

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

PCA3 a jeho význam v diagnostice
karcinomu prostaty
(bakalářská práce)

Praha, 2011

Jana Škultétyová

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Dále prohlašuji, že tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29. 7. 2011

Jana Škultétyová

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Vladimírovi Semeckému, CSc. a RNDr. Haně Kabíčkové, CSc., za pomoc a cenné rady při psaní této bakalářské práce.

Obsah

1. Abstrakt	1
2. Abstract	2
3. Seznam zkratk	3
4. Úvod	4
5. Zadání a cíl práce	5
6. Teoretická část	5
6.1. Prostata.....	5
6.2. Problémy a onemocnění prostaty	5
6.3. Diagnostika karcinomu prostaty	7
6.3.1. Vyšetření per rectum	7
6.3.2. Stanovení PSA	7
6.3.3. Transrektální ultrasonografie (TRUS).....	10
6.3.4. Biopsie.....	10
6.3.5. Histologické vyšetření.....	11
6.3.6. Magnetická rezonance a magnetická rezonanční spektroskopie	12
6.3.7. Ostatní specifická vyšetření.....	12
6.4. Co je to PCA3 ?	13
7. Experimentální část	14
7.1. Analýza PCA3.....	14
7.1.1. Používaná souprava.....	14
7.1.2. Odběr a transport materiálu.....	14
7.1.3. Princip vyšetření	15
7.1.4. Postup vyšetření.....	16
7.1.5. Vyhodnocení testu.....	18
7.1.6. Interpretace výsledku PCA3 skóre	18
7.2. Výsledky pacientů prováděných v naší laboratoři	20
8. Diskuse	24
9. Závěr	26
10. Seznam použité literatury	27

1. Abstrakt

Škultétyová Jana

PCA3 a jeho význam v diagnostice karcinomu prostaty

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Rakovina prostaty je celosvětovým problémem, který trápí mnoho mužů. Diagnostika je v současné době zaměřena na měření hladiny specifického prostatického antigenu, které se využívá jako screeningové vyšetření. Dále je diagnostika zaměřena na vyšetření per rectum a při pozitivním nálezu je indikována biopsie. Úskalím této diagnostiky je ale její velmi nízká specificita, protože prostatický specifický antigen vylučují také buňky nemaligního původu. Rizikem biopsie je nenalezení správné tkáně a tak často dochází k opakování biopsie.

Současná věda proto hledá jiné možnosti diagnostiky. Perspektivní možností se ukazuje stanovení PCA3 genu, který se specificky exprimuje v buňkách karcinomu prostaty. Zatím prováděné studie poukazují na jeho prediktivní hodnotu odhadu positivity biopsie, což by nám umožnilo jejich zbytečné indikaci a tím ušetření pacientů od dalších invazivních zákroků.

Tato práce obsahuje informace o možnostech diagnostiky karcinomu prostaty, stručně popisuje analýzu PCA3 a shrnuje výsledky získané měřením v laboratoři, ve které pracuji.

Klíčová slova: karcinóm prostaty, PCA3, PSA, biopsie

2. Abstract

Škultétyová Jana

PCA3 and its importance in diagnostics of prostate cancer

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Field of study: Medical laboratory technician

Prostate cancer is a global problem that bothers many men. Diagnosis is currently focused on measuring levels of prostate-specific antigen, which is used as a screening test. It is focused on the diagnosis of rectal examination and positive biopsy findings. Pitfall of this diagnosis is its not being specific, because prostatic antigen also secretes non-malignant cells. The risk is not finding the proper biopsy tissue, and it often leads to repeat the biopsy.

Modern science is therefore looking for other diagnostic options. The determination of PCA3 gene which expresses specifically in prostate cancer cells looks like prospective option. While existing studies point to the estimated positive predictive value of biopsy, which would allow us to indicate their unnecessary and thus save patients from further invasive procedures.

This work contains information about diagnosis of prostate cancer, briefly describes PCA3 analysis and summarizes the results obtained by the laboratory in which I work.

Keywords: prostate cancer, PCA3, PSA, biopsy

3. Seznam zkratek

C61	zhoubný nádor prostaty
DD3	„differential display code 3“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DRE	vyšetření per rektum („digital rectal examination“)
fPSA	volný prostatický specifický antigen
N40	zbytnění prostaty
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PCA3	„prostate cancer antigene 3“
PSA	prostatický specifický antigen
RNA	ribonukleová kyselina
TMA	transkripčně zprostředkovaná amplifikace
tPSA	celkový prostatický specifický antigen

4. Úvod

Zhoubné nádory prostaty představují nečastější maligní onemocnění u mužů nad 50 let. Hodně mužů problémy přehlídí a pokládá je za přirozený proces stárnutí a tak se dostanou k lékaři často až pozdě. I v tomto případě ale platí, že časnější odhalení problému dává větší šanci pro zvládnutí nemoci.

Nejčastějšími problémy, které mohou s prostatou nastat, jsou zánět (prostatida), benigní zbytnění prostaty (benigní hyperplazie), nebo karcinom prostaty. Příznaky těchto problémů jsou podobné a mohou být zaměnitelné, všechny tři onemocnění jsou ale nezávislé a mohou postihnout jediného muže postupně, nebo také současně. Současná diagnostika je zaměřená hlavně na vyšetření per rectum a stanovení hladiny sérového proteinu PSA (Prostatický specifický antigen), u pozitivních výsledků se indikuje biopsie prostaty, aby se získal vzorek pro histologické vyšetření. I když je stanovení PSA velice dostupným markerem, využívaným i pro screeningové vyšetření, jeho význam je omezen různým provedením analýz, používanými metodami v jednotlivých laboratořích, nastavením různých hraničních norem, kalibrací a podobně. Hodnota PSA, která indikuje provedení biopsie je v současné době stanovena na 2-4 ng/ml, s ohledem na věk pacienta, ale vzhledem k tomu, že vylučování PSA není specifické pouze pro nádorovou tkáň, dochází až k 70% - 80 % negativním výsledkům biopsií. Protože biopsie jako invazivní vyšetření, nese sebou nemalé komplikace a omezení pacienta, které mohou omezit kvalitu života pacienta, je potřeba hledat další, hlavně neinvazivní metody, které by omezily počet biopsií prováděných v diagnostice CaP (Karcinom prostaty).

Jednou z možností nových přístupů je stanovování ribonukleové kyseliny, která se specificky exprimuje v buňkách nádorové tkáně prostaty, vzniká přepisem genu pod názvem Prostate cancer gene 3 (PCA3). Podle posledních studií by tato metoda měla předpovědět pravděpodobnost positivity výsledku biopsie, a tak zamezit její zbytečné indikaci, mohla by stanovit agresivitu karcinomu a pomoci při sledování léčených pacientů (Belej a kol., 2010).

5. Zadání a cíl práce

Vzhledem k tomu, že laboratoř, ve které pracuji, se jako jedna z mála laboratoří v České republice rozhodla zavést metodu stanovení PCA3 do své nabídky, rozhodla jsem se v této práci věnovat problematice stanovení PCA3, popsat postup stanovení, shrnout výsledky provedené v naší laboratoři a zjistit, jaký význam přinese vyšetření pro lékaře, ale hlavně pro pacienta.

6. Teoretická část

6.1. Prostata

Prostata, čili předstojná žláza, je svalově žlázový organ, skládající se z pěti zón. Je uložena pod močovým měchýřem a obkružuje močovou trubici. Po obou stranách jsou uloženy nervy, které pomáhají při erekci. Je tuhé konzistence a je obklopena vazivovým pouzdrém tvořeným kolagenem, ve kterém jsou přítomny hladké svalové buňky. Od pouzdra odstupují septa tvořící laloky, které v dospělosti nejsou tak patrné. Stroma prostaty obsahuje 30-50 rozvětvených tuboalveolárních žlázek, které se dělí na mukózní, submukózní a hlavní. Hlavní žlázy největším podílem přispívají ke tvorbě sekretu produkovaného prostatou. Sekret je střídán v prostatě a vypuzován při ejakulaci, obsahuje proteolytické enzymy (Pacík, 2009).

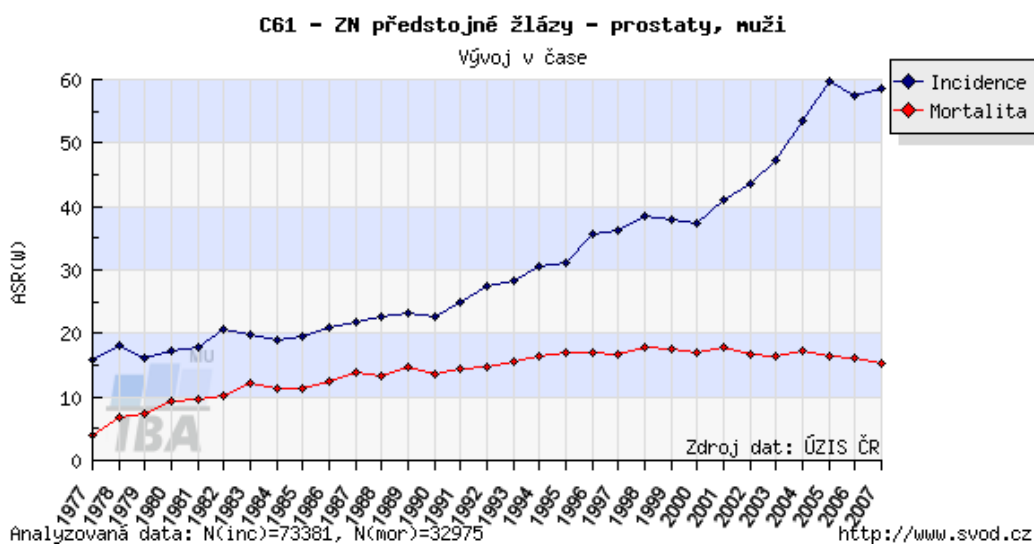
6.2. Problémy a onemocnění prostaty

Po 40 roku života často dochází k atrofii mukózních a submukózních žlázek, což může vést k částečné, nebo úplné obstrukci uretry, svůj vliv na tom mají také androgeny a estrogeny (Konrádová a kol., 2000).

Zbytnění (hyperplazii) prostaty, provází zbytnění nejenom žlázek, ale i stroma, dochází k problémům s močením, je ztíženo vyprazdňování močového měchýře, což může vést k zánětům a tvorbě kamenů.

Většina hyperplastických lézí se objevuje v přechodné části prostaty, naproti tomu u karcinomu prostaty se obstrukce uretry nevyskytuje tak často, protože se vyskytuje v periferních částech prostaty. CaP se nejčastěji objevuje u mužů ve věku 65-70 let. Ale asi u 50% mužů starších 80 let se vyskytuje latentní karcinom (Mačák, Mačáková, 2004).

Jen v Evropské unii se diagnostikuje až 300 000 nových případů a až 90000 mužů ročně umírá. I v České republice je výskyt vysoký a dochází k zhruba 10% nárůstu případů (Kolombo, 2009).



Obr.1 ukazuje vývoj v čase zhoubných nádorů prostaty (převzato z www.svod.cz)

Přesná příčina vzniku CaP dosud není známa, ví se ale, že velký vliv mají genetické predispozice, hormonální změny a až 30-40% podíl na vzniku CaP mají dietetické návyky a strava a s tím i výskyt obezity. Další faktory, které ovlivňují výskyt CaP, jsou věk, rasa a rodinná anamnéza. Karcinom poměrně brzo tvoří metastázy v periprostatických lymfatických uzlinách, ve vyšším stádiu proniká do semenných váčků, močového měchýře a také často proniká do kostí (Mačák, Mačáková, 2004).

Podle klasifikace WHO z roku 2004 se dělí epitelální nádory prostaty na acinární karcinom (klasický adenokarcinom), který má několik morfoloických variant a duktální adenokarcinom, který má tři podtypy. V prostatě se můžou

také vyskytovat tumory uroteliálního původu, dlaždicobuněčné, adenoskvamózní a karcinomy z bazálních buněk (Hes, Michal, 2006).

CaP roste většinou pomalu a nenápadně, klinicky se moc neprojevuje. Je velice nevyzpytatelný a nebezpečný nádor, který zůstává velkým zdravotnickým, sociálním i ekonomickým problémem. Pro diagnostiku je doporučováno první vyšetření u mužů, kteří mají v rodinné anamnéze výskyt CaP ve věku 40 let nebo ve věku 50 let a pak provádět kontrolu každý rok (Pacík, 2009).

6.3. Diagnostika karcinomu prostaty

6.3.1. Vyšetření per rectum

Tohle běžně prováděné ambulantní vyšetření má malou výpovědní hodnotu, protože takto můžeme vyšetřit pouze dorzální, ke konečníku obrácenou část prostaty. Jedná se o subjektivní vyšetření a je závislé také na zkušenostech a zručnosti lékaře. Pro pacienta vyšetření je nepříjemné s ohledem na citlivost vyšetřované oblasti, ale pokud místo není postižené také zánětem, nemělo by být bolestivé. Na normálně hladké, elastické a symetrické prostatě jsou nacházeny tuhá ložiska, ztráta ohraničení, nebo zvětšení prostaty. Toto vyšetření někteří pacienti těžce snášejí, ale vyšetření je důležité, protože každá změna je ihned indikací k biopsii, i když hladina PSA je nízká. Po histologickém vyšetření dojde k průkazu karcinomu jenom u 1/3 pacientů (Kaplan a kol., 2010).

6.3.2. Stanovení PSA

V roce 1988 způsobil pokrok v diagnostice objev prostatického specifického antigenu produkovaného žlázovou prostatickou buňkou, tím začala "PSA éra", která trvá dodnes. PSA je serinová proteináza, a v séru se vyskytuje

PSA buď jako volný a vázaný s alfa-1-antichymotrypsinem, nebo s alfa-2-makroglobulinem. Fyziologickou funkcí PSA je zkapalnění spermatu a tím usnadňování pohybu spermií, jeho koncentrace ve spermatu je velmi vysoká. V séru stanovujeme jak volný, tak vázaný s alfa-1-antichymotrypsinem. Volný a vázaný PSA je označován jako total (tPSA). Nejširšího uplatnění ale dosáhlo stanovení volného (fPSA).

I když je stanovení PSA využíváno hlavně jako screeningové vyšetření, jeho význam je také v monitorování a léčbě onemocnění. Vzhledem k tomu, že produkce PSA pochází nejenom z buněk nádorových, ale z buněk žlázových a jejich zvýšená produkce je i u hyperplazií prostaty, vyšetření má jenom 40% specificitu a nemůže jeho negativní výsledek vyloučit přítomnost nádoru.

Vyšší hodnota PSA, dnes stanovená nad hodnotu 4 ng/ml, je indikací k provedení transrektální biopsie prostaty a histologického vyšetření vzorku. Histologický výsledek je ale často negativní i u zvýšených hladin PSA a mnoho pacientů podstupuje zákrok zbytečně. Na druhé straně mnoho pacientů s prokázaným CaP má hladinu PSA nižší, než stanovená norma. Z toho důvodu se norma PSA přizpůsobuje také věku pacienta a do úvahy se bere také objem prostaty (Dvořáček, 2007).

Větší specificitu a také schopnost posoudit agresivitu nádoru nám umožňuje stanovení podílu volného a celkového PSA. Čím menší je podíl volného PSA, tím je vyšší riziko nálezu CaP. Tento poměr nám pomůže snížit počet zbytečně provedených biopsií, ale na druhou stranu, můžeme zanedbat některé případy.

Podle doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP) je stanovení hodnoty, která představuje zdravotní riziko odvozené od věku:

do 50 let = 2,5 ng/ml,

do 60 let = 3,5 ng/ml,

do 70 let = 4,5 ng/ml,

starší = 6,5 ng/ml.

U asymptomatických pacientů je ale význam stanovení PSA jako screeningového vyšetření diskutabilní, ale u pacientů s rodinou anamnézou, nebo s poruchami funkce močových cest, spolu s vyšším věkem se jeho výpovědní hodnota zvyšuje.

Důležitým faktorem, který je potřeba brát do úvahy, je potřeba odlišení benigní hyperplazie od karcinomu. Využívá se k tomu poměr volného a celkového PSA. Pokud je poměr větší než 20 %, jedná se ve většině případů o benigní hyperplazii.

Pokud dosáhne hladina PSA až 30 ng/ml, může to napovídat o přítomnosti vzdálených metastáz.

Pokud přetrvává zvýšená koncentrace PSA po radikální prostatektomii, znamená to buď přítomnost zbytkové choroby či lokální návrat.

Pokles PSA během léčby obvykle koreluje s délkou přežití. I některé neanalytické faktory mohou způsobovat zvýšené hladiny PSA, jsou to například stavy po předchozím digitálním rektálním vyšetření prostaty, nebo předchozí biopsie, či transuretrální resekce, nebo také další mechanické dráždění prostaty (Zima a kol., 2009).

Dalšími pomocnými metodami pro zvyšování specifity vyšetření je:

PSA denzita: je poměr celkového PSA a objemu prostaty. Pokud je vyšší než 0,1-0,15, je velká pravděpodobnost, že PSA je produkováno CaP a ne buňkami u BHP.

PSA velocita: dynamika změny prostaty. Zvyšování PSA ve třech vzorcích po sobě s ročním odstupem o více než 0,75 ng/ml zvyšuje pravděpodobnost CaP až na 90%. Posuzuje se pouze nárůst PSA, celková hodnota nemusí být ve zvýšených hodnotách. Důležité je použít stejnou metodu stanovení.

V případě podezření na přítomnost CaP, je jediný způsob, jak ho můžeme potvrdit, a to je provedení biopsie prostaty prováděné za kontroly pomocí transrektální ultrasonografie s následným histopatologickým vyšetřením odebrané tkáně (Pacík, 2009).

6.3.3. Transrektální ultrasonografie (TRUS)

Transrektální ultrasonografie byla pro vyšetření prostaty poprvé použita v šedesátých letech, původně byla vyvinutá pro vyšetřování onemocnění konečníku. Dokud se ale nezačaly používat sondy s vyšší frekvencí, snímky byly nízké kvality a tím nepoužitelné pro běžnou praxi. Zlepšením techniky bylo možné zobrazit strukturu prostaty, ale ani to nedokázalo identifikovat většinu zhoubných nádorů. Její největší výhodou je její dostupnost, cenová i časová nenáročnost. Výpovědní hodnota se přirovnává k výpovědní hodnotě vyšetření per rectum, není proto použitelná pro screeningové vyšetření. Spolu s tímto vyšetřením nám však může zhodnotit rozsah postižení prostaty karcinomem, nebo jeho přerůstání přes vazivové pouzdro. Ve většině případů se využívá k sonografickému kontrolování prováděné biopsie (Belej, 2009).

6.3.4. Biopsie

I když se jedná o ambulantní vyšetření, je to invazivní zákrok, pacienti mají z něho strach a může sebou přinést řadu komplikací. Proto je důležitá taky příprava pacienta na zákrok.

Den před biopsií se doporučuje dietní strava, v den vyšetření jenom lehká snídaně, hlavně u diabetiků, je potřebné dodržovat pitný režim, protože částečně naplněný močový měchýř usnadní lékaři orientaci v sonografickém obraze. Protože se jedná o transuretrální sondu, je potřebné důkladné vyprázdnění konečníku např. projímadlem. Po konzultaci s lékařem internistou, je nutné vysadit antikoagulační léčbu. Pacient musí mít negativní kultivační vyšetření moče.

V neposlední řadě je důležitá psychická příprava pacienta a poskytnutí mu dostatečného množství informací.

Před samotným vyšetřením je potřebné palpačně zkontrolovat poškození konečníku, které by komplikovalo zavedení sondy vyšetřením per rectum. Zákrok se provádí tenkou jehlou pomocí bioptické pistole. Celý průběh je kontrolován sonograficky. Odebírá se 8-12 vzorků z periferní části prostaty, pravděpodobného výskytu nádorových lézí. Výkon je nepříjemný, ale ve většině případů nebolestivý. Především bolesti je možné použitím lokální anestezie. Zřídka

se můžou objevit infekční komplikace po zákroku, které je nutné řešit s lékařem, časté jsou ale komplikace spojené s přítomností krve v moči a stolici po dobu až několik dní. Delší dobu se objevuje krev v ejakulátu.

Velkým problémem je, pokud je výsledek biopsie negativní a ostatní faktory poukazují na pozitivitu. Nevíme, jestli pacient karcinom opravdu nemá, nebo se nepovedlo odebrat správný vzorek. V tomto případě se musí vyšetření s odstupem času opakovat a pacient musí podstoupit další invazivní zákrok, při kterém se případně odebere víc vzorků s předem naplánovaným rozmístěním. Tomu by mohlo předcházet vyšetřování dalších parametrů, o kterých se budu zmiňovat dále (Čechová a Vojáčková, 2006).

6.3.5. Histologické vyšetření

Pozitivní vzorky charakterizujeme 5 stupni podle patologa Donalda F. Gleasona, podle kterého hodnotíme tzv. Gleason skóre, tj. součet nejčastějšího a druhého nejčastějšího stupně. Gleason skóre nám určuje klinickou agresivitu nádoru:

2 - nejméně agresivní

10 – nejvíce agresivní

Nález atypických buněk se označuje PIN (prostatická intraepiteliální neoplazie), nejedná se ještě o nádor, ale PIN stupně 2 až 3 je považován za prekancerózu.

Pro léčbu je důležité stádium nádoru. Jsou charakterizovaná systémem TNM:

T - primární nádor

T1- malý nádor, zjistitelný pouze histologicky, zvýšené PSA

T2 – již hmatatelný, jenom na prostatě

T3 – lokálně pokročilý přes pouzdro prostaty

T4 – lokálně velmi pokročilý, již do okolních orgánů

N – Regionální mízní uzliny

N1 – postižené také lymfatické cévy

M – Vzdálené metastázy

M1 – postižení buď mimo regionálních mízních uzlin, nebo metastázy v kostech TNM klasifikace umožňuje posoudit situaci, stanovit prognózu a rozhodnout o nejučinnějším typu a průběhu léčby (Kolombo, 2009).

6.3.6. Magnetická rezonance a magnetická rezonanční spektroskopie

Magnetická rezonance a magnetická rezonanční spektroskopie je neinvazivní, poměrně nákladná metoda využívaná k diagnostice. Je diagnostickou metodou, která nám přináší přesnější obraz o lokálním rozsahu nádorového onemocnění, ale nemá žádnou významnou roli v diagnostice CaP (Bárta a kol., 2010).

6.3.7. Ostatní specifická vyšetření

Reverzně transkripční – polymerázová reakce (RT-PCR) využívá stanovení buněk produkujících PSA v krvi, přítomnost buněk v krvi, ale nepotvrzuje metastazující nádor a proto je význam detekce nejednoznačný.

ProstaScint – radioizotopové stanovení specifického antigenu na povrchu prostatických buněk (PMSA – prostatický membránový specifický antigen), hlavně u pokročilých stádií. Obtížná interpretace, proto se běžně v praxi nepoužívá. (Pacík, 2009)

Stanovení EPCA-2 proteomický test zaměřený na stanovení nukleárního proteinu EPCA2. Vyšetření se provádí ze séra, stanovujeme protilátky proti epitopu EPCA2.22, má 92% specifitu a umožňuje odlišit nádory lokalizované na prostatě a pokročilé nádory (Dvořáček, 2007).

6.4. Co je to PCA3 ?

PCA3 (Prostate Cancer Antigene 3), nebo jinak nazývaný DD3 (Differential Display Code 3) je gen, který kóduje mRNA specifickou pro tkáň prostaty. U CaP byla potvrzená jeho zvýšená exprese. Roku 1999 byl poprvé popsán Bussemarkersovou a kol. v Nijmegene v Holandsku.

Bussemarkers a kol. (1999) porovnali kombinace a míru exprese mRNA maligní a nemaligní tkáně prostaty. Pro další studium zvolili cDNA genu DD3, který vykazoval 10 – 100krát násobnou expresi v tumorové tkáni prostaty oproti nemaligní. Exprese byla prokázána už v časných stádiích a u metastáz. Testováním dalších orgánů a tkání prokázali, že DD3 exprese je výlučně specifická pro prostatu. Exprese PCA3 nebyla prokázána v normálních tkáních močového měchýře, mozku, střeva, sleziny, jater, slinivky, srdce, plic, semenných váčků, varlat, vaječnicků, kosterního svalu a kůže. Podobně nebyla zjištěna ani v jiných nádorových tkáních jako v nádorech prsu, děložního krčku, vaječniku a buněčných liniích z močového měchýře, ledvin, prsou a vaječnicků. Získáváme tím specifický biomarker pro diagnostiku CaP. Vyšetření pomocí genové sondy prokázalo umístění genu na 9. chromozomu (Bussemakers a kol., 1999).

Podle posledních studií byla objevena exprese specifické mRNA až u 90% tkání s prostatickou intraepiteliální neoplazií vysokého stupně. Zvýšená exprese se vyskytovala téměř ve všech vzorcích studie už v časných stádiích onemocnění a exprese byla prokázána i v metastázách do kostí a uzlin (Popa a kol., 2007).

V jádře nebyla funkce PCA3 prokázána a zatím není známá ani cytoplazmatická bílkovina, která by vznikala transkripcí tohoto genu (Meng a kol., 2002). Nepřítomnost bílkoviny znesnadnila případné klinické využití, proto se analýza zaměřila na cílovou molekulu mRNA. Po studiích prováděných v tkáních, přes tělní tekutiny, jako ejakulát, exprimát apod., se jako vhodný diagnostický materiál začala používat moč po jednoduché masáži prostaty (van Gils, 2007).

7. Experimentální část

7.1. Analýza PCA3

7.1.1. Používaná souprava

V naší laboratoři provádíme vyšetření od roku 2009. Ke stanovení používáme komerčně vyráběnou soupravu Progens PCA3 od firmy Gen-Probe Inc. USA.

Test TMA (transkripčně zprostředkovaná amplifikace) je amplifikační test mRNA in vitro, který detekuje mRNA genu č. 3 CaP (PCA3) ve vzorcích moči. Současně probíhá kvantifikace mRNA PSA, což nám umožňuje standardizaci metody. Částečnou automatizací je možné zabránit případným analytickým chybám (Gen-Probe, 2006-2009).

7.1.2. Odběr a transport materiálu

Doporučuje se vypít většího objemu vody (cca 500ml) před samotným odběrem. Lékař provede vyšetření per rectum a stlačí každý lalok do hloubky 1cm směrem od báze k apexu, ze strany do středu celkem 3x.

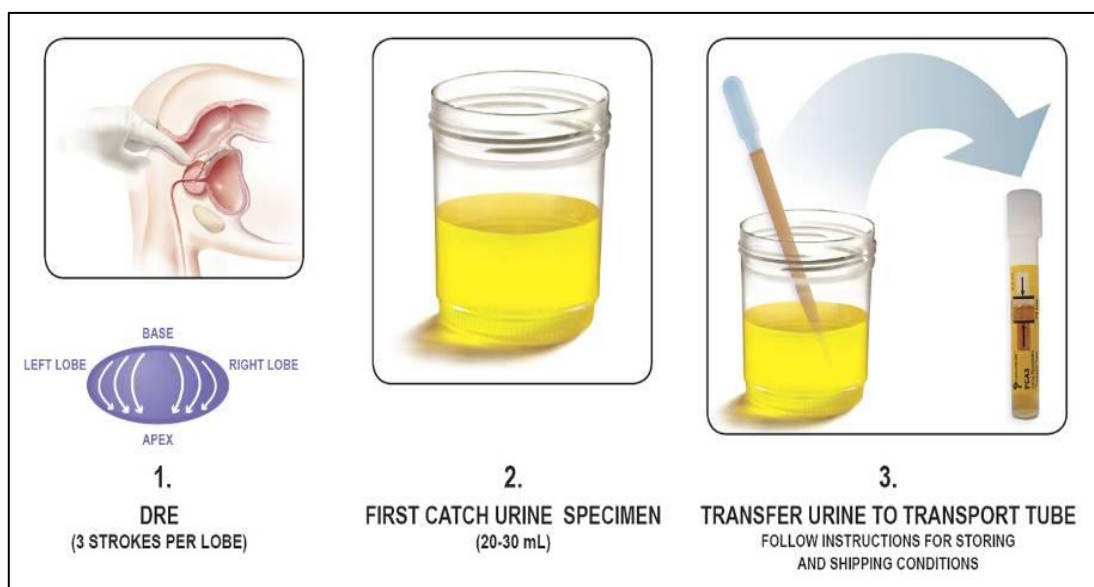
Je potřebné zachytit 20-30ml prvního proudu moči do kelímku bez přidání jakýchkoliv konzervačních látek.

2,5ml moči se přenese do přepravní zkumavky nejpozději do 4hod. po odběru. Správná hladina moči je vyznačená ryskou na zkumavce.

Používají se jednorázové rukavice bez talku a je potřebné dbát na riziko kontaminace vzorku. Přepravní zkumavky jsou dodávány na vyžádání firmou Gen-Probe.

Vzorky musí být do laboratoře dodány do 5 dní od odběru, do analýzy je laboratoř může uchovat 14 dní při 2-8°C, nebo až 90 dní při teplotě -20°C, nebo nižší. Zmrazené vzorky je možné až 5x rozmrazit.

Firma Gen-Probe vypracovala názorný návod správného odběru, který spolu s odběrovou zkumavkou naše laboratoř dodává všem lékařům, spolu s příslušnou žádankou.



Obr. 2 Názorný návod správného odběru vzorku pro stanovení PCA3, vytvořen firmou Gen-Probe (převzato s příbalového letáku k soupravě Progensa PCA3)

7.1.3. Princip vyšetření

Test využívá molekulárně biologickou metodu transkripce zprostředkovanou amplifikací (TMA), která se používá k stanovování specifické RNA. Požadovaný úsek RNA je přepsán do DNA, následně dochází k opětovnému přepsání do RNA a tak za využití reverzní transkriptázy a polymerázy je možné docílit vzniku několik stovek až tisíců molekul RNA. Jedná se o izotermickou metodu, jednotlivé fáze probíhají současně v reakční zkumavce (Bednář, 1997).

Postup vyšetření se skládá ze tří hlavních kroků: izolace mRNA „metodou zachycení cíle“, amplifikace mRNA „metodou transkripce zprostředkovanou amplifikací“ a detekce „metodou ochrany hybridizované sondy“.

Test je tvořen dvěma kvantitativními amplifikačními testy nukleové kyseliny jedním pro mRNA PCA3 a druhým pro mRNA PSA. Molekuly cílové mRNA jsou izolovány ze vzorku moči pomocí metody zachycení cíle: hybridizací se specifickým oligonukleotidem. Po hybridizaci dochází k zachycení cílové mRNA na magnetické mikročástice. Promýváním v magnetickém poli dochází k odstranění cizorodých komponent ze vzorku a tím separaci mRNA. K amplifikaci izolované nukleové kyseliny dochází transkripce za využití reverzní transkriptázy Moloneyho viru myší leukemie a polymerázy T7 RNA. Detekce produktu probíhá pomocí chemiluminiscenční reakce, kdy signál produkovaný hybridizovanou sondou je měřen pomocí luminometru a je udáván jako relativní světelné jednotky (RLU). Pomocí kalibrátorů se známou koncentrací PCA3, nebo PSA je sestrojena kalibrační křivka, z které jsou odečteny výsledky. Každá série obsahuje také kontroly. Po kvantifikaci PCA3 je stanoveno PCA3 skóre – poměr kopií PCA3 mRNA ke kopiím PSA mRNA vynásobený 1000.

Stanovení mRNA PSA se využívá k normalizaci metody, protože nám podává informaci o množství prostatické mRNA. mRNA PSA se totiž na rozdíl od PCA3 exprimuje jak v buňkách nádorových, tak i buňkách benigní tkáně (Gen-Probe, 2006-2009).

7.1.4. Postup vyšetření

Pracovní postup je součástí soupravy a vyžaduje se jeho důsledné dodržování. Obzvláště důležité je dodržování bezpečnostních procedur, které mohou zabránit kontaminaci vzorku. Používají se pouze rukavice bez talku a je nutná jejich výměna po každém úkonu. Pracovní plochy, pipetory a jiné vybavení musí být pravidelně dekontaminovány pomocí 2,5 až 3,5% (0,35 M až 0,5 M) chlornanu sodného (roztok bělidla).

Důrazně se doporučuje rozdělení preamplifikačního a postamplifikačního pracovního prostoru. Je vhodné také uspořádání provozu v jednom směru, aby se nevstupovalo opakovaně z postamplifikačního prostoru do prostoru přípravy činidel. Jenom dodržováním těchto pravidel je možné zabránit kontaminaci vzorku aplikonem.

Stručný postup analýzy:

Preamplifikační fáze

Po přípravě činidel, nastavení inkubátorů dle návodu, pipetujeme potřebné množství vzorků, kalibrátorů a kontrol. Kontroly a vzorky vyšetřujeme vždy ve dvou a kalibrátory ve třech replikátech, pro PCA3 i PSA zvlášť.

Přidáním činidla pro zachycení cíle, při inkubaci ve vodní lázni na 62 ± 1 °C, nastává preamplifikační fáze, během které je izolována specifická mRNA.

Amplifikace

Amplifikace začíná přidáním enzymatického činidla do amplifikační směsi s izolovanou mRNA. Inkubace probíhá při teplotě 42 ± 1 °C.

Postamplifikace

Celý postup musí následně probíhat v prostoru odděleném od místa, kde probíhala preamplifikační a amplifikační fáze.

Hybridizace

Přidáme 100 µl rekonstituovaného činidla sondy specifického pro analyt a inkubujeme při teplotě 62 ± 1 °C.

Selekce

Nastává přidáním selekčního činidla a inkubujeme při teplotě 62 ± 1 °C.

Detekce

Hodnoty odečteme pomocí LEADERu HC+ s příslušným softwarem.
(Gen-Probe, 2006-2009)

7.1.5. Vyhodnocení testu

Kalibrátory a kontroly musí být používány s každou sérií vzorků a pro platnost testu, musí být splněna validační kritéria udána výrobcem. Software PCA3 automaticky hodnotí výsledky s požadovanými kritérii. Pokud nejsou dodrženy podmínky, nemůže být test hodnocen a výsledky použity. Hodnocení je zvláště pro PCA3, nebo PSA a u selhání jednoho testu, je nutné opakovat pouze tento nevyhovující test (Gen-Probe, 2006-2009).

7.1.6. Interpretace výsledku PCA3 skóre

Jedná se o poměr kopií PCA3 mRNA ke kopiím PSA mRNA vynásobeno 1000. Software automaticky páruje výsledky obou analytů, PCA3 i PSA a stanovuje PCA3 skóre. Pokud stanovení jednotlivých analytů probíhalo zvláště, ne v jednom cyklu, je možné manuální spárování výsledků a výpočet skóre. Vedoucí laboratoře podle doporučení stanoví mezní hodnotu skóre. Všechny výsledky pod tuto hodnotu se hodnotí jako negativní, vzorky s vyšší hodnotou jako pozitivní, nebo hraniční výsledky. Pokud dojde k naměření hodnoty mimo rozsah kalibrační křivky, je nutné test opakovat. Pokud se jedná o příliš nízkou hodnotu, znamená to, že vzorek nemá dost RNA ke kvantifikaci a odběr je potřebné opakovat. V případě, že je hodnota příliš vysoká, test je nutné opakovat s naředěným vzorkem.

Diagnostická specifita a senzitivita byla výrobcem testována na 529 pacientech v klinických centrech severní Ameriky. U všech pacientů bylo plánované provedení biopsie prostaty. Na základě výsledku bylo stanoveno procento pravděpodobnosti positivity biopsie.

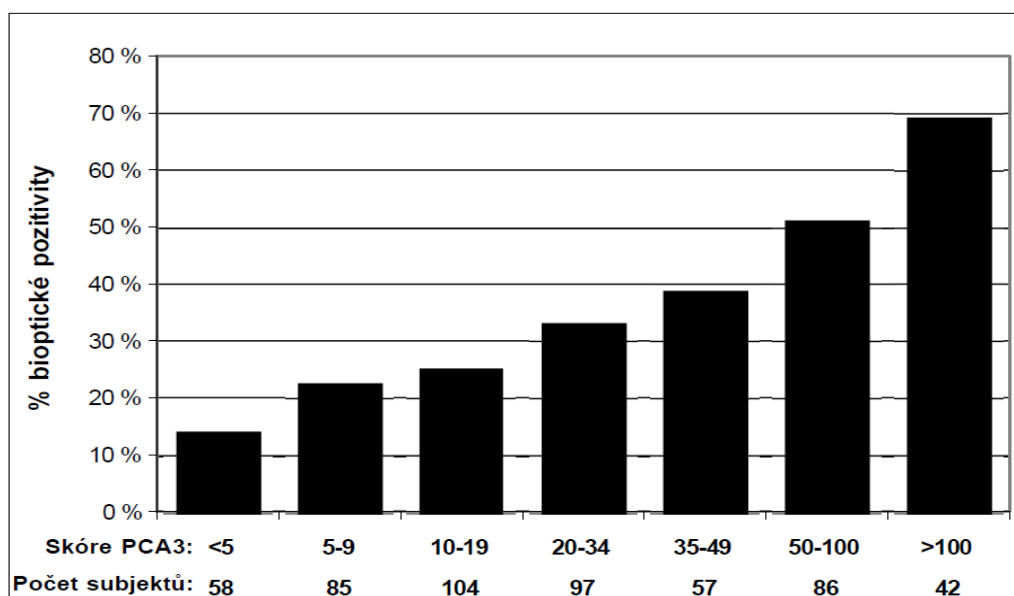
Průměrný věk pacientů byl 64 ± 8

Průměrná hladina PSA v séru = $7,9 \pm 21,9 \mu\text{g/l}$

Průměrný objem prostaty = $44 \pm 25 \text{ cc}$

34 % (180/529) biopticky pozitivních pro karcinom prostaty

(Gen-Probe, 2006-2009).



Obr. 3 Obrázek ukazuje korelace skóre PCA3 s pravděpodobností pozitivní biopsie (převzato s příbalového letáku k soupravě Progenza PCA3)

Mezní hodnota skóre PCA3	5	10	15	25	35	50	95
Senzitivita	96%	85%	77%	63%	53%	41%	17%
Specifická	14%	33%	47%	61%	74%	84%	95%

Tab.1 Tabulka diagnostické specifické a senzitivity testu Progenza PCA3 při různých mezních hodnotách PCA3 skóre (převzato z příbalového letáku k soupravě Progenza PCA3)

Naše laboratoř na základě několika doporučení stanovila mezní hranici stanovení na hodnotu 35. První studie, kterou prováděli Marks, Fradet a kol. (2007), testovala 233 pacientů a na základě výsledků, doporučují jako cut off pro skóre PCA3 hodnotu 35. Právě u této hodnoty dosáhli 58% senzitivitu a 72% specifickou (Marks a kol., 2007).

Další studii, která doporučuje stanovení mezní hodnoty na hodnotu 35, prováděl Haese a kol. (2008) na 463 pacientech. Ve výsledcích své studie tvrdí, že pokud se jako mezní hodnota použije hodnota 35, dosáhneme tak optimální bilanci mezi senzitivitou a specifickou testu. Specifickou testu u detekce CaP uvádějí na 72% (Haese a kol., 2008).

7.2. Výsledky pacientů prováděných v naší laboratoři

Naše laboratoř provádí vyšetření od roku 2009. Vzorky do laboratoře zasílá MUDr. Belej z Urologického oddělení Ústřední vojenské nemocnice v Praze, který provádí studii na vyšetření PCA3 u pacientů, u kterých už byl diagnostikován CaP. Další skupinu vzorků představují vzorky pacientů zasláné z ambulantních pracovišť od pacientů s různými diagnózami.

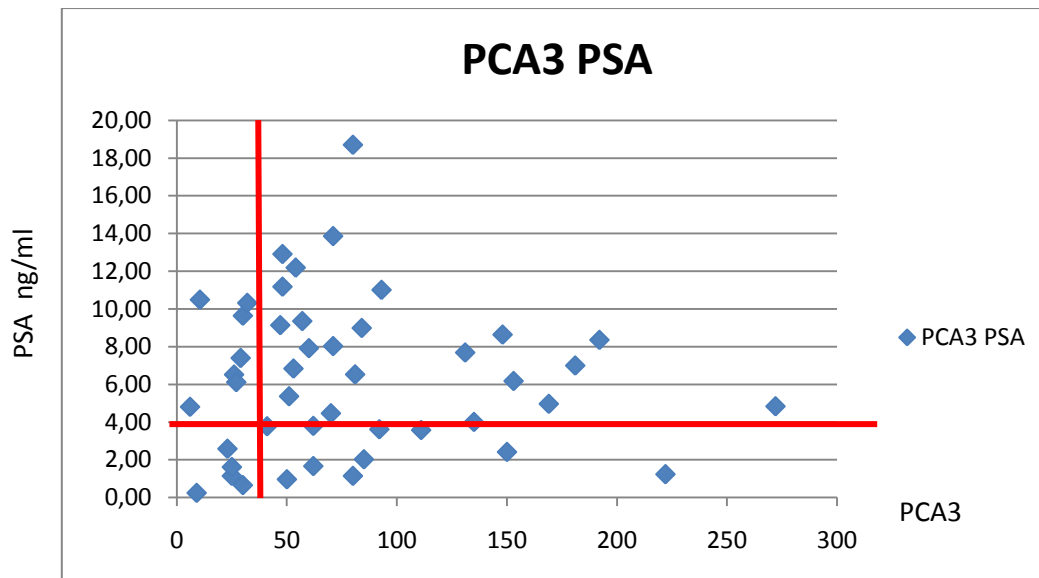
Za 2 roky, po které analýzu provádíme, vyšetřili jsme 317 pacientů. Porovnála jsem výsledky PCA3 skóre s hodnotou PSA, spolu s uváděnou diagnózou.

Při porovnávání hodnot naměřených v naší laboratoři nebylo použito všech 317 výsledků, které jsme naměřili. Nemohla jsem použít všechny hodnoty, protože někteří lékaři neuvedli všechna data, které jsme od nich požadovali, často chyběl výsledek PSA, nebo výsledek biopsie, pokud byla u pacienta provedena. Dále nevíme, nakolik byly uváděné diagnózy přesné. U obr. 8. a 9. jsou hodnoty pacientů ze studie, kterou provádí MUDr. Belej, jsou to pacienti s již diagnostikovaným karcinomem.

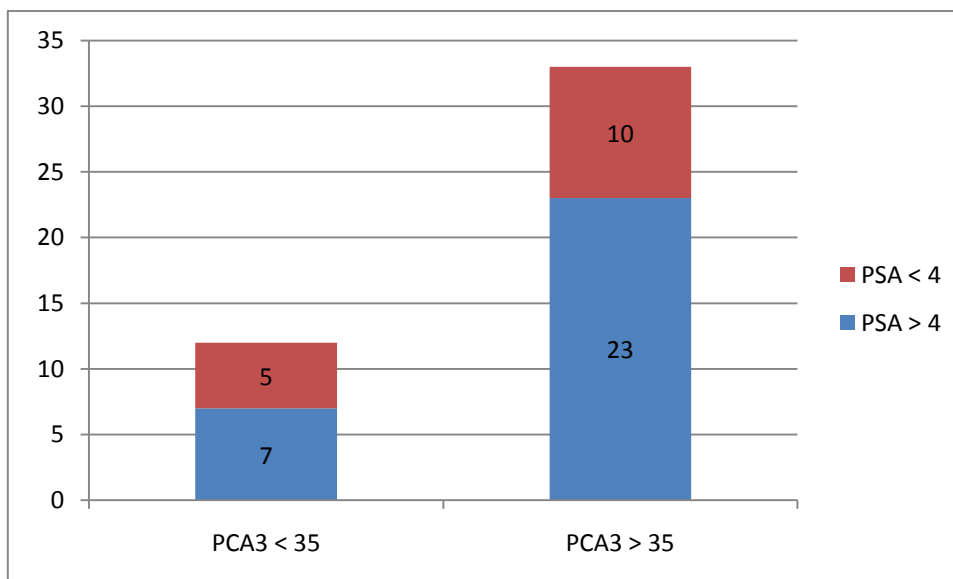
Všechny hodnoty jsem porovnála v následujících grafech:

V prvním obrázku jsou vždycky bodově vyznačení pacienti u jednotlivých diagnóz s hodnotou PSA i PCA3. Zvýraznila jsem hranici 4ng/ml u PSA a hodnotu skóre PCA3 na 35.

Ve druhém obrázku jsou u jednotlivých diagnóz zvýrazněné počty pacientů, které dosahovali různé hodnoty PSA i PCA3.

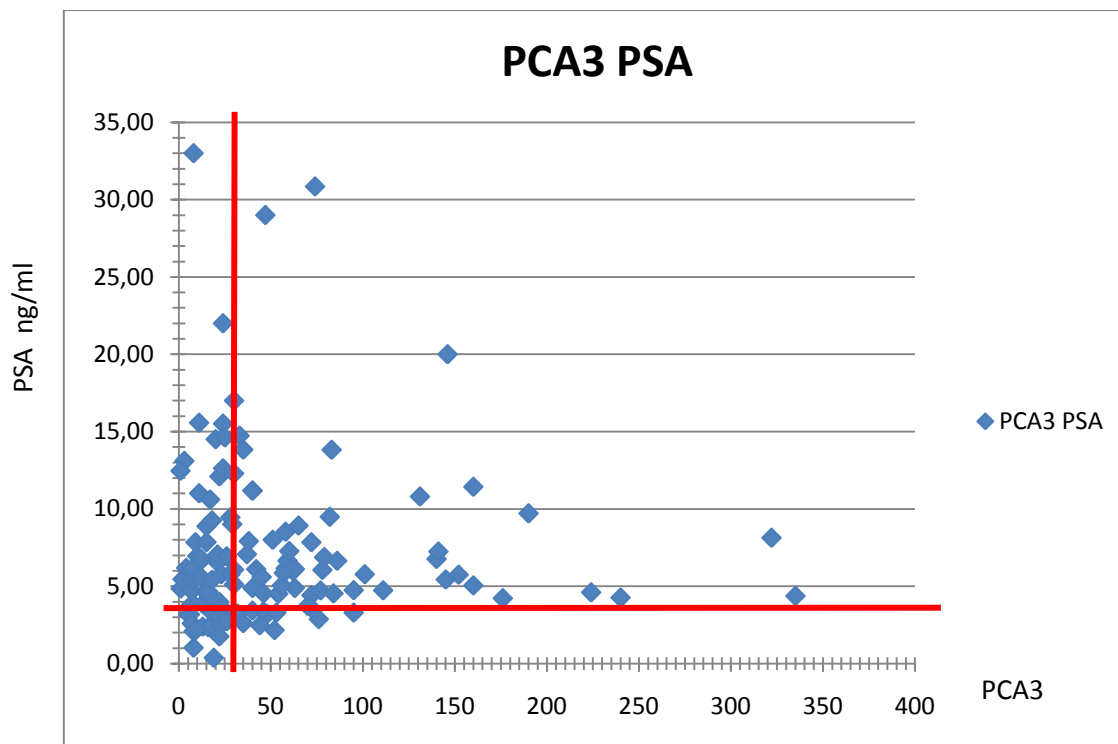


Obr. 4. Porovnání hodnot PCA3 a PSA u diagnózy C61, dvojice hodnot

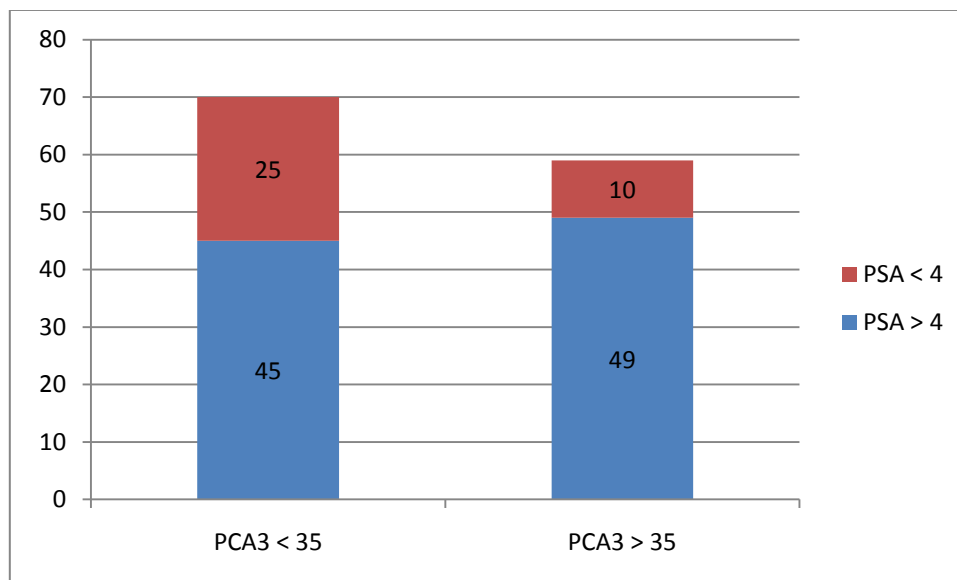


Obr. 5. Porovnání hodnot PCA3 a PSA u diagnózy C61, počty výsledků podle naměřených hodnot

Obr. 4. a 5. ukazují naměřené hodnoty porovnáním PCA3 a PSA u uvedené diagnózy C61. V obrázcích jsou zvýrazněné mezní linie hraničních hodnot u PCA3 35 a u PSA 4ng/ml.

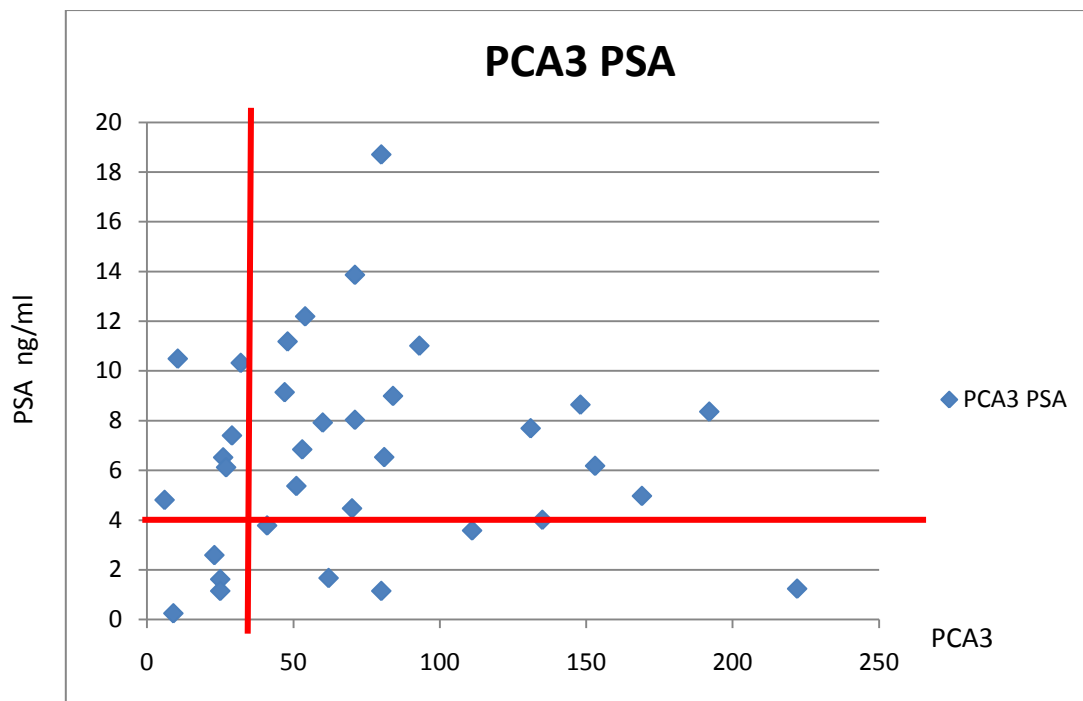


Obr. 6. Porovnání hodnot PCA3 a PSA u diagnózy N40, dvojice hodnot

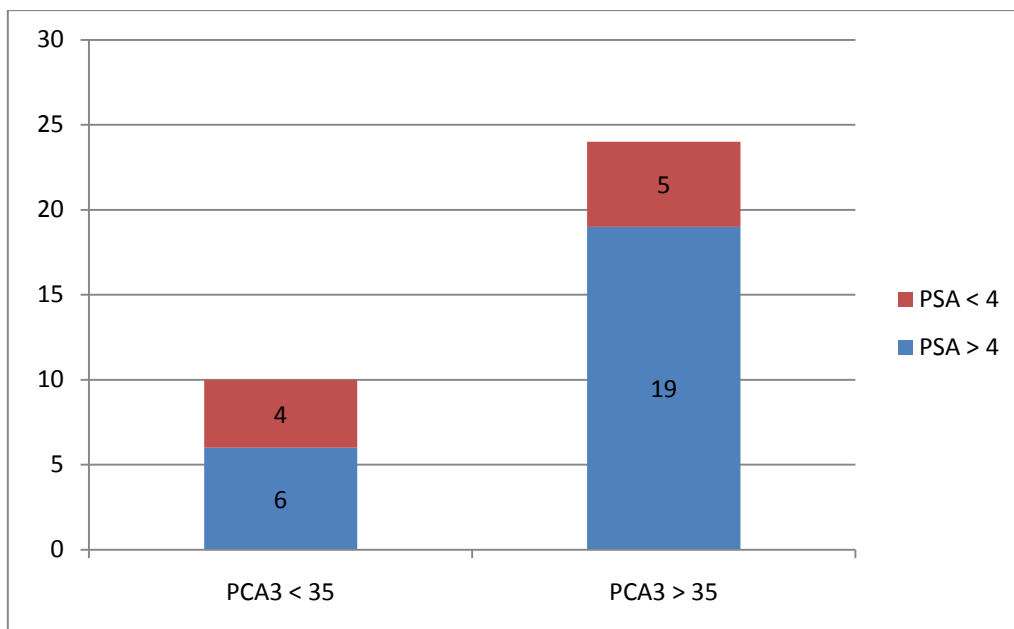


Obr. 7. Porovnání hodnot PCA3 a PSA u diagnózy N40, počty výsledků podle naměřených hodnot

V obr. 6. a 7. jsou vyneseny výsledky pacientů s uvedenou diagnózou N40 a vyznačenými liniemi pozitivit.



Obr. 8. Porovnání hodnot PCA3 a PSA u potvrzených karcinomů, dvojice hodnot



Obr. 9. Porovnání hodnot PCA3 a PSA u potvrzených karcinomů, počty výsledků podle naměřených hodnot

Obr. 8. a 9. porovnávají hodnoty PCA3 a PSA u už potvrzených karcinomů prostaty.

8. Diskuse

Při porovnávání hodnot, které jsme našim zpracováním získali, jsem nenašla jednoznačný vztah mezi jednotlivými parametry, který by vykazoval přímou úměru. Obecně lze říci, že se zvyšující se hodnotou PCA3 skóre se zvyšuje pravděpodobnost pozitivní biopsie.

Řada prací se věnuje detailnímu rozboru dat získaných ze svých souborů pacientů, autoři hledají schéma pro zařazení vyšetření PCA3 skóre a situace, ve kterých je přínos vyšetření nejvyšší.

Haese a kol. (2008) sledovali klinický přínos PCA3 testu v evropské prospektivní studii na 463 pacientech, kterým byla indikována opakovaná biopsie. PCA3 skóre nebylo závislé na počtu předchozích biopsií, věku, objemu prostaty a hodnotě celkového PSA. Dále bylo skóre signifikantně vyšší u HGPIN (*High-grade prostatic intraepithelial neoplasia*), klinického stádia T2 a Gleason skóre rovnající se či vyššího než 7.

Deras a kol. (2008) studovali přínos zařazení testu PCA3 ke stávajícím diagnostickým indikátorům: objem prostaty, výsledek vyšetření DRE (vyšetření per rektum, digital rectal exam), sérové PSA. Byl prokázán statisticky významný přínos pro predikci výsledku biopsie.

Tombal a kol. (2011) tvrdí, že vyšetření je nejvhodnější pro muže, kteří mají za sebou aspoň jednu negativní biopsii, PSA ≥ 3 ng/ml a očekávanou délku přežití více než 10 let.

Rubo-Briones a kol. (2011) upozorňuje na to, že rutinní používání PCA3 markeru díky jeho vysoké negativní předpovědní hodnotě (NPV) významně snižuje počet biopsií. Největší přínos zjistil u pacientů bez předchozí biopsie nebo pouze s jednou.

Vlaeminck-Guillem a kol. (2011) studoval použití PCA3 na 102 pacientech, kteří podstoupili radikální prostatektomii. Zjistili, že PCA3 prokazatelně koreluje s celkovým objemem nádoru, ale nekoreluje s Gleason skóre. PCA3 skóre pozitivně koreluje s apikální a bazální invazí nádoru a s bilaterální lokalizací a s větším počtem ložisek. Podle nich je PCA3 skóre nápomocno v předoperačním výběru pacientů pro aktivní sledování nebo lokální léčbu.

PCA3 skóre by mělo zvyšovat přesnost předpovědi pozitivní biopsie u pacientů s PSA < 10ng/ml, u kterých je pravděpodobnost výskytu CaP přibližně 20 – 30 %, u opakovaných biopsií, pacientů s rodinnou anamnézou a pacientů s pozitivním výsledkem vyšetření per rectum, nebo vysokou hodnotou PSA (Kaplan a kol., 2010).

Podle de la Taille a kol. (2011) nám PCA3 může pomoci při rozhodování u vedení první biopsie. Je lepší než stanovení PSA, volný PSA a jiné faktory v předpovědi pozitivity prvního výsledku biopsie, může indikovat agresivitu nádoru.

Klečka a kol. (2010) ve své studii stanovením PCA3 v tkáních získaných biopsií prokázali, že hladina PCA3 byla prokazatelně vyšší ve vzorcích u pacientů s CaP, než u pacientů s benigní hyperplazii prostaty. Zkoumáním vztahu PCA3 s typem nádoru, jeho rozsahem, případně přítomnosti metastáz, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Dále ve své studii upřednostňuje stanovení PCA3 ve tkáních, protože u stanovení v moči může nastat případný nedostatek biologického materiálu ke stanovení (Klečka a kol., 2010).

Studie Belej a kol. (2010) naznačuje možnost rozlišení lokalizovaného nádoru od invazivního. Pomocí hodnoty PCA3 skóre může tak lékař korigovat operativní zákrok při rozhodování o tom, jak velkou část tkáně je nutné odebrat, případně, jestli je nutné přistoupit k totální prostetektomii. Snaží se tak o co nejmenší zásah do pacienta, kvůli zachování všech funkcí tkání.

9. Závěr

Naše data potvrzují, že samotná vyšetření jak PSA, tak PCA3 nejsou dostatečným podkladem pro diagnostiku karcinomu prostaty. Zařazení vyšetření PCA3 skóre do vyšetřovacího schématu snižuje počet provedených biopsií, zvyšuje přesnost diagnostiky a dává možnost pacientovi poskytnout nejvhodnější péči.

Na dané téma v současné době probíhá řada studií, to poukazuje na fakt, že PCA3 je rozhodně marker, který může hrát v diagnostice CaP důležitou roli a že stojí za pozornost lékařů i vědeckých pracovníků.

Do budoucna bychom rádi s lékaři navázali intenzivnější spolupráci. Bylo by dobré požádat je znovu po provedení testu o výsledek biopsie. Rádi bychom také znali jejich hodnocení přínosu testu, jestli jim pomáhá v rozhodování při indikaci biopsie, nebo v léčbě. Pokusili jsme se formou dotazníku získat tyto informace, ale pouze jeden ambulantní lékař byl ochoten spolupracovat.

Dalším faktorem, který nám stěžuje intenzivní využití PCA3 v diagnostice je fakt, že vyšetření není hrazeno pojišťovnou. Jako každé molekulárně biologické vyšetření, je to nákladná záležitost a tak ne každý lékař, který i by měl zájem o vyšetření, je schopen ho ordinovat. Vzhledem k tomu, že nám PCA3 skóre nedává jasný výsledek, jestli pacient trpí, nebo netrpí CaP, mnoho pacientů pravděpodobně radši podstoupí biopsii. I když má biopsie hodně vedlejších komplikací, může poskytnout přesnější výsledek. Pokud přetrvávají ostatní biochemické markery zvýšené, biopsie se ale často opakuje.

Pokud bude více studií, lékaři budou více informovaní o výsledcích vyšetření a jeho významu. Když pacienti nebudou muset sami hradit vyšetření PCA3 a bude se rutinně provádět, tak věřím, že si PCA3 najde svoje nezastupitelné místo v diagnostice CaP. Budeme moci pak naplno využít jeho potenciál při predikci pozitivitu biopsie, při zkoumání agresivity nádoru, nebo monitorování léčby už diagnostikovaných nádorů.

10. Seznam použité literatury

- BARTAL, J.; RYZNAROVA, Z.; KLEZL, P.; ZAŽURA, F.; ADAMOVA, M.; KAŠPAR, M.; NOVAK, J. Postavení magnetické rezonance a magnetické rezonanční spektroskopie při detekci karcinomu prostaty. *Ces Urol.* 2010, 14(3): 186-196.
- BEDNÁŘ M. Molekulárně genetické metody v rutinní mikrobiologické diagnostice, *Remedia – Klinická mikrobiologie.* 1997.
- BELEJ K. Transrektální biopsie prostaty v diagnostice karcinomu prostaty. *Urol pro praxi.* 2009, 1: 7–10.
- BELEJ, K.; KAPLAN, O.; KÖHLER, O.; KOČÁREK, J. Molekulární genetika a prostate cancer gene 3 (PCA3) v diagnostice karcinomu prostaty. *Urolog. pro Praxi.* 2010, 11(2): 82-85.
- BUSSEMAKERS, M.J.; van BOKHOVEN, A.; VERHAEGH G.W.; SMIT, F.; KARTHAUS,H.; SCHALKEN, J.A.; DEBRUYNE F.; NING RU; ISAACS B. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 1999, 59: 5975–5979.
- ČECHOVÁ, H.; VOJÁČKOVÁ, M. Transrektální biopsie prostaty. *Sestra.* 2006, č.4, str. 47.
- DVOŘÁČEK, J.: Karcinom prostaty – aktuální pohled. www.zdn.cz. [ZDN](#) > [Archiv](#) > [Příloha: Lékařské listy](#) > [LL 19/2007](#) .
- van GILS, M.P.; CORNEL, E.B.; HESSELS, D. Molecular PCA3 diagnostics on prostatic fluid. *Prostate.* 2007, 67 (8): 881–887.
- Gen-Probe, příbalový leták k soupravě Progensa PCA3 firmy Gen-Probe Inc. USA., ©2006-2009, Gen-Probe Incorporated, 501377CS, Rev. A.1, 2009-05

- HAESE, A.; de la TAILLE; van POPPEL; MARBERGER, M.; STENZL, A.; MULDER, P.; HULAND, H.; ABBOU, C.; REMZI, M.; TINZL, M.; FEYERABEND, S.; STILLEBROER, A. B.; van GILS, M.; SCHALKEN, J.A. Clinical utility of PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy. *European Urology*. 2008.
- HES, O.; MICHAL, M.: *Histologické vyšetření prostaty zaměřené na karcinom*. 2006, www.zdn.cz
- KAPLAN, O.; BELEJ, K.; KÖHLER, O. Současné trendy diagnostiky karcinomu. *Onkologie*. 2010, 4(2): 68–71.
- KLEČKA, J.; HORA, M.; HOLUBEC, L.; PEŠTA, M.; TOPOLČAN, O.; ERET, V.; CHOTTOVÁ-DVOŘÁKOVÁ, M.; BABJUK, M.; NOVÁK, K.; STOLZ, J. Expres DD3 mRNA ve tkáni prostaty u pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty. *Ces Urol*. 2010, 39-47.
- KOLOMBO, I.; PORŠOVÁ, M.; ZEMANOVÁ, I.; HORECKÝ, M.; ANTONOVÁ, P.; VLÁSEK, T.; PORŠ, J.; PONĚŠICKÝ, J.; BARTŮNĚK, M. Prostatický specifický antigen (PSA) – situace v roce 2007. *Onkologie*. 2008, 2(1): 39-43.
- KOLOMBO, I. *Rakovina prostaty informace pro muže, jejich rodiny a lékaře*, Arcus. 2009.
- KONRÁDOVÁ, V.; UHLÍK J.; VAJNER L. *Funkční histologie*. 2.vyd.. HaH, 2000, str.212-213.
- MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. Grada, 2004, str.293-295.
- MARKS, L.; FRADET, Y.; DERAS, A.Y.; BLASE, I.; MATHIS, J.; AUBIN, S.; CANCIO, A.T.; DESAULNIERS, M.; ELLIS, W. J.; RITTENHOUSE, J.; GROSKOPF, J. PCA3 Molecular Urine Assay for Prostate Cancer in Men Undergoing Repeat Biopsy, *Adult Urology*. 2007, Elsevier Inc. 532-535.
- MENG, F.J.; SHAN, A.; JIN, L.; YOUNG C.Y. The expression of a variant prostate-specific antigen in human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002, 11 (3): 305–309.

- PACÍK, D. Karcinom prostaty a benigní hyperplazie prostaty. 2009, převato z: http://www.euni.cz/review_win.php?review=24&akce=6093825.
- POPA, I.; FRADET, Y.; BEAUDRY, G. Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization. *Mod Pathol.* 2007, 20:1121–1127.
- RUBIO-BRIONES, J.; FERNÁNDEZ-SERRA, A.; RAMÍREZ, M.; RUBIO, L.; COLLADO, A.; CASANOVA, J.; GÓMEZ-FERRER, A.; RICÓS, J.V.; MONRÓS, J.L.; DUMONT, R.; ORTIZ, B.; IBORRA, I.; GARCIA-CASADO, Z.; SOLSONA, E.; LOPÉZ-GUERRERO, J.A. Outcomes of Expanded Use of PCA3 Testing in a Spanish Population with Clinical Suspicion of Prostate Cancer. *Actas Urol Esp.* 2011, (Epub ahead of print).
- de la TAILLE; IRANI, J.; GRAEFEN, M; CHUN, F.; de REIKE, T.; KIL, P.; GONTERO, P.; MOTLAZ, A.; HAESE, A. Clinical evaluation of PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol.* 2011 Jun, 2119-25.
- TOMBAL, B.; AMEYE, F.; de la TAILLE, A.; de REIJKE, T.; GONTERO, P.; HAESE, A.; KIL, P.; PERRIN, P.; REMZI, M.; SCHRODER, J.; SPEAKMAN, M.; VOLPE, A.; MEESEN, B.; STOEVELAAR, H. Biopsy and treatment decisions in the initial management of prostate cancer and the role of PCA3: a systematic analysis of expert opinion. *World J Urol.* 2011. (Epub ahead of print).
- VLAEMINCK-GUILLEM, V.; DEVONEC, M.; COLOMBEL, M.; RODRIGUEZ-LAFRASSE, C.; DECAUSSIN-PETRUCCI, M.; RUFFION, A. Urinary PCA3 score predict prostate cancer multifocality. *J Urol.* 2011 Apr. 1234-9, Epub 2011 Feb 22.
- ZIMA, T.; VORLÍČEK, J.; TOPOLČAN, O. Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP) České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP), České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) - sekce imunoanalytických metod k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus.* 2009, 17 (38), No. 1, p. 42-54.

www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#