazovalo žádnou reaktivitu. Problémem ovšem zůstává, že ne všechny bazální buňky benigních žlázek se barví stejnoměrně, v některých případech je tak přerušena kontinuita bazální vrstvy, což by mohlo vést k mylné diagnóze. Stejný problém, tedy ztráta barevné reakce s protilátkou či nekontinuita bazální vrstvy, se objevuje až u 11% případů atrofie prostatických žláz, 12% případů BHP a u 10-90% vzorků s atypickou adenomatózní hyperplázií.

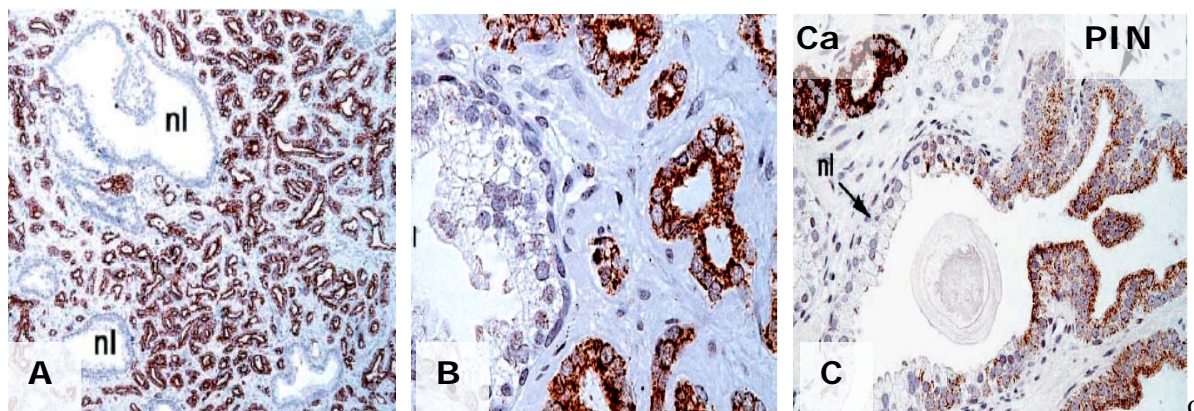
5.3.9. α – methylacyl-CoA racemáza (AMACR)

Rozvoj molekulárně biologických metod (cDNA microarrays) vedl k identifikaci a popisu řady genů, které jsou s rozdílnou intenzitou exprimovány v maligních a benigních buňkách a tkáních.

V roce 2000 Xu a kol. (58) s využitím cDNA knihoven identifikovali 3 proteiny (P503S, P504S, P510S), které se vyskytují v benigní či maligní prostatické tkáni. Protein P504S, tvořený 382 aminokyselinami, byl identifikován jak α – methylacyl-CoA racemáza, která se podílí na β -oxidaci rozvětvených mastných kyselin a jejich derivátů. P504S mRNA

byla prokázána ve 30-60% případů prostatického adenokarcinomu, přičemž v normální prostatické tkáni nebyla přítomna.

Jiang a kol. (22) v roce 2001 označili AMACR jako nový marker v diagnostice karcinomu prostaty. Užitím králičí monoklonální protilátky byla studována série 207 klinických případů (137 karcinomů prostaty + 70 vzorků normální tkáně). Výsledky ukázaly, proč je AMACR atraktivním markerem pro diagnostiku karcinomu prostaty. V první řadě studie potvrdila, že P504S/AMACR je marker s vysokou senzitivitou pro karcinom prostaty, neboť všech 137 případů vykazovalo silnou pozitivní reakci s protilátkou bez ohledu na hodnotu Gleasonského skóre. Pozitivní P504S barvení bylo definováno jako kontinuální, tmavé cytoplazmatické zbarvení v epiteliálních buňkách. P504/AMACR je rovněž silně pozitivní v okrscích tkáně s high-grade PIN. Druhým, a neméně zajímavým zjištěním bylo, že AMACR má pro karcinom prostaty rovněž vysokou specificitu. Na rozdíl od karcinomů 88% vzorků benigní prostatické tkáně (včetně benigní tkáně v sousedství karcinomu) bylo kompletně negativních pro P504/AMACR (Obr. 23). Zbýlých 12% případů vykazovalo pouze místní a velice slabou pozitivitu. Mimo to malé benigní atypické žlázy (atrofie, hyperplázie bazálních buněk, zánět, adenóza), které mohou v některých případech napodobovat vzhled nádorových ložisek a zkreslovat tak stanovení diagnózy, s P504S protilátkou nereagovaly.



Obr. 23 A: pozitivní imunoreaktivita epiteliálních buněk adenokarcinomu prostaty, nl označuje normální prostatické žlázy bez barevné reakce (zvětšení 40x); B: větší zvětšení A (zvětšení 400x), patrné cytoplazmatické barvení; C: Ca = nádorově změněné žlázy, nl = normální žlázy, PIN = slabě pozitivní buňky prostatické intraepiteliální neoplázie (38)

V roce 2002 Rubin a kol. (47) aplikovali polyklonální anti-AMACR protilátku na 94 vzorků a prokázali 97% senzitivitu a 100% specificitu AMACR pro rakovinu prostaty. Luo a

kol. (38) ve své studii stanovili, že více než 95% vzorků prostatického karcinomu se barví pozitivně na přítomnost AMACR, zatímco v sériích řezů normální prostatické tkáně se tato pozitivita objevuje u méně než 4% případů.

Vzhledem k tomu, že AMACR je ve vysoké míře vyjádřena v buňkách karcinomu prostaty, je pro ověření její využitelnosti v diagnostice karcinomu prostaty důležité stanovit její expresi v normální tkáni a u dalších maligních tumorů. Luo a kol. (38) popsali nález AMACR v normálních hepatocytech, ledvinových tubulech a slinných žlázách.

Jiang a kol. (20) studovali s využitím monoklonální protilátky 222 vzorků různých normálních tkání. Přítomnost AMACR byla detekována v hepatocytech a epiteliálních buňkách ledvinových tubulů, bronchiolů a mukózy žlučníku. Stejnou metodou bylo testováno i 539 vzorků maligních tumorů různé lokalizace, přičemž silná pozitivita byla odhalena u 17 (81%) z 21 vzorků hepatocelulárního karcinomu a 18 (75%) z 24 vzorků buněk karcinomu ledvin. Zhou a kol. (62) ke svým výzkumům naproti tomu použili polyklonální protilátku a detekovali AMACR u 92% případů kolorektálního karcinomu, 60% případů rakoviny vaječnicků a 30% případů rakoviny prostaty. Mezi oběma studiemi se objevily značné rozdíly, neboť Zhou a kol. popsali silnou expresi AMACR u rakoviny prsu a vaječnicků, kdežto Jiang a kol. v těchto případech zaznamenali pozitivitu AMACR pouze výjimečně. Tyto diskrepance jsou pravděpodobně způsobeny užitím různých typů protilátek, neboť, jak bylo dříve prokázáno, polyklonální protilátka proti AMACR poskytuje nižší specificitu pro karcinom prostaty než P504S monoklonální protilátka (32).

Souhrnem tyto různé studie demonstrují, že P504S/AMACR je :

- a) vyjádřena v různých tkáních, benigních i maligních, z čehož vyplývá, že v rámci nádorové diagnostiky je její výpovědní hodnota např. při stanovení původu metastáz velmi malá
- b) důležitým pozitivním tkáňovým markerem pro karcinom prostaty, který nezávisí na gradingu tumorového ložiska, a je možné jej využít k odlišení normální prostatické tkáně, BHP a karcinomu prostaty
- c) senzitivita tohoto markeru pro diagnostiku karcinomu prostaty, v závislosti na typu použité protilátky, kolísá mezi 82-100% a specificita mezi 79-100% (Tab. 9).

Tab. 9 Senzitivita AMACR dle použité protilátky
M = monoklonální protilátka; P = polyklonální protilátka

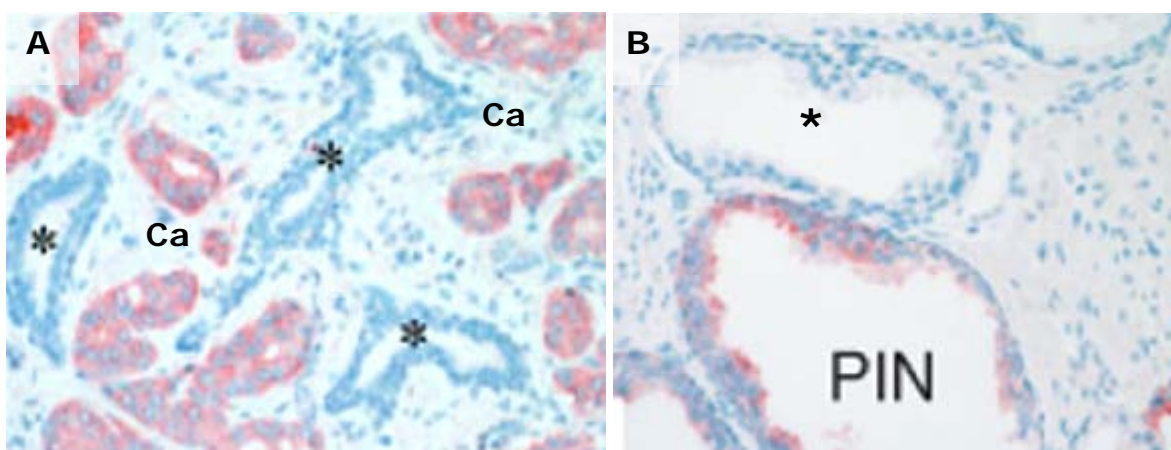
autor	publikační rok	typ protilátky	počet vzorků	senzitivita	specifita
Jiang a kol. (22)	2001	M	207	100%	88%
Rubin a kol. (46)	2002	P	94	97%	100%
Luo a kol (37)	2002	P	168	96%	97%
Yang a kol. (58)	2002	M	80	100%	88%
Zhou a kol. (61)	2002	P	6	83%	-
Jiang a kol. (24)	2002	M	142	95%	100%
Beach a kol. (2)	2002	M	405	82%	79%

5.3.10. Cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP 3)

Cysteine-rich secretory proteins představují širokou skupinu proteinů, které byly poprvé identifikovány v samčím reprodukčním traktu hlodavců. Svůj název získaly díky stejné, na cystein bohaté, doméně na COOH terminálním konci molekuly (31).

Genetická informace pro CRISP 3 (nebo také Specific granule protein, SGP) je uložena na 6. chromozomu a její expresí pod vlivem androgenů je produkován protein tvořený 225 aminokyselinami, z nichž 16 představuje cystein. CRISP 3 gen je zvýšeně exprimován v buňkách rakoviny prostaty, přičemž přítomnost tohoto proteinu je poměrně specifickým markerem prostatických epiteliálních buněk. CRISP-3 mRNA je zvýšeně exprimována ve středně a špatně diferencovaném karcinomu, mírně zvýšené hodnoty jsou nalézány i u PIN (28).

Bjartell a kol. (3) využili ve své studii polyklonální králičí anti-CRISP 3 protilátku, kterou aplikovali na 115 vzorků prostatické tkáně, 15 vzorků kostních a 15 vzorků lymfatických metastáz karcinomu prostaty. V okrcích benigní tkáně v těchto vzorcích nebyla prokázána žádná, nebo pouze slabá, imunoreaktivita. Specifická a silná reakce v epiteliálních buňkách prostatické tkáně byla detekována u high-grade PIN (u 12 ze 17 pacientů, 12/17), u většiny primárních prostatických tumorů (111/115) a rovněž u metastáz prostatického původu (23/30) (Obr. 24).



Obr. 24 CRISP 3 imunoreaktivita; A: pozitivní barevná reakce epiteliálních buněk karcinomu prostaty (Ca) s anti-CRISP 3 protilátkou, * normální žlázy; B: * normální žlázy, PIN = pozitivní reakce epiteliálních buněk v ložisku high-grade PIN (3)

Na základě těchto výzkumů je patrné, že imunohistologická detekce CRISP 3 může být využita nejen k odlišení benigní a nádorově změněné prostatické tkáně, ale i k identifikaci metastáz prostatického původu.

5.3.11. Klasické markery neuroendokrinních buněk

V prostatické tkáni představují neuroendokrinní buňky třetí a minoritní typ epiteliálních buněk. Neuroendokrinní diferenciaci v celé řadě tumorů, včetně nádorů prostaty, je podporována produkty neuroendokrinních buněk. Zvýšení počtu těchto buněk v nádorových ložiscích je spojeno s nádorovou progresí, špatnou prognózou a často rovněž vede ke změnám charakteru tumorů, které se stávají androgen-independentními, tedy obtížně léčitelnými běžně aplikovanou terapií (18).

Neuroendokrinní buňky obsahují neurosekreční granula bohatá na peptidové hormony a biogenní aminy jako serotonin, bombesin a NSE. Tyto produkty neuroendokrinních buněk regulují růst, diferenciaci a sekreční aktivitu epitelů žlázek normální i patologicky změněné prostaty. Parakrinním mechanismem neuroendokrinní buňky podporují nádorový růst, stimuluje angiogenézu v okolí nádorové tkáně a indukují přeměnu nádorových buněk na buňky neuroendokrinního fenotypu.

Mezi klasické markery neuroendokrinních buněk v imunohistochemii patří chromogranin A, neuron specifická enoláza, synaptophysin a v nedávné době objevený secretagoin.

a) Chromogranin A (CgA)

Chromogranin A je kyselý protein přítomný v matrix sekrečních granulí neuroendokrinních buněk.

b) Neuron specifická enoláza (NSE)

Tento enzym má podjednotku α , β a γ , které jsou kódovány různými geny. Každý z jejich pěti dimerických izoenzymů se skládá ze dvou podjednotek. Zatímco játra a kosterní sval exprimují izoenzymy α - α resp. β - β , nervová tkáň obsahuje směs izoenzymů – dva homodimery α - α a γ - γ a jeden heterodimer α - γ . V současné době imunohistochemické metody nedovolí rozlišit neuron specifickou γ - γ a hybridní α - γ enolázu. γ enoláza je téměř výlučně lokalizována v neuronech, zatímco α enoláza se nachází v gliálních, Schwannových, endoteliálních buňkách a neuroblastech. Vysoká hladina enolázy je přítomna v nadledvině, hypofýze a buňkách difúzního neuroendokrinního systému. Je prokazatelná v hladkých svalových buňkách, myoepiteliích, v převodním systému srdečním, v epiteliích Henleovy kličky, lymfocytech, plasmocytech, spermatogoniích, megakaryocytech a krevních destičkách.

c) Synaptophysin (SYN)

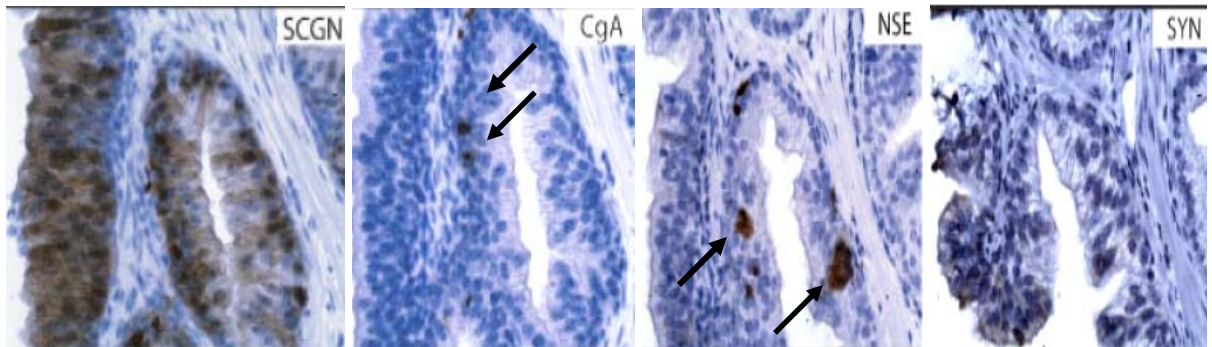
Synaptophysin je membránový protein presynaptických měchýřků neuronu. Nachází se v nervových buňkách centrálního i periferního nervového systému i v buňkách neuroendokrinních. Pro zachování antigenních determinant je optimální alkoholová fixace.

d) Secretagogin

Secretagogin (m.h. 32 kDa) je kalcium vázající protein, který vykazuje homologii s calbindinem D28k a calretininem. Je produktem secretagoginového genu (SCGN) na 6. chromozomu. Expze secretagoginu byla prokázána v neuroendokrinních buňkách a neuronech v CNS (mícha, mozková kůra, mozeček, hypotalamus), v C-buňkách štítné žlázy, v neuroendokrinních buňkách GIT (slinivka břišní, žaludek, tenké a tlusté střevo) a v β -buňkách Langerhansových ostrůvků. Funkce secretagoginu v organismu není dosud zcela známa, pravděpodobně se však podílí na regulaci buněčné proliferace, diferenciaci a inhibici

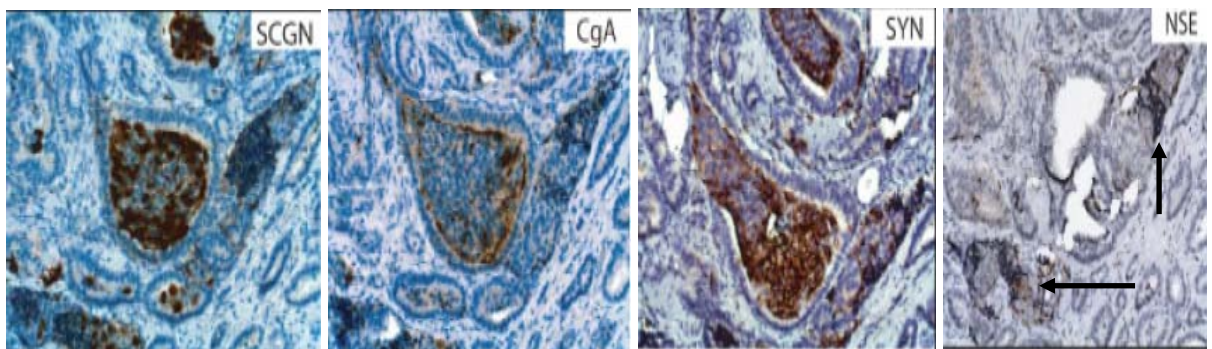
replikace tím, že moduluje Ca^{2+} signál, a to snížením transkripce substance P, a také se spolupodílí na KCl-stimulovaném toku Ca.

Ve studii (1), která se zabývala využitelností secretagoginu v diagnostice nádorů prostaty, byly imunohistochemicky zpracovány formalinem fixované parafínové řezy, získané z biotických vzorků 87 mužů, u nichž byl diagnostikován karcinom prostaty. K porovnání výpovědní hodnoty barvení secretagoginu byly stejné vzorky vyšetřeny i na přítomnost CgA, NSE a SYN. U každého pacienta byly připraveny 4 řezy, na něž byly aplikovány specifické protilátky : polyklonální králičí anti-secretagogin protilátka, monoklonální myší anti-SYN protilátka, polyklonální anti-CgA protilátka a monoklonální anti-NSE protilátka. K detekci byly využity sekundární protilátky konjugované s peroxidázou, jejíž enzymatická aktivita byla vizualizována reakcí s 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridem (Obr. 25, 26).



Obr. 25 Benigní prostatická tkáň, NE buňky se barví tmavě hnědě (1)

SCGN = secretagogin, CgA = chromogranin A, NSE = neuron specifická enoláza, Syn = synaptophysin



Obr. 26 Nádorová prostatická tkáň, NE buňky se barví tmavě hnědě (1)

SCGN = secretagogin, CgA = chromogranin A, NSE = neuron specifická enoláza, Syn = synaptophysin

Ve vzorcích normální prostatické tkáně secretagogin barví solitární neuroendokrinní buňky, které se výjimečně objevují v sousedství epiteliálních buněk nemaligních acinů. Jejich

charakteristická morfolgie a dendritu podobný výběžek usnadňují jejich identifikaci, ačkoli nižší intenzita barevné imunoreakce a nižší rozlišovací schopnost světelného mikroskopu znesnadňují nitrobuněčnou lokalizaci secretagoginu. U vzorků karcinomu prostaty se neuroendokrinní buňky vyskytují ve zvýšené míře a na secretagogin se pozitivně barví jak solitární, tak seskupené buňky; u špatně diferencovaného karcinomu je barvení difúzní. Imunohistologická reakce vykazuje silné barvení, které je silnější v jádře a slabší v cytoplasmě. Vzorky metastáz karcinomu prostaty prokázaly rovněž silnou imunoreaktivitu. Při porovnání exprese secretagoginu v benigní a nádorově změněné prostatické tkáni nebyl však zaznamenán žádný významný trend v poklesu nebo vzestupu intenzity barvení pozitivních buněk. Výsledky této studie lze tedy shrnout do tří základních poznatků :

- a) secretagogin je přítomen v cytoplasmě a jádrech neuroendokrinních buněk benigní i maligní prostaty
- b) secretagogin je ve tkáních lokalizován v neuroendokrinních buňkách a jeho přítomnost koreluje s dalšími markery – CgA, NSE, SYN (Tab. 10), je však skladován v jiných subcelulárních strukturách a procento pozitivních buněk (v normální i maligní tkáni) je výrazně vyšší než u ostatních markerů
- c) exprese secretagoginu neklesá u prostatického adenokarcinomu.

Tab. 10 Co-lokalizace markerů NE buněk

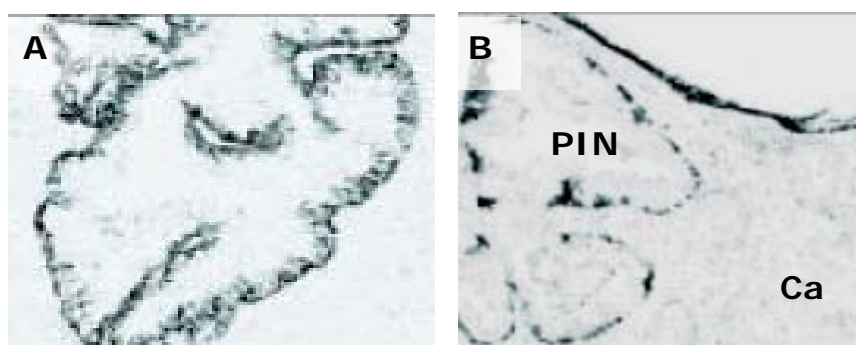
prostatická tkáň	% pozitivních buněk			
	secretagogin	CgA	NSE	SYN
benigní	82%	82%	20%	36%
maligní	71%	39%	59%	55%

5.3.12. Claudin-1

Claudinové (CLDN) geny kódují skupinu více než 23 proteinů, které jsou esenciální v epiteliálních a endoteliálních buňkách pro formaci tight junctions spojů, které mají rozhodující roli v kontrole mezibuněčného transportu a v udržování buněčné polarity (15).

Claudin-1 je integrální membránový protein, jehož exprese je výrazně snížena u řady nádorových onemocnění, včetně rakoviny prostaty. Krajewska a kol. (30) sledovali přítomnost (resp. nepřítomnost) imunohistochemické reakce v řezech prostatické tkáně, na než byla aplikována králičí polyklonální anti-Claudin-1 protilátka. V případě normální

prostatické tkáni, popř. ložisek BHP, byla detekována výrazná pozitivita v oblasti bazálních buněk, zatímco sekretorické epiteliální buňky a stroma zůstaly negativní. Claudin-1 byl rovněž slabě pozitivní v oblastech PIN, kontinuita bazální vrstvy však byla zřetelně porušena. U 98% vzorků prostatického karcinomu nebyla zaznamenána žádná reakce s anti-Claudin-1 protilátkou (Obr. 27).



Obr. 27 Claudin-1 imunoreaktivita; A: normální prostatická žláza; B: vlevo ložisko PIN s pozitivní reakcí bazálních buněk, kontinuita bazální vrstvy je narušena; vpravo adenokarcinom (Ca) prostaty bez barevné reakce (30)

Z uvedeného je patrné, že detekce Claudin-1 proteinu ve vzorcích prostatické tkáni velmi napomáhá v rozlišení normální a maligně změněné tkáni; stejnou výpovědní hodnotu má i v případech, kdy je třeba rozhodnout v diagnóze mezi BHP a adenokarcinomem.

5.3.13. Hypoxia-inducible factor -1 α (HIF-1 α)

Neuroendokrinní buňky v normální prostatické žláze mají četné cytoplazmatické a dendritické výběžky a jsou charakteristické expresí řady různě specifických markerů jako chromograninu A, NSE, synaptophysinu, serotoninu a dalších. Významná je rovněž nízká exprese androgenových receptorů a PSA, které jsou v normální tkáni produkovány výhradně epiteliálními buňkami. Naproti tomu v nádorově změněné prostatické tkáni exprimují androgenové receptory a PSA i neuroendokrinní buňky. Funkce neuroendokrinních buněk v prostatické žláze není dosud zcela objasněna, pravděpodobně však mají podíl na růstu prostatické tkáni v postnatální periodě. V případě maligních změn je obvyklé zvýšení počtu neuroendokrinních buněk, které mohou ovlivňovat růst a proliferaci epiteliálních buněk zejména produkcí řady látek, které působí jak autokrinně tak parakrinně. V současné době byl prokázán vliv některých působků neuroendokrinních buněk na angiogenézu a zvýšení počtu

mikrokapilár v okolí nádorového ložiska. Jedním z nejdůležitějších faktorů zvyšujících tvorbu kapilár je vascular endothelial growth factor (VEGF), který je ve zvýšené míře exprimován v nádorových buňkách pod vlivem transkripčního faktoru označovaného jako hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1).

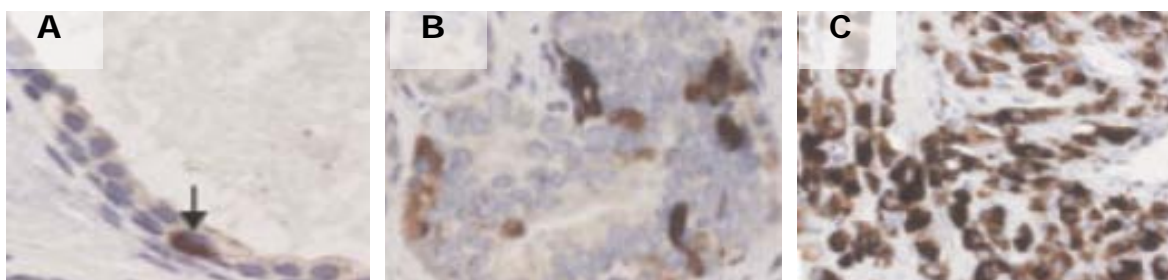
HIF-1 je esenciální pro adaptaci nádorových buněk na hypoxii a je aktivován v buňkách většiny nádorů a jejich metastáz. Svým působením indukuje angiogézu a aktivuje anaerobní metabolismus. Rychlý růst maligních tumorů vyžaduje tvorbu nových kapilár k zajištění metabolických požadavků, avšak nekoordinovaná neoangiogéza vede často k tvorbě špatně rozvinuté kapilární sítě, což vysvětluje výskyt hypoxických oblastí u většiny solidních tumorů.

HIF-1 je heterodimer tvořený α a β podjednotkou. Během normoxie je α podjednotka degradována v proteasomech speciálními hydrolázami, které ke své činnosti vyžadují kyslík. Pokud dojde k hypoxii, účinek hydroláz je utlumen a dochází ke stabilizaci HIF-1 α a dimerizaci s HIF-1 β , čímž vzniká aktivní HIF -1, který stimuluje transkripci faktorů nezbytných pro adaptační reakce.

Zhong a kol. (61) studovali imunohistochemickou reaktivitu 13 vzorků normální prostaty, 28 vzorků BHP a 34 vzorků prostatického karcinomu s anti-HIF-1 α protilátkou a prokázali, že vzorky normální tkáně se nebarvily, zatímco u BHP a karcinomu byla pozorována silná pozitivita. Rovněž u 14 z 15 high-grade PIN lézí došlo k imunoreakci, což dokazuje, že zvýšená exprese HIF-1 α se objevuje již v časných stádiích prostatické karcinogézy, díky čemuž by mohl být tento marker využitelný v monitoringu pre-maligních lézí prostaty.

V roce 2007 byly zveřejněny výsledky nového výzkumu zaměřeného na lokalizaci a expresi HIF-1 v benigní a maligní prostatické tkáni (40), které potvrdily zvýšení počtu neuroendokrinních buněk v nádorových a high-grade PIN lézích (Obr. 28B,C) a jejich pozitivní imunoreaktivitu s monoklonálními a polyklonálními anti-HIF-1 α protilátkami, současně však byla prokázána slabě pozitivní reakce i u neuroendokrinních buněk normální prostatické tkáně (Obr. 28A), což snižuje výpovědní hodnota tohoto markeru ve vztahu

k odlišení normální a nádorové tkáně, je však nadále cenným ukazatelem neoangiogenézy v tumorových ložiscích.

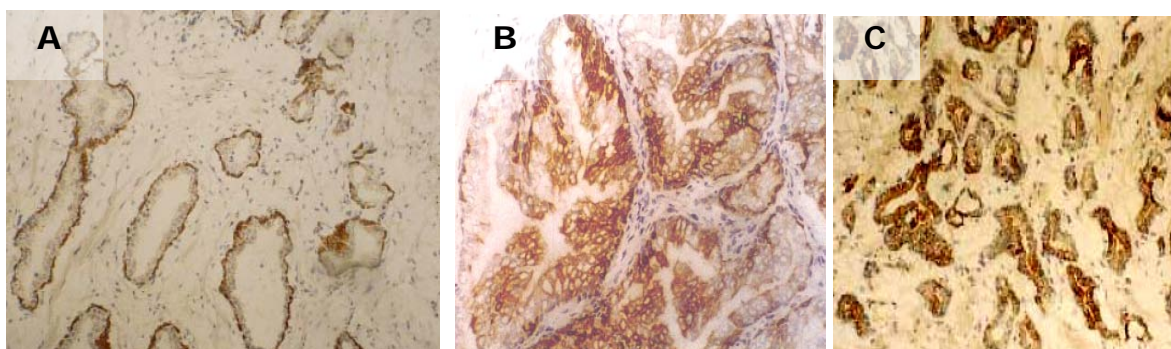


Obr. 28 HIF-1 α imunoreaktivita; A: normální prostatická tkáň s jednou pozitivní buňkou; B: pozitivita high-grade PIN; C: pozitivita karcinomu prostaty (40)

5.3.14. Interleukin 6 a receptory pro interleukin 6

V regulaci prostatického růstu a rovněž v rozvoji adenokarcinomu prostaty se uplatňují četné interakce mezi epiteliálními a stromálními buňkami. Růstové faktory a cytokiny produkované buňkami stromatu parakrinně ovlivňují růst epitelů. Mezi tyto cytokiny patří i interleukin-6 (IL-6), který aktivuje androgenové receptory, klíčové transkripční faktory prostaty, čímž reguluje expresi a sekreci prostatických specifických proteinů.

Podrobnému studiu byla podrobena přítomnost a míra exprese jak IL-6, tak receptorů pro IL-6 v benigní i maligní prostatické tkáni (16). V případě IL-6 byla na histologické řezy aplikována monoklonální anti-IL-6 protilátka, díky níž byla odhalena přítomnost IL-6 v cytoplasmě epiteliálních buněk normální, preneoplastické i maligní prostatické tkáně (Obr. 29), přičemž u PIN a adenokarcinomu byl počet imunoreaktivních buněk a intenzita jejich barvení výrazně vyšší než u normální tkáně (Tab. 11).

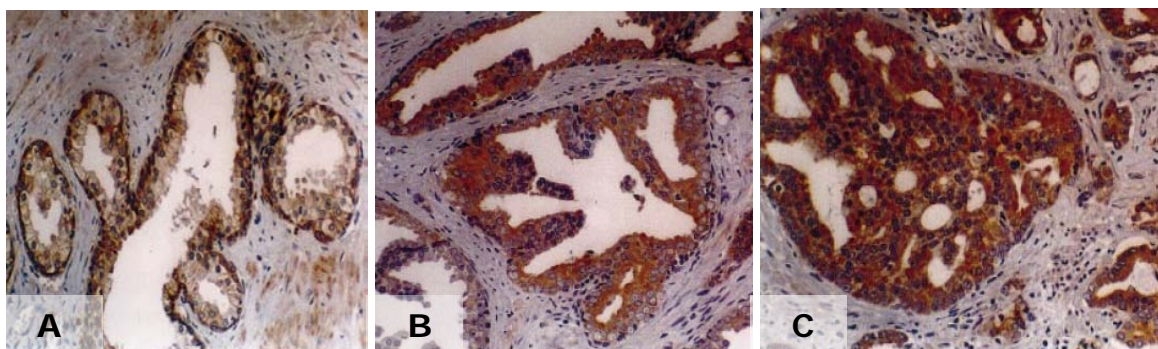


Obr. 29 IL-6 imunoreaktivita; A: normální prostatická tkáň s barevnou reakcí v oblasti bazálních buněk; B: high-grade PIN s pozitivními atypickými intraluminálními buňkami; C: pozitivita karcinomu prostaty (16)

Tab. 11 Počet vzorků s imunoreaktivními buňkami, intenzita barvení

IL-6		počet vzorků	% pozitivních buněk			
typ tkáně			0%	< 10%	10-50%	> 50%
normální	bazální b.	6	-	-	-	6
	sekreční b.	6	-	6	-	-
	stroma	6	6	-	-	-
PIN		3	-	-	-	3
maligní	Gleason skóre 2	2	-	2	-	-
	Gleason skóre 3	12	-	-	6	6
	Gleason skóre 4	6	-	1	1	4
	Gleason skóre 5	3	-	-	2	1

K detekci IL-6 receptorů ve stejných vzorcích byla použita polyklonální protilátka, která potvrdila přítomnost receptorů v bazálních buňkách normální tkáně a rovněž v epiteliálních buňkách všech vzorků PIN a karcinomu prostaty (Obr. 30, Tab. 12).



Obr. 30 Detekce IL-6 receptorů; A: normální prostatická tkáň; B: high-grade PIN; C: nádor prostaty (16)

Tab. 12 Počet vzorků s imunoreaktivními buňkami, intenzita barvení

receptory IL-6		počet vzorků	% pozitivních buněk			
typ tkáně			0%	< 10%	10-50%	> 50%
normální	bazální b.	11	-	6	1	4
	sekreční b.	11	1	5	5	-
	stroma	11	-	-	4	7
PIN		12	-	-	2	10
maligní	Gleason skóre 2	4	1	3	-	-
	Gleason skóre 3	15	-	-	3	12
	Gleason skóre 4	10	1	1	-	8
	Gleason skóre 5	3	-	-	1	2

5.3.15. S100 proteiny – S100A8, S100A9

S 100 proteiny představují skupinu kalcium vázajících proteinů, které jsou v organismu produkovány expresí specifického genu na chromozomu 1. Jejich jméno bylo odvozeno na základě jejich 100% rozpustnosti v nasyceném roztoku amonium sulfátu. Svou molekulovou hmotností 9-13kDa se řadí do skupiny nízkomolekulárních proteinů (39).

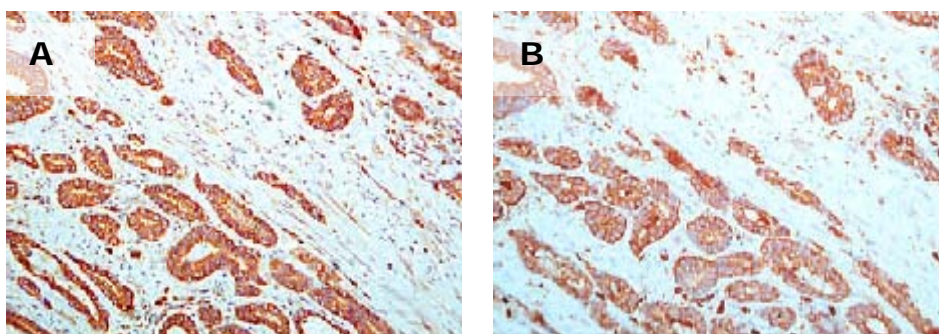
S100A8 (kalgranulin A) a S100A9 (kalgranulin B) proteiny byly poprvé identifikovány v neutrofilech a makrofázích a byla popsána jejich účast ve vyžívání myeloidních buněk a v zánětlivých reakcích organismu. Proteiny tvoří heterokomplex, který je uvolňován aktivovanými monocyty. Expres S100A8 a S100A9 byla, ve vztahu k epitelialním tkáním, poprvé zaznamenána ve skvamózních epiteliích, později byla popsána asociace S100 proteinů s adenokarcinomy. Imunohistochemické analýzy ukázaly, že S100A9 protein je exprimován u hepatocelulárního karcinomu, plicního adenokarcinomu a invazivního duktálního karcinomu prsu. U pacientů s rakovinou vaječníků byly nalezeny zvýšené koncentrace S100A8 a S100A9 v cystické tekutině a v séru.

Vztahem S100A8 a S100A9 a jejich exprese k maligním změnám prostatické tkáně se zabýval Hermani a kol. (14), kteří použili 75 vzorků tkání, získaných od pacientů s diagnózou karcinomu prostaty. Imunohistochemická analýza spočívala v aplikaci specifické králičí polyklonální anti-S100A8 a specifické myší monoklonální anti-S100A9 protilátky na série 4 μ m silných řezů prostatické tkáně. Pozitivní reakce prokázala rozsáhlou expresi S100A8 v 58 (77%) a S100A9 v 51 (68%) ze 75 vzorků. Oba proteiny prokázaly signifikantní up-regulaci (zvýšenou expresi) v porovnání s benigní prostatickou tkání (Tab. 13).

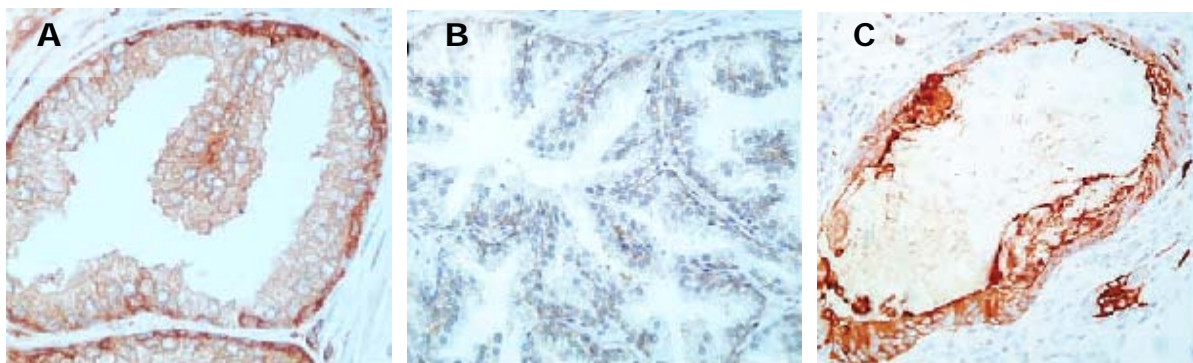
Tab. 13 Expres S100 proteinů v prostatické tkáni

typ tkáně		počet vzorků	počet S100A8 pozitivní vzorků (%)	počet S100A9 pozitivních vzorků (%)
benigní prostatická		48	7 (15%)	5 (10%)
PIN		18	8 (44%)	8 (44%)
maligní	Gleason skóre 5-6	24	15 (63%)	14 (58%)
	Gleason skóre 7	19	13 (68%)	9 (47%)
	Gleason skóre 8-10	32	28 (88%)	28 (88%)

U sériových řezů bylo patrné překrývání exprese obou proteinů v nádorových ložiscích, což dokazuje jejich lokalizaci ve stejných buněčných strukturách (Obr. 31). Pozitivní reakce byla odhalena i u 8 z 18 případů PIN, čímž je potvrzen zvýšený výskyt S100 proteinů u prekancerózních lézí (Obr. 32C). S100A8 a S100A9 exprese byla detekována u jednotlivých benigních prostatických žlázek v sousedství nádorové tkáně; u těchto žlázek je barevná reakce soustředěna do oblasti bazálních buněk (Obr. 32A). Benigní hyperplastické žlázy zůstaly bez reakce, popřípadě pouze se slabě pozitivní reakcí (Obr. 32B).



Obr. 31 Sériový řez; A: pozitivita S100A8 v ložisku adenokarcinomu; B: pozitivita S100A9 v ložisku adenokarcinomu (14)



Obr. 32 S100A9 imunoreaktivita; A: S100A9 pozitivní bazální buňky benigní žlázy v sousedství karcinomu; B: S100A9 negativní benigní hyperplastické žlázy; C: imunopozitivita PIN (14)

5.3.16. Prostate-specific human kallikrein 2 (hK2)

Kalikeiny jsou serinové proteázy, které štěpí argininové vazby a podílejí se tak na posttranslačních úpravách polypeptidů, z nichž vznikají biologicky aktivní proteiny. Lidský genom obsahuje na 19. chromozomu tři kalikreinové geny, které kódují tři proteiny : pankreatický/slinný/ledvinový gen označovaný hK1 je spojen s produkcí hK1 proteinu,

glandulární kalikreinový-1 gen (hK2) svou expresí řídí tvorbu hK2 a hK3 gen zodpovídá za tvorbu hK3 proteinu, který je známější jako prostatický specifický antigen (PSA).

hK2 je stejně jako PSA specifický pro prostatickou tkáň, přičemž jeho exprese je regulována účinkem androgenů. Izolace nativního hK2 proteinu (9) vedla k vytvoření specifické monoklonální protilátky proti hK2, která byla následně využita v imunohistologické analýze prostatické tkáně.

Specifita hK2 pro prostatickou tkáň byla demonstrována studií (60) s využitím monoklonální anti-hK2 protilátky. hK2 je v prostatické tkáni produkován epiteliálními buňkami, zatímco buňky stromatu tento protein neexprimují. Imunoreakce byla rovněž negativní u vzorků jiné než prostatické tkáně (ledviny, slinivka břišní).

Tremblay a kol. (55) ve své studii porovnávali expresi hK2 a hK3 v 70 vzorcích prostatických karcinomů, u nichž byl stanoven grading na základě M.D. Anderson Hospital grading systému (5). V případě tkání z ložisek BHP či tumorů třídy I se jevila intenzita barvení a lokalizace barevné reakce stejná u obou markerů (100% shoda). Podobnost intenzity barvení u tumorů vyšších tříd klesala na 66% u nádorů třídy II, 75% u nádorů třídy III a 72% u nádorů třídy IV, přesto je ale hK2 důležitým histologickým markerem, jehož využití při analýze vzorků prostatické tkáně může poskytnout cenné informace v diagnostice a charakterizaci nádorů prostaty.

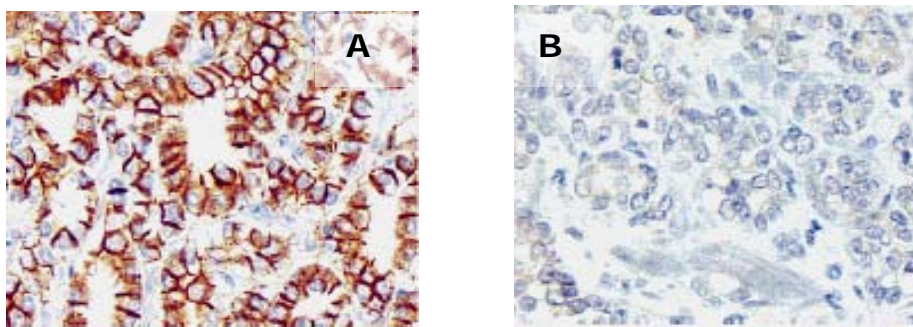
5.3.17. E-kadherin

Kadheriny jsou Ca^{2+} dependentní transmembránové glykoproteiny, které se pomocí homotypické vazby (tj. vazby s dalšími molekulami kadherinu) účastní tvorby mezibuněčných spojení. Pro funkčnost buněčného adhezivního komplexu je mimořádně důležitá heterofilní vazba kadherinů s kateniny, intracelulárními proteinovými molekulami. Poruchy kadheriny zprostředkované buněčné adheze se podílí na procesu tumorigeneze a významně ovlivňují progresi nádorového bujení, neboť v souvislosti se ztrátou adhezivních

vlastností buněk v primárním nádorovém ložisku může dojít ke zvýšení agresivity, invazivity a metastatického potenciálu nádoru.

Gen pro E-kadherin (m.h. 120 kDa) je lokalizován na 16. chromozomu a jeho expresí dochází k tvorbě proteinu se třemi doménami : extracelulární- N-terminální, hydrofobní transmembránovou a C-terminální cytoplazmatickou doménou. Extracelulární doména obsahuje vazebné místo pro selektivní Ca^{2+} dependentní homotypickou vazbu kadherinové molekuly na přilehlých buňkách a intracelulární doména obsahuje vazebné místo pro nekovalentní vazbu kateninů. E-kadherin je exprimován v různé míře na všech epitelových tkáních organismu. Snížení či ztráta exprese E-kadherinu byla popsána u velkého množství nádorů, např. u nádorů gastrointestinálního traktu, v nádorech plic, jater, močového měchýře, u karcinomu mléčné žlázy a u adenokarcinomu prostaty.

Kallakury a kol. (27) sledovali změny exprese u 118 vzorků prostatických adenokarcinomů různého gradingu. Vazba specifické monoklonální myši anti-E-kadherin protilátky byla detekována sekundárním biotinylovaným imunoglobulinem. V okrcích benigní prostatické tkáně se projevila charakteristická membránová pozitivita; u všech prostatických karcinomů koreloval pokles exprese E-kadherinu s gradingem, stagingem a ploiditou jádra (Obr. 33).



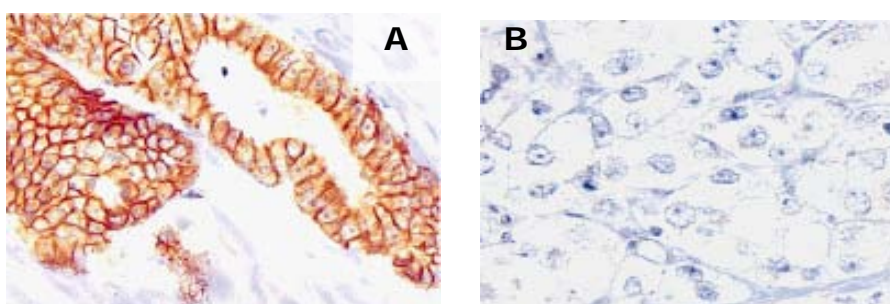
Obr. 33 E-kadherin imunoreaktivita; A: pozitivní reakce low-grade nádorového ložiska; B: negativní reakce high-grade nádorového ložiska (= snížení exprese E-kadherinu) (27)

5.3.18. α, β, γ – kateniny

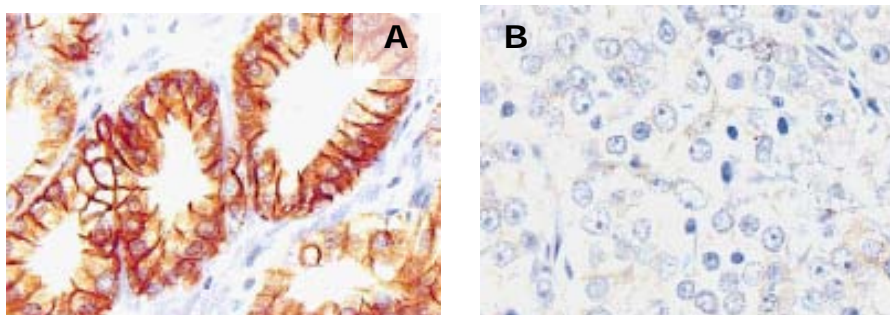
Kateniny jsou intracelulární proteinové molekuly, které zprostředkovávají vazbu E-kadherinu se sítí aktinových filament, čímž stabilizují mezibuněčné spoje.

Gen pro α -katenin (m.h. 102 kDa) se nachází na 5. chromozomu, gen pro β -katenin (m.h. 92 kDa) na 3. chromozomu, γ -katenin (plakoglobin) je kódován genem na chromozomu 11. Na molekulu E-kadherinu se přímo váže buď katenin β nebo γ , na něj se následně váže α -katenin, který zprostředkuje vazbu kadherin-kateninového komplexu s aktinovými mikrofilamenty. Tento komplex se díky vazbě na intracelulární cytoskeletální komponenty podílí na indukci genové exprese, buněčné diferenciaci, na distribuci cytoplazmatických proteinů a na kontrole buněčné proliferace.

U vzorků prostatického karcinomu dochází k poklesu exprese všech tří faktorů v souvislosti s rostoucí hodnotou Gleasonského skóre (Obr. 34,35).



Obr. 34 Imunoreaktivita α -kateninu; A: pozitivní reakce s anti- α -katenin protilátkou u low-grade nádorového ložiska; B: negativní reakce s anti- α -katenin protilátkou u high-grade nádorového ložiska (= snížení exprese α -kateninu) (27)



Obr. 35 Imunoreaktivita β -kateninu; A: pozitivní reakce s anti- β -katenin protilátkou u low-grade nádorového ložiska; B: negativní reakce s anti- β -katenin protilátkou u high-grade nádorového ložiska (= snížení exprese β -kateninu) (27)

Byla prokázána korelace mezi poklesem exprese α -kateninu a dediferenciací, infiltrativním růstem a metastazováním prostatického karcinomu. Změny v expresi β -kateninu vedou k nepatřičné aktivaci transkripčních faktorů, onkogenů a regulátorů buněčného cyklu, což má za následek proliferaci nádorových buněk.

5.3.19. δ – katenin

δ – katenin je protein asociovaný s adhezivními mezibuněčnými spoji a je vazebným partnerem presenilinu 1, proteinu spojovaného s progresí Alzheimerovy choroby. δ – katenin vykazuje 69% homologii s desmosomálním proteinem p0071 a 48% homologii s p120^{ctn}. Molekula δ – kateninu (m.h. 133kDa) je tvořena 1225 aminokyselinami. δ – katenin interaguje s klasickými kadheriny a váže se na jejich juxtamembránovou doménu (37).

δ – katenin je produkován zejména v nervové tkáni, přičemž nejvyšší úroveň exprese dosahuje v tkáni mozku v době jejího vývoje. Nedávno publikované práce prokázaly, že kromě nervové tkáně je δ – katenin exprimován v sekretorických epiteliálních buňkách a jeho zvýšená exprese mění morfologii buněk; ačkoli nepřispívá ke zvýšení buněčné proliferace, podporuje buněčnou motilitu indukovanou růstovým faktorem (7).

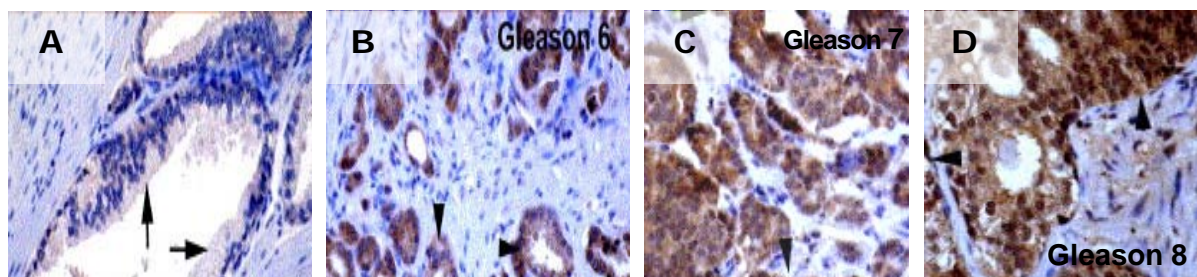
Qun a kol. (36) vypracovali imunohistochemickou studii, v níž bylo prověřeno 90 vzorků benigní prostatické tkáně a 90 vzorků prostatického karcinomu, a která měla potvrdit či vyvrátit, že exprese δ – kateninu koreluje se ztrátou regulace a redistribucí E-kadherinu a p120^{ctn}. Z tkáňových bločků byly připraveny u každého pacienta tři 5 μ m silné řezy, na než byla aplikována specifická králičí anti- δ -katenin, myší anti-E-kadherin či anti- p120^{ctn} protilátka. Streptavidin-biotinová reakce byla detekována s využitím diaminobenzidinu jako substrátu. Rozsah a intenzita imunoreakce na řezech byly zhodnoceny semikvantitativně a na základě těchto hodnot bylo pro každý vzorek stanoveno tzv. imunoskóre. Hodnoty semikvantitativního skóre ukázaly, že imunoreaktivita δ -kateninu v benigních vzorcích (2,52 \pm 0.04) je podstatně nižší než u prostatických adenokarcinomů (7,58 \pm 0.05) (Tab . 14).

Tab. 14 Imunoreaktivita δ -kateninu

	Imunoskóre		
	karcinom > benigní tkáň	karcinom = benigní tkáň	karcinom < benigní tkáň
počet vzorků (%)	55/65 (85%)	6/65 (9%)	4/65 (6%)

Při optické analýze jednotlivých preparátů bylo patrné, že anti- δ -katenin imunoreakce je velmi slabá u vzorků benigní prostatické tkáně (Obr. 36A δ). Rostoucí δ -katenin imunoreaktivita byla prokázána u high-grade PIN. V případě prostatických adenokarcinomů s nízkým gradingem je barevná reakce lokalizována do sekretorických epiteliálních buněk;

počet δ -katenin-positivních buněk pak výrazně roste u vzorků adenokarcinomů s vyšším gradingem (Gleason skóre 7 a 8) (Obr. 36B-D).



Obr. 36 Imunoreaktivita δ -kateninu; A: benigní žlázy bez reakce; B: adenokarcinom Gleason skóre 6; C: adenokarcinom Gleason 7; D: adenokarcinom Gleason 8 (36)

Porovnáním imunoskóre všech tří stanovovaných antigenů δ -katenin, E-kadherin, p120^{ctn}) došlo k potvrzení hypotézy, že ve vzorcích benigní tkáně je expresí δ -kateninu výrazně nižší než exprese E-kadherinu a p120^{ctn}. U prostatických adenokarcinomů pak klesá exprese E-kadherinu a p120^{ctn}, zatímco intenzita imunoreakce a počet δ -katenin-positivních buněk roste (Tab . 15).

Tab. 15 Porovnáním imunoskóre všech tří stanovovaných antigenů (δ -katenin, E-kadherin, p120^{ctn})
ims.= imunoskóre

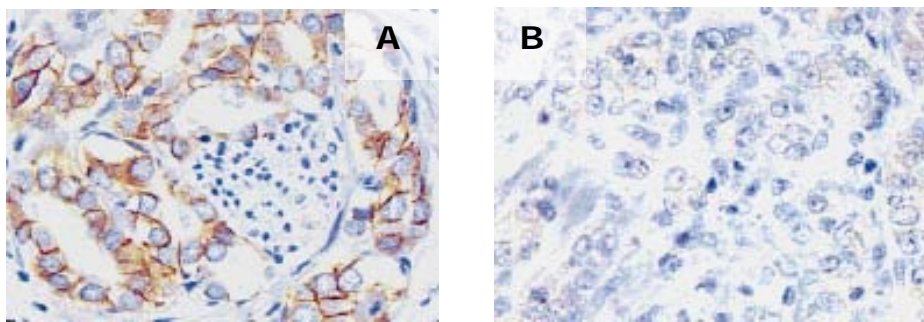
marker	Imunopozitivita					
	Benigní prostatická tkáň			Adenokarcinom prostaty		
	silná (ims. > 2)	střední (ims. = 2)	slabá (ims. < 2)	silná (ims. > 2)	střední (ims. = 2)	slabá (ims. < 2)
δ -katenin	10/65 (15%)	6/65 (9%)	49/65 (75%)	46/72 (64%)	20/72 (28%)	6/72 (8%)
E-kadherin	64/71 (90%)	4/71 (6%)	3/71 (4%)	39/89 (44%)	20/89 (22%)	30/89 (34%)
p120 ^{ctn}	71/71 (100%)	0/71 (0%)	0/71 (0%)	62/88 (70%)	8/88 (9%)	18/88 (21%)

S rostoucím gradingem nádorových ložisek dochází nejen k růstu intenzity a rozsahu imunoreakce s anti- δ -katenin protilátkou, ale i k redistribuci E-kadherinu a p120^{ctn}. U low-grade adenokarcinomů (Gleason skóre 6) je v centrální části nádorového ložiska lokalizován δ -katenin, E-kadherinu i p120^{ctn} v oblasti mezibuněčných spojů, zatímco v periferní oblasti je δ -katenin uložen mimo spoje a signál E-kadherinu a p120^{ctn} je soustředěn více v cytoplazmě. U high-grade karcinomů (Gleason skóre 10) vykazuje anti- δ -katenin imunoreaktivita výrazné barvení mimo spoje a reakce E-kadherinu a p120^{ctn} se z oblasti mezibuněčných spojů zcela vytrácí, popřípadě dochází k redistribuci signálu do cytoplazmy.

5.3.20. p120^{ctn}

Protein p120^{ctn} je součástí kadherin-kateninového komplexu a podílí se tak na udržování buněčné adheze.

V první studii, která se zabývala expresí p120^{ctn} u nádorových onemocnění prostaty (26), byla provedena imunohistologická studie s anti-p120^{ctn} protilátkou na 112 vzorcích prostatických adenokarcinomů. Pokles exprese p120^{ctn} byl zaznamenán u 49% (55/112) pacientů a koreloval s gradíngem (Obr. 37), stagingem a ploeditou jádra, stejně jako s poklesem exprese E-kadherinu, α -kateninu a CD44. Míra snížení exprese CD44 odpovídala vzrůstu předoperačních hodnot PSA v séru.



Obr. 37 Imunoreaktivita p120^{ctn}; A: pozitivní imunoreaktivita u low-grade adenokarcinomu prostaty; B: ztráta imunoreakce s anti-p120^{ctn} protilátkou (= snížení exprese p120^{ctn}) (27)

V podobné studii 118 prostatických adenokarcinomů (27) byla popsána snížená exprese p120^{ctn} u 45% tumorů. Důležitým poznatkem je, že podíl tumorů, u kterých došlo k poklesu p120^{ctn} (45%), je výrazně vyšší než v případě poklesu E-kadherinu (25%), α -kateninu (17%) a β -kateninu (4%), což dokazuje, že k poklesu p120^{ctn} dochází dříve a u časnějších stádií než u ostatních proteinů kadherin-kateninového komplexu.

Souvislost mezi poklesem p120^{ctn}, který se projevuje již na počátku progresu nádorového onemocnění, a nárůstem sérové hladiny PSA je zajímavá zejména z klinického hlediska, protože PSA je v současné době nejužívanějším markerem k detekci časných stádií nádorového onemocnění prostaty, avšak u některých pacientů tento screening selhává, a proto jsou neustále hledány nové markery, které by mohly napomáhat ke stanovení přesnější a správnější diagnózy.

**6. ROZLIŠENÍ KARCINOMU PROSTATY
A BENIGNÍ HYPERPLÁZIE PROSTATY**

Močové obtíže způsobené onemocněním prostaty a jejich následky byly známy již několik tisíc let před naším letopočtem, o čemž svědčí nález kamenů v močovém měchýři u egyptských mumií. O nádorovém onemocnění prostaty se poprvé zmínil v roce 1832 Benjamin Bordie, který referoval o dvou případech diseminovaného karcinomu prostaty. Oba pacienti měli prostatu „tvrdou jako kámen“ a kostní metastázy s neurologickou symptomatologií. Vzhledem k tomu, že prostatická onemocnění vytvářejí překážku močovému proudu, bylo v minulosti jedním ze způsobů, jak tuto překážku odstranit, používání např. bambusových, později kovových či pryžových sond. V roce 1893 byla Youngem provedena první operace prostaty, a tím chirurgicky odstraněna překážka ve vývodných cestách močových. V současné době patří k nejčastějším onemocněním prostaty benigní hyperplázie a adenokarcinom, jejichž vzájemné bezpečné rozlišení je rozhodující pro zahájení vhodné léčby, která by v případě karcinomu pacientovi zachránila život a u hyperplázie by napomohla k redukci nepříznivých projevů, které toto onemocnění doprovázejí.

6.1. Stručná charakteristika benigní hyperplázie prostaty (BHP)

Benigní hyperplázie prostaty (BHP) je nezhoubné zbytnění tkáně prostaty, přičemž hyperplázie postihuje jak žlázovou, tak i stromální složku. Jde o velmi častý nález u populace starších mužů – ve věkovém rozmezí 50-60 let se zvětšení prostaty objevuje u 50% pacientů, ve věku nad 80 let u více než 90% pacientů. Etiologie onemocnění nebyla dosud zcela odhalena, přesto se předpokládá výrazný vliv perzistující androgenní stimulace působící za současné estrogenní stimulace na růst prostatické tkáně.

Soubor klinických symptomů charakterizovaný typickými prostatickými obtížemi je nazýván symptom dolních močových cest („low urinary tract symptoms“ - LUTS). Onemocnění benigní hyperplázií prostaty prochází několika stadii. První stadium představují typické mikční potíže, slabší proud moče, prolongovaná a přerušovaná mikce, línější proud, nykturie (častější močení v noci) a někdy urgentní mikce. Hypertrofie detruzoru zatím

kompenzuje zvýšený infravezikální odpor. Ve druhém stadiu se obtíže zvětšují. Frekvence nykturie se zvyšuje až na 5 - 10 mikcí za noc, objevuje se pocit neúplného vyprázdnění měchýře po vymočení. Sonograficky můžeme zaznamenat výraznější hypertrofii detruzoru a různě velké reziduum moče po mikci jako známky dekompenzace stavu. Třetí stadium je kompletní retence moče. Chronická retence moče má za následek oboustrannou ureterohydronefrózu s rozvojem renální insuficience. Výsledkem nerozpoznané a neléčené BHP může být selhání ledvin s fatálními následky. Benigní hyperplázie prostaty je stále příčinou smrti u 16 - 36 nemocných/100 000 mužů starších 45 let.

V převážné většině případů hyperplázie postihuje centrální část prostaty, tzv. preprostatickou zónu obklopující proximální segment uretry v oblasti mezi verum montanum a krčkem močového měchýře. Prostata je zvětšená a v extrémních případech dosahuje hmotnosti více než 300g. Hyperplastické uzly jsou tvořeny hyperplastickými žlázkami, jež vystýlá vysoký cylindrický epitel, nebo jsou hlavní složkou nodulů protáhlé buňky stromatu a pojivové tkáně. Často se objevují papilární proliferace do lumina žlázek, v nichž je patrný zahuštěný sekret, který tvoří oválné útvary – corpora amylacea. Navzdory převažující lokalizaci v periuretrální oblasti, existují i případy, kdy se uzly (noduly) hyperplastické tkáně vyskytují v periferní zóně prostaty a napodobují tak palpačně i ultrasonograficky karcinom.

6.2. Doporučený postup vyšetření v diagnostice onemocnění prostaty

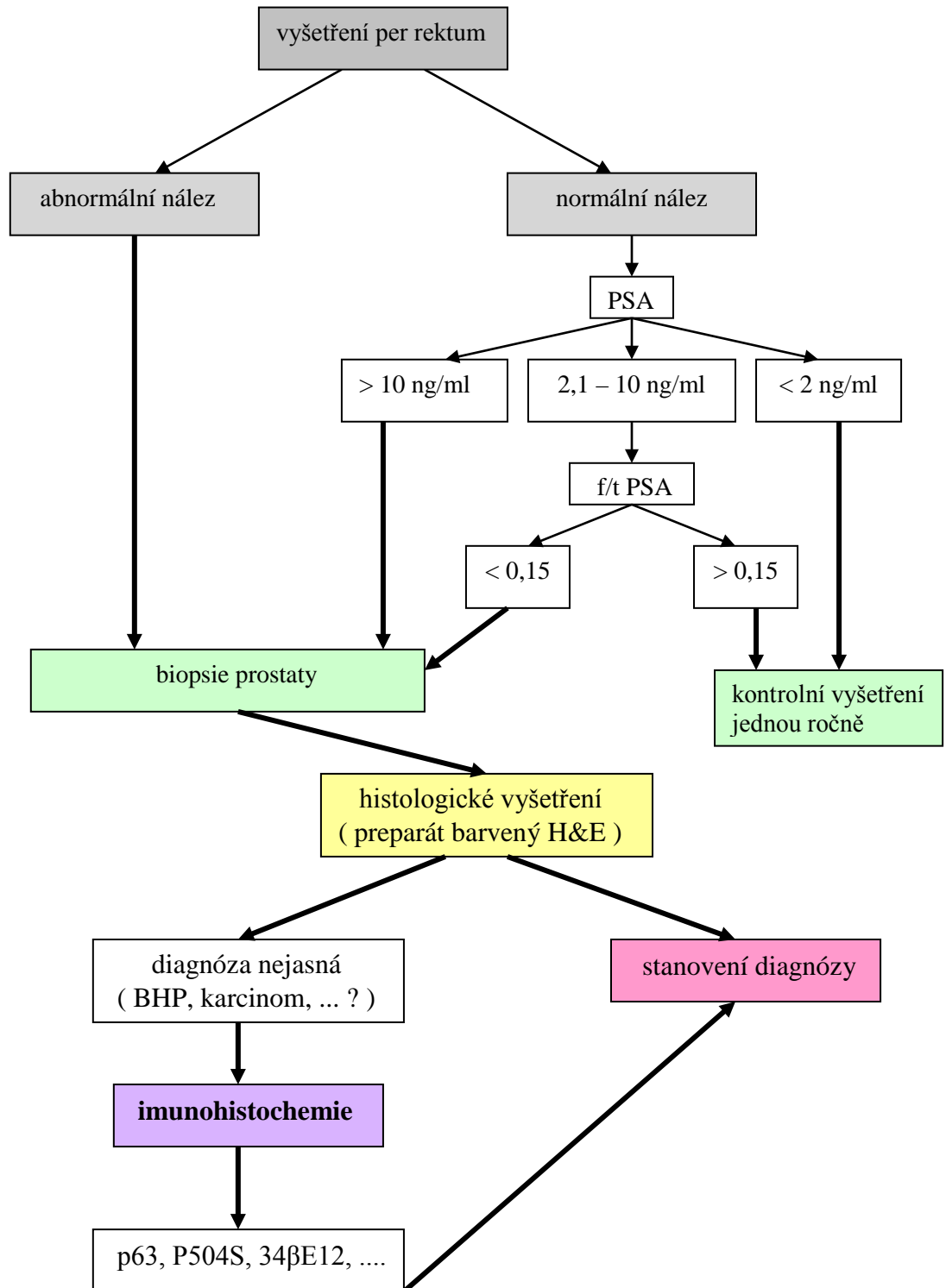
Na diagnostice onemocnění prostaty by se měl podílet jak praktický lékař, tak urolog. Praktický lékař přichází s nemocným do kontaktu častěji a cílenými dotazy může onemocnění dříve rozeznat a doporučit specializované vyšetření v urologické poradně. Muž nad 50 let (s genetickou zátěží nad 40 let) by měl být jednou za rok vyšetřen per rektum a měla by mu být stanovena hodnota prostatického specifického antigenu (PSA) v krvi.

Při vyšetření per rektum pacientů s benigní hyperplázií může být prostata až několikanásobně zvětšená, hladká, ohraničená, symetrická, nebolestivá a konzistence je spíše elastická; nádorově změněná prostata bývá zvětšená, hrbolatá, tvrdá, asymetrická,

nebolestivá, někdy špatně ohraničená proti okolí. Jakýkoliv abnormální nález při vyšetření per rektum je signálem k urychlenému provedení odběru vzorku prostatické tkáně, nejčastěji pomocí punkční jehlové biopsie, pro histologické vyšetření.

Při stanovení sérové koncentrace PSA je hodnota do 2 ng/ml hodnocena jako normální, naproti tomu koncentrace vyšší než 10 ng/ml je důvodem k histologické analýze vzorku prostatické tkáně. Pokud je hladina PSA stanovena v rozmezí od 2,1 ng/ml do 10 ng/ml, měl by být nemocný vyšetřen urologem transrektální ultrasonografií (TRUS) k posouzení architektury tkáně prostaty a biochemické vyšetření by mělo být doplněno o stanovení volné frakce PSA.

Vzorek tkáně k histologickému vyšetření se odebírá transrektálně speciální bioptickou pistolí za sonografické kontroly. Odebírá se z podezřelé léze při vyšetření per rektum nebo z podezřelého nálezu při TRUS. U nemocných, kde suspektní morfologický nález chybí a mají zvýšené hodnoty PSA, je indikována úhlová vějířová biopsie s odběrem řady vzorků z obou laloků prostaty a semenných váčků. Je-li výsledek mikroskopického vyšetření negativní a přetrvává vyšší hodnota PSA, je třeba bioptické vyšetření v odstupu 3 - 6 měsíců opakovat. Při vyšetření se doporučuje dodržovat základní algoritmus (Obr. 38), který zaručuje vysokou pravděpodobnost záchytu karcinomu prostaty a spolehlivé odlišení BHP a karcinomu prostaty.



Obr. 38 Algoritmus diagnózy karcinomu prostaty a diferenciální diagnostiky karcinomu prostaty a BHP

6.2.1. Stanovení sérové koncentrace PSA

Prostatický specifický antigen je lidský kalikrein, glykoprotein o molekulové hmotnosti 33 kDa s aktivitou neutrální serinové proteázy. PSA je secernován epiteliálními buňkami prostaty lemujícími aciny a dukty prostatické tkáně. Vyskytuje se především ve spermatu, kde je jeho koncentrace velmi vysoká (0,2-0,5 mg/ml); nejvyšší koncentrace PSA v těle je v lumen acinů. Aby se PSA dostal do krevního oběhu, musí překonat významnou bariéru mezi prostatickým lumen a kapilární krví, zahrnující prostatickou bazální membránu, stroma, kapilární bazální membránu a kapilární endoteliální buňky.

Stanovení sérové koncentrace celkového (total, tPSA) PSA je jedním ze základních pilířů screeningových vyšetření v detekci karcinomu prostaty. Hranice referenční hodnoty byla arbitrárně stanovena na mezinárodně uznávanou hodnotu 4 ng/ml; v současné době však s vědomím, že až 20 % pacientů s karcinomem prostaty má hladinu PSA nižší než 4 ng/ml.

Senzitivita PSA je ve vztahu k detekci karcinomu prostaty uváděna mezi 68-80 % a specifita mezi 49-90 %. Hledaly a hledají se proto další způsoby, jak zvýšit senzitivitu a specifitu PSA vyšetření a zpřesnit tak diagnostiku karcinomu prostaty.

PSA existuje v séru ve 2 formách - volný a vázaný s alfa-1-antichymotrypsinem. Koncentrace a poměr těchto forem se liší u maligních a benigních onemocnění, což reprezentuje další významný pokrok v diagnostice časného, potenciálně kurabilního karcinomu prostaty a jeho odlišení od benigní hyperplázie prostaty. V případě benigního onemocnění je v séru vyšší podíl volné (free) formy PSA (fPSA) než u pacientů s karcinomem, z čehož vyplývá, že i poměr volný/celkový prostatický specifický antigen (f/t PSA) je u pacientů s karcinomem prostaty signifikantně nižší, než u pacientů s benigní hyperplázií prostaty. Pokud je tedy při screeningovém vyšetření u pacienta stanovena zvýšená hodnota celkového PSA, je vhodné provést rovněž vyšetření na stanovení koncentrace fPSA. Vzájemný poměr těchto hodnot pak může napomoci v diagnostickém rozlišení BHP a karcinomu prostaty.

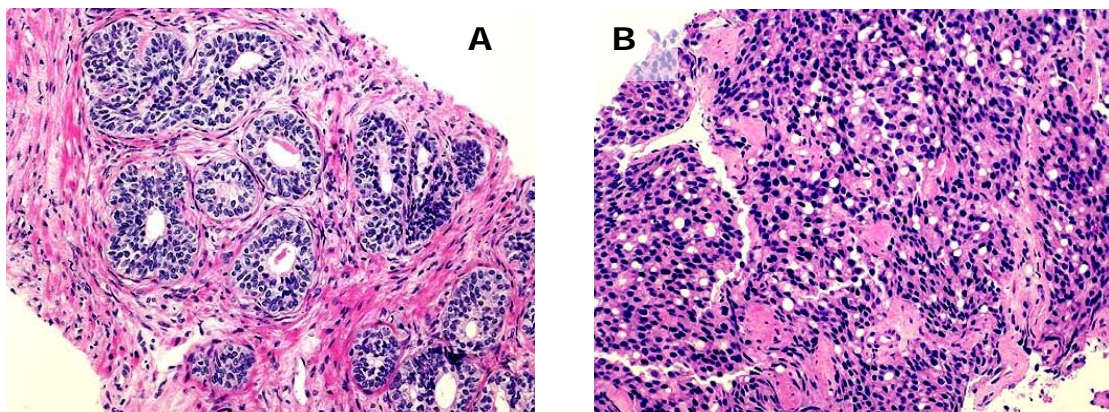
6.2.2. Histologické vyšetření vzorků prostatické tkáně

Histologické vyšetření vzorů prostatické tkáně je doporučováno u všech pacientů, u nichž byl prokázán abnormální nález při vyšetření per rektum, sérová koncentrace PSA překročila 10ng/ml či poměr volný/celkový PSA byl menší než 0,15. V těchto případech je proveden odběr materiálu pro histologickou analýzu, a to punkční biopsií prostaty či transuretrální resekci prostaty.

Získaný materiál je podrobován základnímu histologickému vyšetření, během něhož je, na tkáňových řezech barvených přehlednou hematoxylin-eosinovou metodou, sledována přítomnost či nepřítomnost nádorových struktur či ložisek BHP.

Histologický obraz BHP (Obr. 39A) není zcela jednotný. Malé noduly mají většinou převážně stromální komponentu tvořenou řídkou mezenchymální tkání či hladkou svalovinou. Naproti tomu velké noduly jsou z větší části tvořeny adenomatózní tkání, velkými i malými aciny. U některých větších acinů je možno nalézt papilární projekce do lumen, někdy s fibrovaskulárním stromatem.

Histologický vzhled klasického acinárního adenokarcinomu prostaty (Obr. 39B) je tvořen malými nahloučenými žlázkami, které jsou relativně uniformní. Podezřelé jsou zejména žlásky infiltrující mezi jednoznačně benigní žlásky, dále glandulární struktury tvořící pruhy, splývající ve větší celky či naopak jednotlivé buňky mezi normální prostatickou tkání. Z cytologických charakteristik je nutné věnovat pozornost buňkám s jadernou polymorfií, nápadnými jádérky a mitózami. Pro diagnózu karcinomu rovněž svědčí nález buněk s výrazně odlišnou cytoplazmou než v okolních benigních žlázkách, a dále i buněk s amfofilní a vodojasnou cytoplazmou. V lumen nádorových žlázek je možno rozeznat modravý hlen, jemně vločkovitý růžový materiál, krystaloidy či nekrotickou hmotu.



Obr. 39 A: BHP ; B: adenokarcinom prostaty (65)

Diferenciální diagnostika na základě zhodnocení vzhledu tkáně v preparátech barvených hematoxylinem-eosinem je v některých případech velice obtížná a rozhodnutí, zda v konkrétním vzorku je charakter prostatických žlázek změněn v důsledku jejich benigní hyperplázie či nádorového zvratu jejich buněk, vyžaduje další vyšetření, které by předpokládanou diagnózu potvrdilo či vyvrátilo. V těchto složitějších případech je doporučeno využít schopností imunohistochemických metod detekovat v histologických řezech konkrétní antigeny, které jsou ve výrazně odlišné míře exprimovány v benigních a maligních buňkách, popřípadě dochází k evidentní změně jejich lokalizace v buňkách či buněčných strukturách.

6.2.3. Imunohistochemie v diferenciální diagnostice karcinomu prostaty

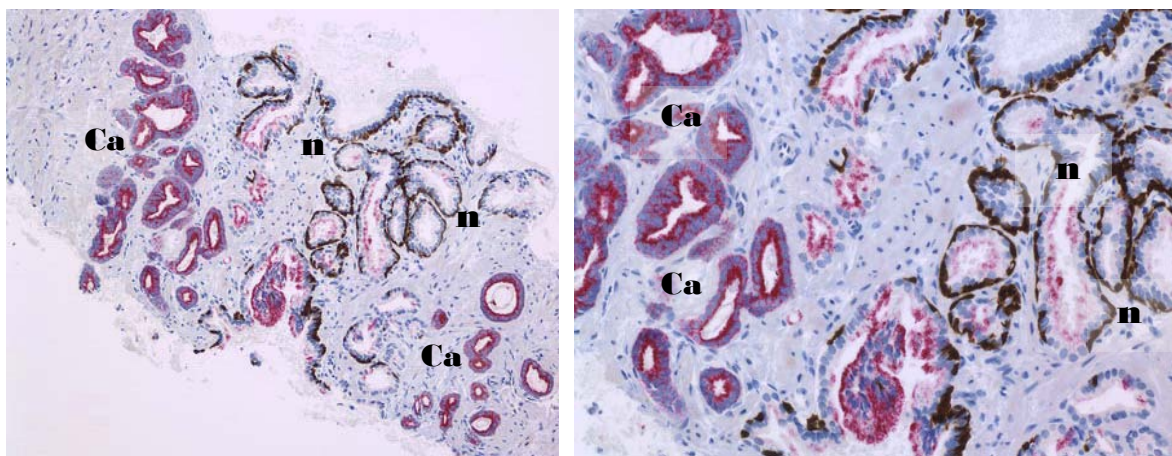
Rozlišení benigních prostatických žlázek od maligních založené čistě na zhodnocení morfolgie buněk a buněčných struktur v rutinně barvených preparátech může být obtížné, zvláště u vzorků prostatické jehlové biopsie, zejména pokud je podezřelé ložisko malé. V těchto případech jsou imunohistochemické metody důležitým nástrojem nejen ke stanovení diagnózy, ale rovněž slouží k potvrzení diagnózy stanovené na základě přehledného barvení hematoxylinem-eosinem.

Diagnostika karcinomu prostaty s využitím imunohistochemické analýzy může být založena na detekci jednotlivých specifických antigenů, které jsou asociovány s nádorovým onemocněním prostaty (podrobně viz kapitola 5), ale výsledky těchto individuálních testů

bývají často zavádějící a málo průkazné, a proto je upřednostňován speciální postup, v němž je pro zhodnocení celkového obrazu stavu tkáně využita kombinace alespoň dvou markerů, které jsou detekovány specifickými protilátkami.

Zhou a kol. (63) svou studií prokázali, že „koktejl“ pro detekci bazálních buněk (kombinace 34 β E12 + anti-p63) detekuje přítomnost bazální vrstvy intenzivněji než barvení každou protilátkou zvlášť a benigní žlázy postrádají bazální vrstvu pouze ve 2% případů (u stanovení HMW-CK samostatně jsou bazální buňky benigních žlázek negativní až ve 12% případů). Kombinované 34 β E12 + anti-p63 barvení tedy nejen, že zvyšuje senzitivitu detekce bazálních buněk, ale také redukuje variabilitu v barvení, a proto poskytuje více spolehlivé imunohistologické výsledky.

Jsou-li rutinním hematoxylin-eosinovým barvením odhaleny malé atypické žlázy, je k jejich identifikaci a potvrzení diagnózy nejvhodnější využít kombinaci dvou (popř. tří) markerů. Nejčastěji je používán tzv. „triple cocktail“ (Obr. 40), v němž AMACR slouží jako pozitivní marker rakoviny prostaty (je přítomen u většiny nádorových ložisek) a p63 v kombinaci s HMW-CK jako negativní marker karcinomu (není přítomen u většiny nádorových ložisek).



Obr. 40 Imunoreaktivita AMACR; u maligních žlázek je patrná výrazná AMACR pozitivita a nepřítomnost bazálních buněk (Ca); benigní žlázy (n) mají zachovány bazální vrstvy, která se barví pozitivně na p63 a HMW-CK, přítomna je slabá reaktivita AMACR (66)

Výpovědní hodnotu tohoto postupu prověřili Jiang a kol. (21), kteří provedli imunohistochemickou analýzu založenou na aplikaci tří specifických protilátek na 138 vzorcích jehlové biopsie, mezi nimiž bylo 82 případů adenokarcinomu a 56 vzorků normální

prostatické tkáně. Koktejl tří protilátek (myší monoklonální anti-HMW-CK + myší monoklonální anti-p63 + králičí monoklonální anti-AMACR) byl aplikován na tkáňové řezy. Následně byly přidány sekundární protilátky : anti-králičí konjugovaná s alkalickou fosfatázou a anti-myší konjugovaná s peroxidázou. Vizualizace reakce byla provedena aplikací substrátů pro oba enzymy (diaminobenzidin, fast red). Z 82 případů adenokarcinomu 78 (95%) exprimovalo AMACR (červené cytoplazmatické granulární barvení) a všechny maligní vzorky (100%) byly negativní na přítomnost bazálních buněk. Ve vzorcích normální tkáně byla potvrzena přítomnost bazální vrstvy díky pozitivní tmavě hnědé reakci v jádrech (p63) a cytoplazmě (34βE12) bazálních buněk. Pozitivní reakce s anti-AMACR protilátkou byla v benigních žlázkách pouze slabá, nebo úplně chyběla. Žádné z benigních žlázek nebyly současně pozitivní na AMACR a negativní na markery bazálních buněk (Tab. 16).

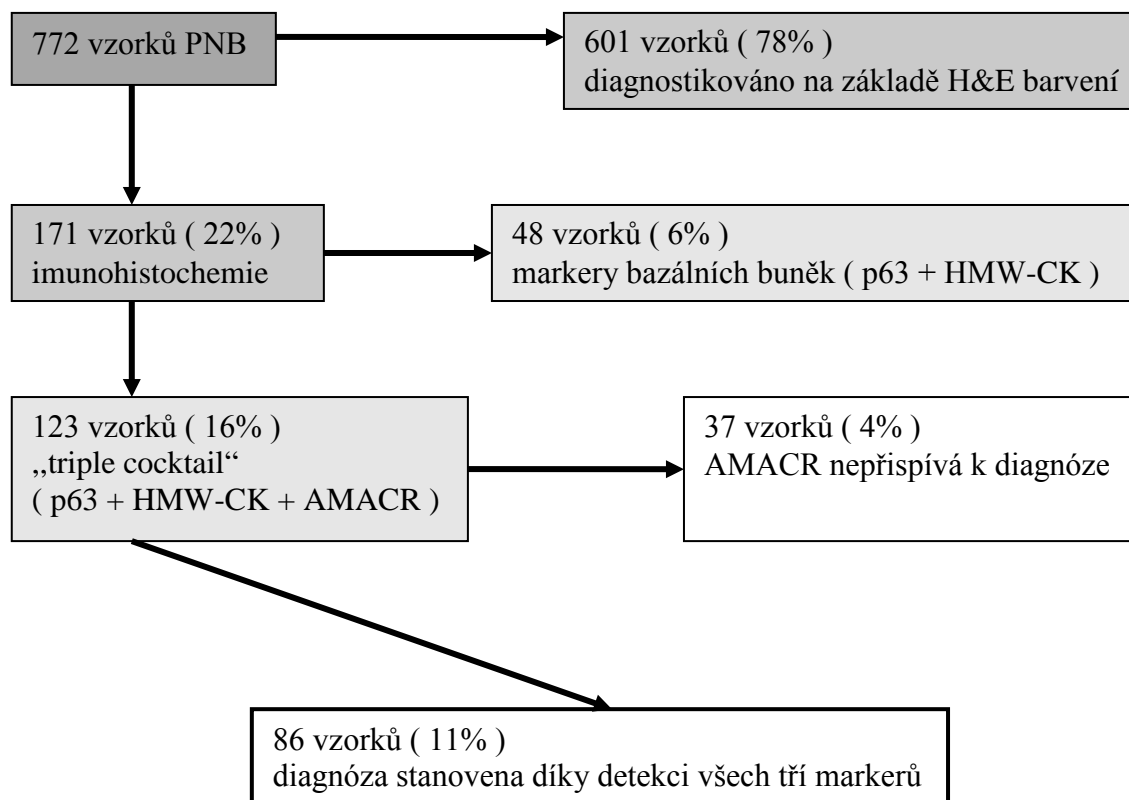
Tab. 16 AMACR, 34βE12, p63 imunoreaktivita ve vzorcích prostatické tkáně

	počet vzorků	P504S + (34βE12/p63) -	P504S -, +/- (34βE12/p63) +
karcinom prostaty	82	78 (95%)	0 (0%)
normální prostata	56	0 (0%)	56 (100%)
benigní žlázy nebo PIN v sousedství rakoviny	82	0 (0%)	82 (100%)

Užití AMACR jako pozitivního markeru v kombinaci s negativními markery (p63, 34βE12), které prokazují přítomnost bazálních buněk, zvyšuje diagnostickou přesnost při rozlišení benigních a maligních afekcí prostatické tkáně.

Aplikací a využitím imunohistochemického „trojitého barvení“ a jeho výhod v klinické praxi se zabývala studie, v níž byl sledován „osud“ 772 vzorků tkání získaných jehlovou biopsií prostaty (6). Všechny vzorky byly zpracovány rutinními histologickými metodami a u 601 (78%) z nich bylo barvení hematoxylinem-eosinem dostatečně průkazné pro stanovení diagnózy. Zbývajících 171 (22%) vzorků nebylo možné na základě morfologie buněk diagnostikovat, a proto byly podrobeny imunohistochemické analýze. Vzhledem k malému množství odebrané tkáně bylo u 48 (6%) možno provést pouze jedno vyšetření; v těchto případech byla dána přednost detekci bazálních buněk (anti-p63 + 34βE12). **Analýza**

s využitím všech tří protilátek (anti-p63 + 34βE12 + P504S) byla tedy ve finále provedena u 123 (16%) vzorků a u 86 z nich (11% z celkového počtu vzorků) vedla ke stanovení konečné diagnózy. V 37 případech (4% z celkového počtu vzorků) detekce AMACR nepřispěla k diagnóze a ta byla stanovena na základě imunoreaktivity bazálních buněk (Obr. 41).



Obr. 41 Využití současného průkazu tří markerů (AMACR, 34βE12, p63) v klinické praxi

**7. KLINICKÁ A IMUNOHISTOLOGICKÁ
ANALÝZA VZORKŮ TKÁNÍ**

7.1. Příprava a zpracování vzorků prostatické tkáně

Na pěti vzorcích prostatické tkáně budou demonstrovány některé typické nálezy získané při histologickém vyšetření. Materiál k vyšetření byl získán jehlovou biopsií prostaty, kterou provedli jednotliví urologové ze spádových nemocnic, které spolupracují s klinickými patology Fingerlandova ústavu patologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde jsou vzorky zpracovány a následně odborně zhodnoceny. Rozhodnutí o provedení biopsie bylo u pacientů založeno na atypickém nálezu při vyšetření per rektum a zvýšené koncentraci sérového PSA.

Vzorky prostatické tkáně byly zpracovány klasickými histologickými metodami a připravené tkáňové řezy byly přehledně obarveny hematoxylinem-eosinem. Ke sledování byl použit mikroskop Olympus AX 70 (Olympus, Japan), jehož technologie rovněž umožnila vytvoření fotografií, jež jsou v této práci použity (29).

K posouzení atypických žlázek bylo využito imunohistochemické metody, jejímž principem je detekce vrstvy bazálních buněk na základě reakce specifické monoklonální myší protilátky proti vysokomolekulárním cytokeratinům (HMW-CK).

Cytokeratiny jsou cytoskeletální proteiny intermediárních filament nezbytné pro vývoj a diferenciaci epitelálních buněk. Dle molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu se cytokeratiny člení do dvou skupin, a to na cytokeratiny s nízkou molekulovou hmotností (40-54 kDa), které jsou převážně distribuovány v neskvamózním epitelu, a dále vysokomolekulární cytokeratiny (48-67 kDa), které se nacházejí ve skvamózním epitelu.

Monoklonální myší protilátka (firma Imunogen) značí normální epitelální buňky (od buněk jednovrstevného glandulárního a duktálního epitelu po vrstevnatý skvamózní epitel) a také většinu neskvamózních epitelů. Protilátka neznačí nervové buňky a mezenchymální tkáň, slabá a ne příliš častá pozitivita byla zaznamenána u buněk hladké svaloviny.

HMW-CK představují skupinu cytokeratinů (č. 1, 5, 6, 8, 10, 14, 18), které jsou exprimovány v buňkách bazální vrstvy normálních prostatických žlázek. V případě adenokarcinomu není vrstva bazálních buněk zachována, a proto u nádorových žlázek nedochází k barevné reakci.

7.2. Stanovení gradingu nádorového ložiska

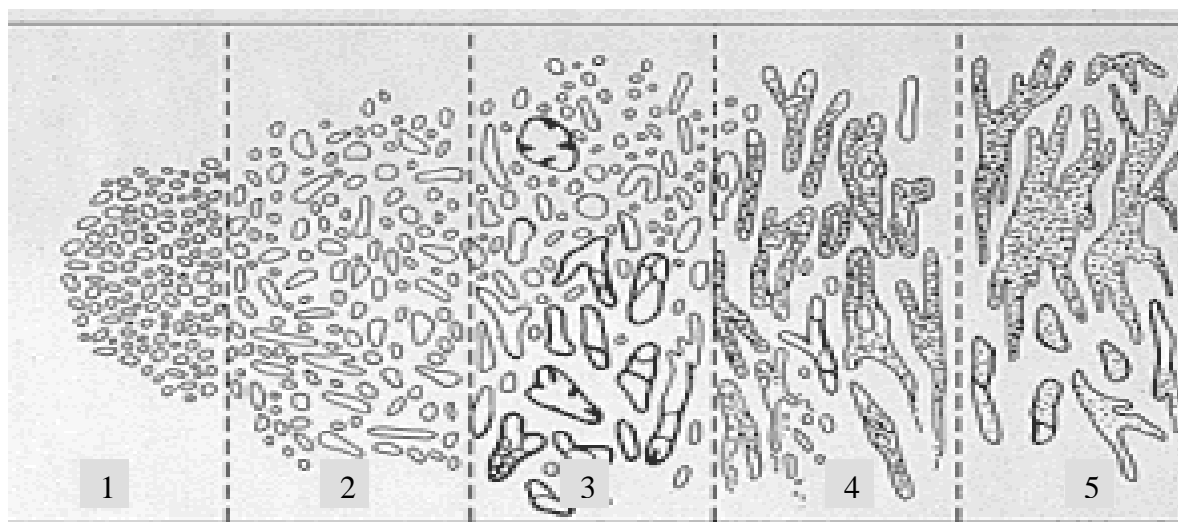
V případě, že je v preparátu berveném hematoxylinem-eosinem zachyceno ložisko nádorově zvlhlých buněk, je míra jejich zralosti a tím i stupeň diferenciacie tumoru číselně ohodnocena. Uznávaným a všeobecně užívaným typem hodnocení je tzv. Gleasonské skóre, které vychází z určení stupně diferenciacie buněk ve dvou největších nádorových ložiscích sledované tkáně. Každé z těchto ložisek je ohodnoceno číselně (Obr. 42), součet obou čísel pak udává hodnotu Gleasonského skóre, na jehož základě jsou rozlišována 4 stádia nádorů prostaty :

G₁ : Gleasonské skóre 2 – 4, dobře diferencovaný tumor

G₂ : Gleasonské skóre 5 – 6, středně diferencovaný tumor

G₃ : Gleasonské skóre 7, středně až špatně diferencovaný tumor

G₄ : Gleasonské skóre 8 – 10, špatně diferencovaný tumor

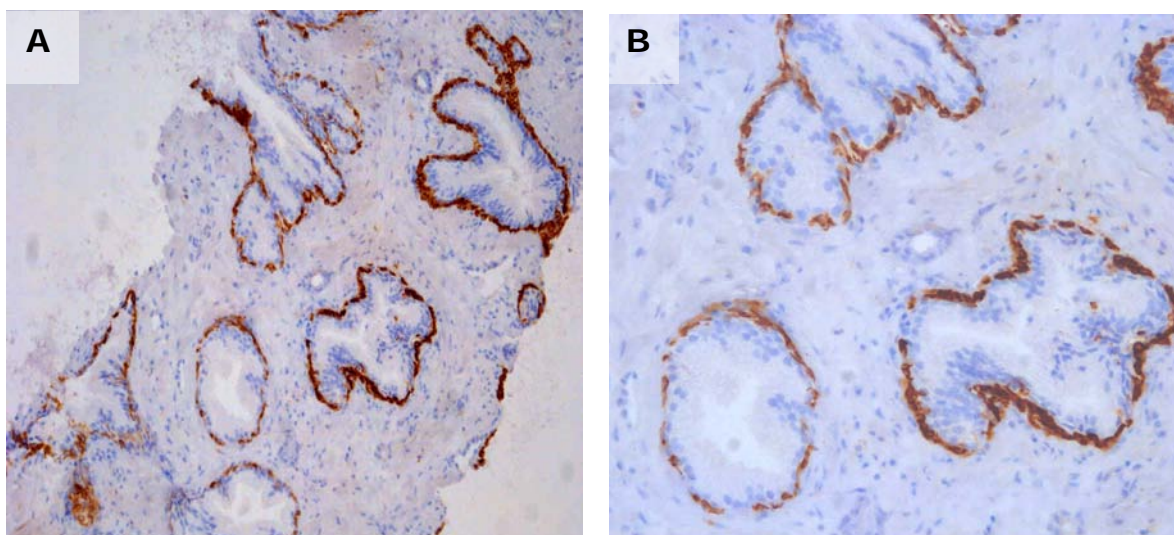


Obr. 42 Diferenciace buněk pro hodnocení Gleasonského skóre

Hodnota Gleasonského skóre současně vypovídá částečně i o prognóze onemocnění, neboť jeho vyšší hodnoty jsou spojeny se špatnou diferenciací nádorového ložiska, vyšší agresivitou a vysokým metastatickým potenciálem nádorových buněk, přičemž všechny tyto faktory zhoršují prognózu a v celé řadě případů souvisejí i s kratší dobou přežití pacientů.

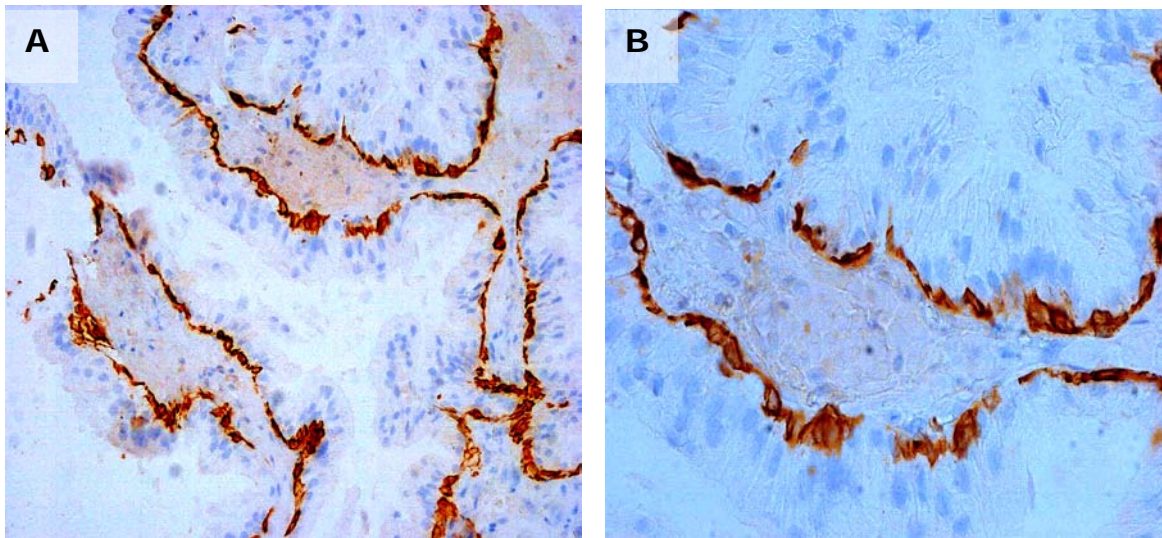
7.3. Stanovení diagnózy pacientů

U pacienta č. 1 (věk 69 let) byla v prouzcích prostatické tkáně z punkční biopsie prostaty na řezu barveném hematoxylinem-eosinem zastižena mírná hyperplázie prostaty a normální acinární prostatické žlázy (Obr. 43, příloha). Mikroacinárně uspořádaný adenokarcinom, u něhož bylo stanoveno Gleasonské skóre o hodnotě 5 (středně diferencovaný tumor) zaujímá v preparátu méně než 10% vyšetřované tkáně; neobjevuje se polymorfie jader. HMW vyšetření prokázalo u všech žlázek bazální buňky (Obr. 44), díky čemuž je daný nález možno pokládat za normální, avšak vzhledem k přítomnosti malého ložiska adenokarcinomu bylo doporučeno další sledování tohoto pacienta, aby byla případná progresse onemocnění zachycena včas.



Obr. 44 A: zvětšeno 100×; B: zvětšeno 200×

Rovněž v případě pacienta č. 2 (věk 64 let) jsou v prouzcích jehlové biopsie známky myoadenomatózní hyperplázie prostaty, přesvědčivé maligní nádorové struktury však nebyly zjištěny, proto je daný nález považován za normální, přičemž k této diagnóze přispívá i fakt, že všechny žlázy mají v imunohistochemické reakci HMW přítomny zřetelně zbarvené bazální buňky (Obr. 45). U tohoto pacienta nebyl doporučen žádný další speciální postup, vhodné je pokračovat v pravidelných ročních kontrolních vyšetřeních.



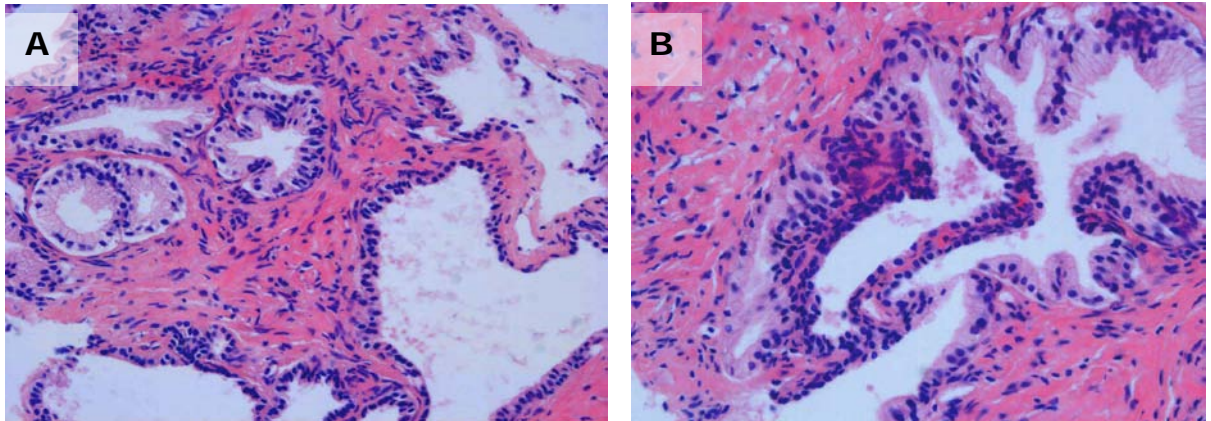
Obr. 45 A: zvětšeno 200× ; B: zvětšeno 400×

Ve vzorku pacienta č. 3 (věk 74 let) bylo mikroskopicky kromě myoadenomatózní hyperplázie prostaty (Obr. 46A, příloha) zastiženo ložisko středně diferencovaného mikroacinárně uspořádaného adenokarcinomu. Hodnota Gleasonského skóre byla stanovena součtem 3+4=7 (Obr. 46B, příloha). Nádorem je postiženo přibližně 20% vyšetřované tkáně. HMW vyšetření v inkriminovaném ložisku neprokázalo přítomnost bazálních buněk, což podporuje diagnózu adenokarcinomu prostaty.

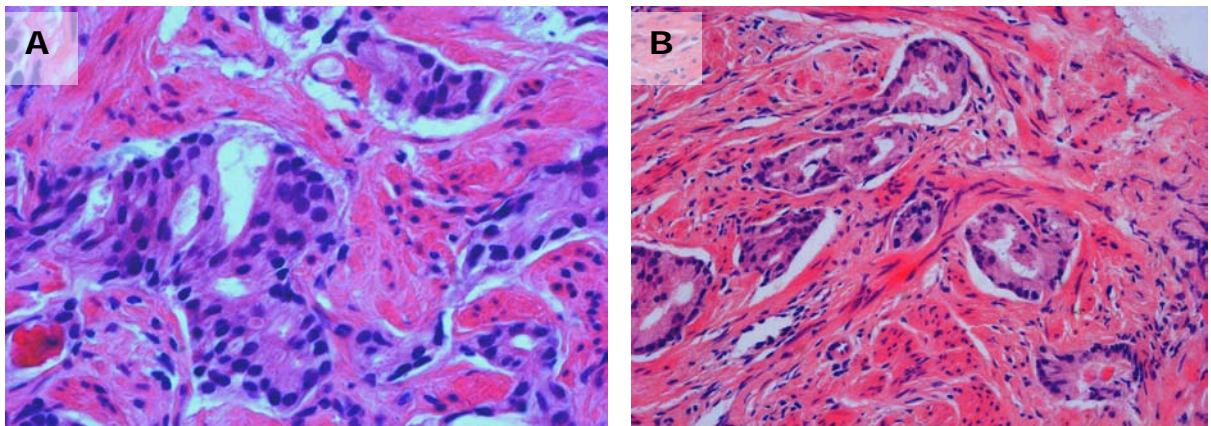
Rovněž u pacienta č. 4 (věk 81 let) byl v odebraném vzorku zastižen středně diferencovaný prostatický adenokarcinom, převážně mikroacinárně uspořádaný, Gleasonské skóre 7 (Obr. 47, příloha). Nádor představuje více než 50% vyšetřované tkáně. Imunoreakce s anti-HMW-CK protilátkou prokázala nepřítomnost bazálních buněk v inkriminovaných ložiscích. Na základě těchto vyšetření a rovněž díky stanovení vysoké koncentrace sérového PSA (69,1 ng/ml) byla stanovena diagnóza adenokarcinomu prostaty.

U pacient č. 5 (věk 70 let) byla sledovaná tkáň prostoupěna intenzivně rostoucím adenokarcinomem (Obr. 48), který je místy disociovaný a penetruje do svalové tkáně (Obr. 49A). Vzhledem k vysoce agresivnímu potenciálu nádorových buněk bylo stanoveno Gleasonské skóre o hodnotě 10, což představuje špatně diferencovaný tumor se špatnou prognózou. Na detailu je zřetelně patrná polymorfie jader nádorového infiltrátu (Obr. 49B).

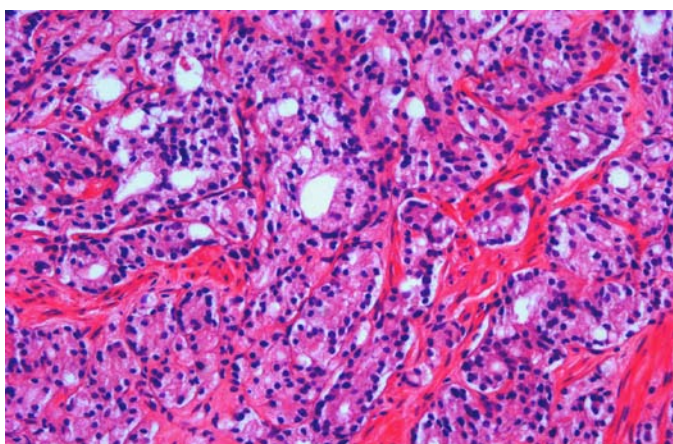
PŘÍLOHA



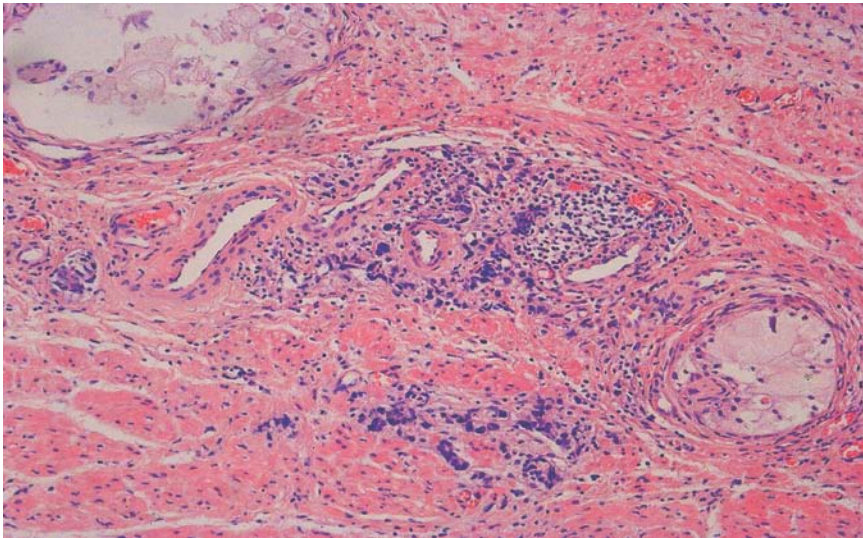
Obr. 43 Pacient č.1; A: zvětšeno 100× ; B: zvětšeno 200×



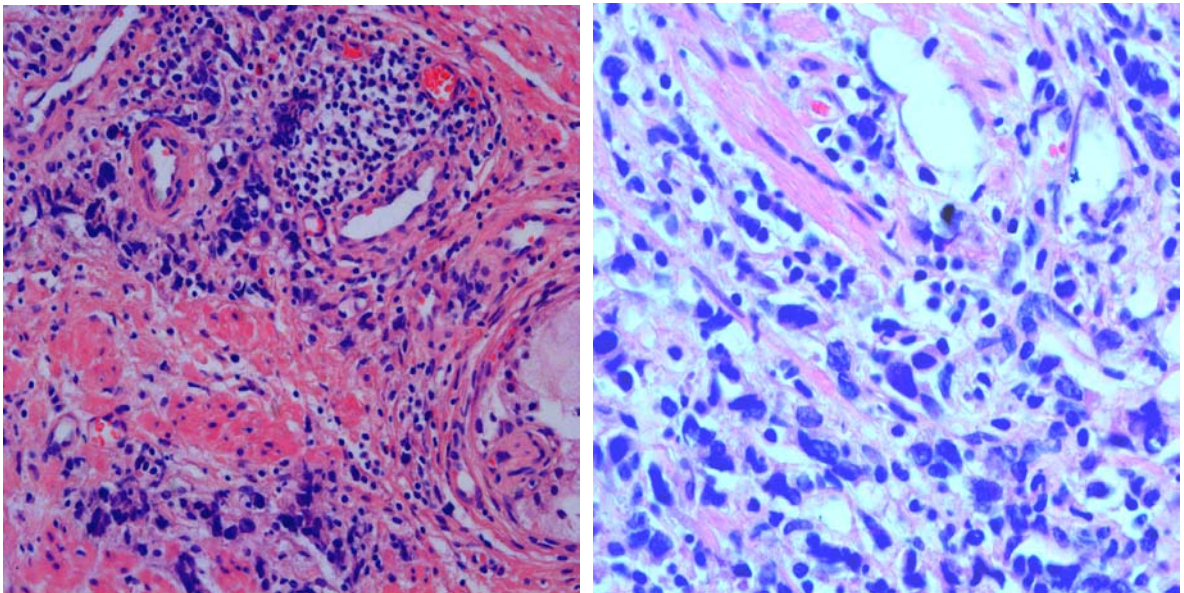
Obr. 46 Pacient č.3; A: myoadenomatózní hyperplázie prostaty; B: středně diferencovaný adenokarcinom; zvětšeno 200×



Obr. 47 Středně diferencovaný adenokarcinom; zvětšeno 200×



Obr. 48 Intenzivně rostoucí adenokarcinom; zvětšeno 100×



Obr. 49 A: penetrace adenokarcinomu do svalové tkáně; B: polymorfie jader nádorového infiltrátu; zvětšeno 400×

8. DISKUZE

Zhoubné novotvary patří hned po onemocnění kardiovaskulárního ústrojí k nejčastějším příčinám úmrtí ve všech civilizovaných státech. Mortalita způsobená výskytem maligního onemocnění vzrostla ze 4% v roce 1909 na více než 20% v devadesátých letech. U mužské populace v ČR byla koncem 20. století nejfrekventnějším maligním onemocněním rakovina plic či tlustého střeva, od roku 2005 je však nejčastěji diagnostikovaným onkologickým onemocněním mužů rakovina prostaty a počet nově hlášených případů rok od roku stoupá.. Tato tendence vedla k rozvoji nových diagnostických metod, jejichž hlavním cílem je odhalení přítomnosti nádorového bujení v organismu v jeho počátečních stádiích. Včasný záchyt onemocnění totiž zvyšuje pravděpodobnost účinnosti léčby a zlepšuje prognózu daného onemocnění.

Mimo klasických zobrazovacích metod, které jsou v diagnostice nádorů již tradičně využívány, se velmi výrazně rozvíjí oblast laboratorních stanovení nádorového růstu. Základem těchto testů je stanovení koncentrace tzv. tumorových markerů, což jsou látky vznikající v organismu ve zvýšené míře v důsledku přítomnosti a vývoje maligního procesu. Tyto látky je možné zachytit a stanovit v tělních tekutinách (krev, krevní sérum) metodami klinické biochemie. U pacientů s podezřením na karcinom prostaty se vhodným biochemickým markerem ukázal prostatický specifický antigen (PSA), který patří do skupiny lidských kalikreinů a jehož senzitivita je ve vztahu k detekci karcinomu prostaty uváděna mezi 68-80 % a specifita mezi 49-90 %.

Nespornou výhodou stanovení nádorových markerů je, že materiál pro vyšetření je možno získat neinvazivními metodami, a proto jsou tyto analýzy využívány zejména pro tzv. screeningová vyšetření. Cílem screeningových vyšetření je kontrola sérové hladiny nádorově specifických markerů v konkrétních časových periodách, přičemž tento postup by měl vést k časnému záchytu změn v koncentracích markerů, které by mohly znamenat rozvoj nádorového onemocnění v organismu. V rámci screeningu rakoviny prostaty jsou doporučována pravidelná roční stanovení sérové koncentrace PSA a urologické vyšetření prostaty u mužů starších padesáti let. Díky zavedení těchto pravidelných prohlídek vzrost počet odhalených nádorových onemocnění prostaty, současně však byly tumory diagnostikovány mnohem častěji v počátečních stádiích, která příznivěji reagují na léčbu.

Ačkoli jsou biochemické screeningové metody hojně využívány a přispívají výrazně k vyššímu zachytu nádorových onemocnění, nevýhodou zůstává jejich nižší specifita a selektivita, které vedou často ke stanovení falešně pozitivních či falešně negativních výsledků, což může mít pro pacienta fatální následky. Změny sérových koncentrací nádorových markerů rovněž není možné využít ke stanovení konečné diagnózy, neboť jejich hodnoty mohou být ovlivněny celou řadou faktorů, nicméně odhalení přítomnosti vyššího množství určitého markeru v séru napomáhá k vyhledání pacientů, kteří jsou potenciálně ohroženi rozvojem zhoubného novotvaru a u nichž je nezbytné provést další vyšetření, která by přítomnost nádorového ložiska potvrdila či vyvrátila.

Základním postupem, který je využíván v diagnostice u pacientů s podezřením na nádorové bujení v organismu, je histologická analýza vzorku tkáně odebrané z orgánu, který je potenciálně postižen. Nevýhodou této analýzy je nutnost invazivního zákroku při odběru materiálu pro vyšetření a relativně delší doba nezbytná pro přípravu preparátu pro mikroskopické stanovení.

Histologické vyšetření podezřelých tkání je prováděno technikou ultratenkých řezů fixovaných nejčastěji formaldehydem. V případě klasické histologické analýzy jsou buňky a buněčné struktury na tkáňových řezech kontrastně barveny hematoxylinem-eosinem, díky čemuž dojde ke zvýraznění některých detailů, které není možné na nebarvených preparátech postřehnout. Mikroskopické vyšetření pak prokazuje přítomnost tvarově atypických jader, buněk či celých buněčných struktur. V diagnostice karcinomu prostaty je posuzována architektura prostatických žlázek, jaderná polymorfie, přítomnost jadérek či mitóz, atypicky zbarvená cytoplazma buněk či výskyt krystaloidů nebo nekrotické hmoty v lumen nádorových žlázek.

V některých případech však ani tradiční histologický postup neposkytne dostatek informací k tomu, aby mohla být spolehlivě stanovena diagnóza. V takové situaci je vhodné využít speciální imunohistochemické metody, které kombinují výhody imunoanalýzy a histologického vyšetření. Imunohistochemie je histologickým oborem, který využívá k detekci chemicky definovaných individuů v buňkách, tkáňových kulturách a řezech z tkáňových bloků, afinitu antigenu a specifické protilátky a jejich vzájemnou vazbu.

Antigeny mají v buňce funkci receptorů, enzymů nebo transkripčních faktorů a v případě maligního zvratu buňky dochází k výraznému zvýšení nebo snížení jejich exprese. Tento rozdíl je pak využíván k odlišení maligních a benigních tkání, popř. k posouzení původu případného nádoru. Přítomnost antigenu je odhalena na základě imunologické vazby se specifickou protilátkou, která je konjugována s enzymem, jehož reakce se substrátem vede k barevné změně v místě navázání protilátky. Výsledkem vyšetření je průkaz konkrétního antigenu a míry jeho exprese v histologickém preparátu.

Imunohistologické vyšetření prostatické tkáně nabízí širokou škálu antigenů, které jsou v odlišné míře exprimovány v benigní a maligní tkáni. Prvními užívanými markery byly kyselá prostatická fosfatáza (PAPH) a prostatický specifický antigen (PSA), které jsou v imunohistochemii pro prostatickou tkáň vysoce specifické, čehož se využívá zejména v identifikaci metastáz neznámého původu. Tyto markery však není možné využít k odlišení benigní hyperplázie prostaty a karcinomu, neboť u obou afekcí je jejich exprese téměř shodná. Intenzita a rozsah barvení PSA a PAPH nijak nekorelují se stádiem diferenciací nádorového ložiska, a proto nejsou vhodnými prognostickými faktory.

Mezi nejspolehlivější markery, jejichž přítomnost je využívána k odlišení normální (resp. BHP) a nádorové prostatické tkáně, patří protein p63, vysokomolekulární cytokeratiny (HMW-CK) a claudin-1, antigeny typické pro buňky bazální vrstvy prostatických žlázek. Tato bazální vrstva je zachována u normální či hyperplastické tkáně, u maligně změněných žlázek dochází k porušení její kontinuity nebo až k její úplné destrukci. Diagnóza karcinomu prostaty je tedy potvrzena v případě, že imunologická reakce s protilátkami proti výše uvedeným markerům neprokáže přítomnost bazální vrstvy, v opačném případě jsou sledované žlázy normální nebo došlo k jejich benigním hyperplastickým změnám.

Jedním z nejnovějších markerů, které se uplatňují v diferenciální diagnostice karcinomu prostaty, je α -methylacyl-CoA racemáza, enzym, který není exprimován v normální a hyperplastické prostatické tkáni, zatímco v nádorových žlázkách je jeho exprese velmi silná.

Některé další markery, proteiny S100A8 a S100A9 a δ -katenin, nejsou přítomny v normální či hyperplastické tkáni, k jejich expresi ale dochází u prostatické intraepiteliální neoplázie

(PIN) a s rostoucím gradingem nádorového ložiska stoupá i intenzita a míra exprese těchto faktorů. Opačným případem jsou α -, β -, a γ -katenin, E-kadherin a protein p120^{cas}, jejichž imunoreakce je u vzorků normální a hyperplastické tkáně silně pozitivní, zatímco u PIN dochází k poklesu intenzity barevné reakce a u karcinomů exprese těchto markerů dále klesá s rostoucím gradingem.

Díky intenzivnímu výzkumu zaměřenému na odhalování nových antigenů asociovaných s nádorově změněnou prostatickou tkání byla popsána celá řada více či méně specifických markerů pro diagnostiku karcinomu prostaty, nicméně na základě posouzení přínosnosti jejich detekce ke stanovení konečné diagnózy našla v klinické praxi uplatnění jen malá část z nich. Konkrétně je, v případě že ke stanovení diagnózy nestačí přehledné barvení hematoxylinem-eosinem, v imunohistologické diagnostice v klinické praxi využívána detekce bazálních buněk anti-HMW-CK protilátkou (34 β E12), protože má velmi dobrou vypovídací hodnotu a náklady spojené s tímto vyšetřením nejsou extrémně vysoké. Na některých klinických pracovištích je, navzdory své vyšší ceně, používáno současné barvení dvěma protilátkami, z nichž jedna detekuje bazální buňky benigních žlázek (anti-HMW-CK nebo anti-p63) a druhá slouží jako pozitivní marker nádorových buněk (anti-AMACR = P504S).

9. ZÁVĚR

Nádorové onemocnění prostaty je v současné době nejčastějším onkologickým onemocněním mužů v České republice. Ačkoli se ve většině případů nejedná o rychle rostoucí agresivní nádor, přesto výrazně ohrožuje pacienty na životě, neboť poměrně často metastazuje do kostí či plic dlouho před tím, než se projeví první klinické příznaky. Ve snaze předejít vysoké mortalitě na tento typ nádorového onemocnění byl zaveden screeningový program u mužů starších padesáti let, díky čemuž došlo ke zvýšení zachytu onemocnění v časných, dobře léčitelných stádiích.

Potvrzení diagnózy karcinomu prostaty je založeno na histologickém vyšetření tkáně získané nejčastěji jehlovou biopsií prostaty. Ze získaného vzorku je připraven tenký preparát, který je po obarvení hematoxylinem-eosinem mikroskopicky zhodnocen erudovaným odborníkem (klinickým patologem). Přibližně u 80% vzorků je tento pracovník schopen stanovit diagnózu již na základě tohoto morfologického vyšetření. Zbýlých 20% případů je atypických a k jejich posouzení jsou využívány imunohistologické postupy. Díky nim je na základě barevné reakce možné odhalit přítomnost/nepřítomnost a míru exprese specifických markerů asociovaných s nádorovými buňkami a rozhodnout tak o pacientově diagnóze.

SEZNAM ZKRATEK

ABC	avidin-biotin komplex
AMACR	α -methylacyl-koenzym A racemáza
APAAP	alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza
BHP	benigní hyperplázie prostaty
CgA	chromogranin A
CRISP	cysteine-rich secretory protein (sekreční protein bohatý na cystein)
FSH	folikuly stimulující hormon
f/t PSA	volná frakce PSA/ celkový PSA
HIF	hypoxia-inducible factor
hK2	human kallikrein 2 (lidský kallikrein 2)
HMW-CK	high-molecular-weight cytokeratins (vysokomolekulární cytokeratiny)
Ig	imunoglobulin (protilátka)
IL-6	interleukin 6
LH	luteinizační hormon
NSE	neuron specifická enoláza
PAP	peroxidáza-anti-peroxidáza
PAPH	kyselá prostatická fosfatáza
PIN	prostatická intraepiteliální neoplázie
PIP	prostatic inhibin peptide (prostatický inhibiční peptid)
PSA	prostatický specifický antigen
PSCA	prostate stem cell antigen (antigen prostatických „kmenových buněk“)
PSMA	prostatický specifický membránový antigen
SCGN	secretagogin
STEAP	six-transmembrane epithelial antigen of the prostate
SYN	synaptophysin
TRH	tyreoliberin
TRUS	transrektální ultrasonografie

SEZNAM LITERATURY

1. Adolf K, Wagner L, Bergh A, Stattin P, Ottosen P, et al

Secretagogin is a new neuroendocrine marker in the human prostate.

The Prostate, 2007; 67 : 472-484

2. Beach R, Gown AM, de Peralta-Venturina MN

P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies.

American Journal of Surgical Pathology, 2002; 26 : 1588-1596

3. Bjartell A, Johansson R, Björk T, Gadaleanu V, Lundwall Å, et al

Immunohistochemical detection of cysteine-rich secretory protein 3 in tissue and in serum from men with cancer of benign enlargement of the prostate gland.

The Prostate, 2006; 66 : 591-603

4. Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP

Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma.

Cancer, 1998; 11 : 2256-2261

5. Brawn PN, Ayala AG, von Eschenbach AC, Hussey DH, Johnson DE

Histologic grading study of prostate adenocarcinoma : the development of a new system and comparison with other methods : a preliminary study.

Cancer, 1982; 49 : 525-532

6. Browne T-J, Hirsch MS, Brodsky G, Welch WR, Loda MF, Rubin MA

Prospective evaluation of AMACR (P504S) and basal cell markers in the assessment of routine prostate needle biopsy specimens.

Human Pathology, 2004; 12 : 1462-1468

7. Burger MJ, Tebay MA, Keith PA, Samaratunga HM, Clements J, et al

Expression analysis of δ -catenin and prostate-specific membrane antigen : their potential as diagnostic markers for prostate cancer.

International Journal of Cancer, 2002; 100 : 228-237

8. Davis LD, Zhang W, et al

p63 expression profile in normal and malignant prostate epithelial cells.

Anticancer Research, 2002; 22 : 3819-3825

9. Deperthes D, Chapdelaine P, Tremblay RR, Brunet C, Berton J, et al

Isolation of prostatic kallikrein hK2, also known as hGK-1, in human seminal plasma.

Biochim Biophys Acta, 1995; 1245 : 311-316

10. Garde SV, Sheth AR, Lohiya NK, Shah MG

Prostatic inhibin peptide : occurrence, localization and its hormonal modulation in prostates of primates and rodents.

Journal of Biosci, 1992; 1 : 67-85

11. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, et al

Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer.

Oncogene, 2000; 19 : 1288-1296

12. Gutman EB, Sproul EE, Gutman AB

Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland.

American Journal of Cancer, 1936; 28 : 485-495

13. Hammond ME, Sause WT, Martz KL, Pilepich MV, Asbell SO, et al

Correlation of prostate-specific acid phosphatase and prostate-specific antigen immuno-cytochemistry with survival in prostate carcinoma.

Cancer, 1989; 63 : 461-466

14. Hermani A, Hess J, de Servi B, Medunjanin S, Grobholz R, et al

Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer.

Clinical Cancer Research, 2005; 14 : 5146-5152

15. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ

The claudin gene family : expression in normal and neoplastic tissues.

BioMedCentral Cancer, 2006; 6 : 186

16. Hobisch A, Rogatsch H, Hittmair A, Fuchs D, Bartsch G, Klocker H, Culig Z

Immunohistochemical localization of interleukin-6 and its receptor in benign, premalignant and malignant prostate tissue.

Journal of Pathology, 2000; 191 : 239-244

17. Horoszewicz JS, Kawinski E, Murphy GP

Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial cells and serum of prostatic cancer patients.

Anticancer Research, 1987; 150 : 100-105

18. Huang J, Yao JL, di Sant'Agnes PA, Yang Q, Bourne PA, Na Y

Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer.

The Prostate, 2006; 66 : 1399-1406

19. Hubert RS, Vivanco I, Chen E, Rastegar S, et al

STEAP (six-transmembrane epithelial antigen of the prostate) : a prostate specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors.

PNAS, 1999; 25 : 14523-14528

20. Jiang Z, Fanger GR, Woda BA

Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) in various malignant neoplasms and normal tissues : a study of 761 cases.

Human Pathology, 2003; 34 : 792-796

21. Jiang Z, Li C, Fischer A, Dresser K, Woda B

Using an AMACR (P504S)/ 34βE12/ p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens.

American Journal of Clinical Pathology, 2005; 123 : 231-236

22. Jiang Z, Woda BA, Rock KL

P504S : a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma.

American Journal of Surgical Pathology, 2001; 25 : 1397-1404

23. Jiang Z, Woda BA, Wu Ch-L, Yang XJ

Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker α -methylacyl CoA racemase (P504S).

American Journal of Clinical Pathology, 2004; 122 : 275-289

24. Jiang Z, Wu CL, Woda BA

P504S/ alpha-methylacyl-CoA racemase : a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy.

American Journal of Surgical Pathology, 2002; 26 : 1169-1174

25. Jöbsis AC, de Vries GP, Anholt RRH, Sanders GTB

Demonstration of the prostatic origin of metastases.

Cancer, 1978; 41 : 1788-1793

26. Kallakury BV, Sheenen ChE, Ross JS

Co-down-regulation of cell adhesion proteins alpha- and beta-catenins, p120^{ctn}, E-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas.

Human Pathology, 2001; 32 : 849-855

27. Kallakury BV, Sheenen ChE, Winn-Deen E, Oliver J, et al

Decreased expression of catenins (α and β), p120^{ctn}, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation prostatic adenocarcinomas.

American Cancer Society, 2001; str. 2786-2794

28. Kasori F, Asmann YW, Cheville JC, Vasmatzis G

Cysteine-rich secretory protein-3 : a potential biomarker for prostate cancer.

Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2002; 11 : 1419-1426

29. Kotlabová K

Současný stav v diagnostice nádorových markerů

Bakalářská práce, FaF UK HK; 2006

30. Krajewska M, Olson AH, Mercola D, Reed JC, Krajewski S

Claudin-1 immunohistochemistry for distinguishing malignant from benign epithelial lesions of prostate.

The Prostate, 2007; 67 : 907-910

31. Krätzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, et al

The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, -2, -3.

European Journal of Biochemistry, 1996; 236 : 827-836

32. Kunju LP, Rubin MA, Shen R

Comparison of monoclonal antibody (P504S) and polyclonal antibody to α -methylacyl-CoA racemase in benign, atypical and malignant prostate tissues.

Modern Pathology, 2003; 16 : 158A

33. Leiblich A, Cross SS, Catto JWF, Pesce G, Hamdy FC, Rehman I

Human prostate cancer cells express neuroendocrine cell markers PGP 9.5 and chromogranin A.

The Prostate, 2007; 67 : 1761-1769

34. Lukeš M, Záleský M a kol.

Molekulární genetiky karcinomu prostaty

Galén Praha, 2002; str.127-130

35. Lukáš Z, Dráberová E, Feit J, Vojtěšek B

Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice.

Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně, 1997; str. 7-29

36. Lu Q, Dobbs LJ, Gregory ChW, Lanford GW, et al

Increased expression of δ -catenin/ neural plakophilin-related armadillo protein is associated with the down-regulation and redistribution of E-cadherin and p120^{ctn} in human prostate cancer.

Human Pathology; 2005; 10 : 1037-1048

37. Lu Q, Paredes M, Medina M, Zhou J, Cavallo R, Peifer M, Orecchio L, Kosik KS

δ -catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering.

The Journal of Cell Biology, 1999; 3 : 519-532

38. Luo J, Zha S, Gage WR

Alpha-methylacyl-CoA racemase : a new molecular marker for prostate cancer.

Cancer Research, 2002; 62 : 2220-2226

39. Melo-Júnior MR, Filho JLSA, Cavalcanti CLB, Patu VJRM, et al

Detection of S100 protein from prostatic cancer patients using anti-S100 protein antibody immobilized on POS-PVA DISCS.

Biotechnology and Bioengineering, 2007; 1 : 182-187

40. Monsef N, Helczynski L, Lundwall Å, Pålman S

Localization of immunoreactive HIF-1 α and HIF-2 α in neuroendocrine cells of both benign and malignant prostate glands.

The Prostate, 2007; 67 : 1219-1229

41. Nadji M, Tabei SZ, Castro A, Chu MT, Murphy GP, Wang MC, Morales AR

Prostatic-specific antigen : an immunohistologic marker for prostatic neoplasms.

Cancer, 1981; 48 : 1229-1232

42. van Oort IM, Tomita K, van Bokhoven A, Bussemakers MJG, Kiemeny LA, et al

The prognostic value of E-cadherin and the cadherin-associated molecules α -, β -, γ -catenin and p120^{ctn} in prostate cancer specific survival : a long-term follow-up study.

The Prostate, 2007; 67 : 1432-1438

43. O'Malley FP, Grignon DJ, Shum DT

Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight-cytokeratin in the differential diagnosis of the prostate gland.

Virch Arch Patol Anat 1990; str. 417

44. Parsons JK, Gage WR, et al

p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma : implications for cancer diagnosis and carcinogenesis.

Urology, 2001; 4 : 619-624

45. Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, et al

Prostate-specific membrane antigen : a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells.

Clinical Cancer Research, 1996; 2 : 1445-1451

46. Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, et al

Prostate stem cell antigen : a cell surface marker overexpressed in prostate cancer.

Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95 : 1735-1740

47. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM

α -methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer.

JAMA, 2002; 287 : 1662-1670

48. Sabra R, Douda P, Hyršl L, Ptáček V

Karcinom prostaty do roku 2000.

Praha, Maxdorf s.r.o., 1996; str. 9 – 50

49. Sauvageot J, Epstein JI

Immunoreactivity for prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase in adenocarcinoma of the prostate : relation to progression following radical prostatectomy.

The Prostate, 1998; 34 : 29-33

50. Shulman S, Mamrod L, Gonder MJ, Soanes WA

The detection of prostatic phosphatase by antibody reactions in gel diffusion.

Journal of Immunology, 1964; 93 : 474-480

51. Siadi MS, Hill TM, Knus-Reichel K, et al

The precursor form of the human kallikrein 2, a kallikrein homologous to prostate-specific antigen, is present in human sera and is increased in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia.

Clinical Chemistry, 1998; 44 : 2115-2119

52. Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, et al

p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development.

American Journal of Pathology, 2000; 6 : 1769-1775

53. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WDW, Cordon-Cardo C

Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues.

Clinical Cancer Research, 1997; 3 : 81-85

54. Sung M-T, Jiang Z, Montironi R, MacLennan GT, Mazzucchelli R, Cheng L

α -methylacyl-CoA (P504S)/ 34 β E12/ p63 triple cocktail stain in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy.

Human Pathology, 2007; 38 : 332-341

55. Tremblay RR, Deperthes D, Têtu B, Dubé JY

Immunohistochemical study suggesting a complementary role of kallikreins hK2 and hK3 (prostate-specific antigen) in the functional analysis of human prostate tumors.

American Journal of Pathology, 1997; 2 : 455-459

56. Vacek Zdeněk

Histologie a histologická technika II. část

Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1996; str. 23-76

57. Varma M, Morgan M, Jasani B, Tamboli P, Amin MB

Polyclonal anti-PSA is more sensitive but less specific than monoclonal anti-PSA.

American Journal of Clinical Pathology, 2002; 118 : 202-207

58. Xu J, Stolk JA, Zhang X

Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray.

Cancer Research, 2000; 60 : 1677-1682

59. Yang XJ, Wu CL, Woda BA

Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504S) in atypical adenomatous hyperplasia of the prostate.

American Journal of Surgical Pathology, 2002; 26 : 921- 925

60. Young ChYF, Seay T, Hogen K, Charlesworth MC, Roche PC, Klee GG, Tindall DJ

Prostate-specific human kallikrein (hK2) as a novel marker for prostate cancer.

The Prostate Supplement, 1996; 7 : 17-24

61. Zhong H, Semenza GL, Simons JW

Up-regulation of HIF 1 α is an early event in prostate carcinogenesis.

Cancer Detect Prewiev, 2004; 2 : 88-93

62. Zhou M, Chinnaiyan AM, Kler CG

Alpha-methylacyl-CoA racemase : a novel tumor marker overexpressed in several human cancers and their precursor lesions.

American Journal of Surgical Pathology, 2002; 26 : 926-931

63. Zhou M, Shah R, Shen R, et al

Basal cell cocktail (34 β E12 + p63) improves the detection of prostate basal cells.

American Journal of Surgical Pathology, 2003; 27 : 365-371

64. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR

Zhoubné nádory v roce 2005

č. 59/2007; vypracovala Mgr. Lenka Juříčková

65. www.prostata.nadory.cz

Doc. MUDr. Ondřej Hes, PhD. a kolektiv; 8. 11. 2007

66. www.webpathology.com

Dharam M. Ramnani, M.D. ; 27. 10. 2007