

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**KARCINOM PROSTATY A JEHO LABORATORNÍ
DIAGNOSTIKA**

Bakalářská práce

Hradec Králové, 2008

GALLOVÁ Martina

Bakalářská práce

**KARCINOM PROSTATY A JEHO LABORATORNÍ
DIAGNOSTIKA**

**PROSTATE CANCER AND HIS LABORATORY
DIAGNOSTICS**

Gallová Martina

studijní program: Zdravotnická bioanalytika – kombinovaná
forma

vedoucí bakalářské práce: **MUDr. Hornych Josef**
garant za KBLV: **PharmDr. Nachtigal Petr, PhD.**

Oblastní nemocnice Náchod a.s. – Oddělení klinické
biochemie a diagnostiky

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce MUDr. Josefu Hornychovi za odborné vedení, cenné připomínky, motivaci k vědecké práci a především trpělivost. Dále pak PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. jakožto mému garantovi za Farmaceutickou fakultu (katedra biologických a lékařských věd). Zvláštní dík patří zaměstnancům Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Oblastní nemocnice Náchod a.s. a mé rodině.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato 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 a v práci řádně citovány.

Gallová Martina

| | |
|---|----|
| OBSAH: | 1 |
| 1.ÚVOD | 3 |
| 2.CÍL PRÁCE | 4 |
| 3.SOUHRN | 5 |
| 4.SUMMARY | 7 |
| 5.TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 5.1 Prostata..... | 9 |
| 5.1.1 Funkce | 10 |
| 5.1.2 Stavba..... | 10 |
| 5.1.3 Onemocnění | 11 |
| 5.1.3.1 Zánětlivá onemocnění prostaty..... | 11 |
| 5.1.3.2 Benigní hyperplazie prostaty (BHP)..... | 12 |
| 5.1.3.3 Nádorové léze..... | 12 |
| 5.2 Etiologie karcinomu prostaty | 13 |
| 5.2.1 Hormonální vlivy | 13 |
| 5.2.2 Genetické vlivy..... | 13 |
| 5.2.2.1 Genetické změny | 14 |
| 5.2.2.2 Epigenetické změny..... | 14 |
| 5.2.3 Dietetické vlivy | 15 |
| 5.2.4 Profesionální vlivy | 15 |
| 5.2.5 Sexuální aktivita..... | 15 |
| 5.3 Histologie | 16 |
| 5.3.1 Varianty prostatického adenokarcinomu | 18 |
| 5.3.2 Prognostické faktory prostatického adenokarcinomu:..... | 19 |
| 5.3.3 Staging a grading ADK | 20 |
| 5.3.4 Epidemiologie | 22 |
| 5.4 Fyzikální diagnostika a další diagnostické metody..... | 25 |
| 5.4.1 Fyzikální diagnostika..... | 25 |
| 5.4.2 Další diagnostické metody | 25 |
| 5.5 Laboratorní diagnostika..... | 25 |
| 5.5.1 Co je to vlastně PSA? | 25 |
| 5.5.2 K čemu slouží PSA? | 26 |
| 5.5.3 Je PSA vhodné ke screeningu CaP? | 28 |
| 5.5.4 Jaké hodnoty PSA jsou suspektní pro CaP? | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.5.5 | Kinetika PSA a karcinom prostaty | 31 |
| 5.5.6 | Stanovení Free PSA / celkové PSA (fPSA/PSA) | 32 |
| 5.5.7 | Přínos PSA pro diagnostikování CaP | 34 |
| 5.5.8 | Jak tedy postupovat v diagnostice karcinomu prostaty ? | 35 |
| 5.6..... | Nejnovější poznatky v laboratorní diagnostice CaP – molekulární podstata | 35 |
| 5.6.1 | Trankripční faktory ERG nebo ETV1..... | 36 |
| 5.6.2 | Lokální DNA hypermetylace nebo hypometylace. | 37 |
| 5.6.3 | Modifikace histonů | 38 |
| 5.6.4 | HPC1 a dědičná forma CaP..... | 39 |
| 5.7..... | Nejnovější poznatky v laboratorní diagnostice CaP – biochemické markery sledované při CaP..... | 40 |
| 5.7.1 | Metody založené na vazebných schopnostech PSA | 40 |
| 5.7.2 | Kallikreiny | 41 |
| 5.7.2.1 | Kallikrein hK2..... | 42 |
| 5.7.2.2 | Kallikrein hK11, hK3, hK5, hK11..... | 42 |
| 5.7.3 | Prostata specifický membránový antigen (PSMA) | 42 |
| 5.7.4 | Telomerázová reverzní transkriptáza (TERT) | 43 |
| 5.7.5 | Prostatický antigen kmenových buněk (PSCA)..... | 43 |
| 5.7.6 | Chromogranin A (GRN-A)..... | 44 |
| 5.7.7 | Sledování markerů CaP v moči | 44 |
| 5.7.7.1 | Slibný marker – DD3 (differential display code 3) a studie v ČR | 45 |
| 5.7.8 | Cirkulující nádorové buňky..... | 46 |
| 5.7.9 | Růstové faktory | 47 |
| 6. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 48 |
| 6.1 | Cíl experimentu | 48 |
| 6.2 | Vlastní provedení | 48 |
| 6.3 | Výsledky experimentu | 50 |
| 6.4 | Diskuse | 55 |
| 6.5 | Závěr z vlastního měření..... | 57 |
| 7. | ZÁVĚR | 58 |
| 8. | SEZNAM ZKRATEK | 59 |
| 9. | SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK | 60 |
| 10. | LITERATURA..... | 61 |

1 ÚVOD

Karcinom prostaty je nejčastějším maligním nádorem urogenitálního systému a tvoří asi 15% všech maligních nádorů u mužů nad 50 let. V laboratorní diagnostice má zatím nezastupitelnou roli vyšetření prostatického specifického antigenu (PSA) a volného prostatického specifického antigenu (fPSA) a parametrů z nich odvozených. V posledních letech se však vedou velké diskuze o jejich využití v screeningu karcinomu prostaty.

PSA je tkáňově specifický, ale jeho hodnotu koncentrace zvyšují některá jiná onemocnění prostaty.

Velice důležitá je také standardizace analytických a klinických postupů. Vliv typu biologického materiálu (sérum – plazma) na vyšetření PSA a fPSA je tématem experimentální části této bakalářské práce.

Aplikace mikroanalytických technologií DNA a proteomiky otevírá možnosti rozlišit pomalu rostoucí a agresivní nádory pomocí molekulárních „otisků“.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je podat, pokud možno, ucelenou informaci o karcinomu prostaty - od histologie, epidemiologie, etiologie až po laboratorní vyšetření PSA, fPSA a výpočty z nich odvozené. Chceme upozornit na některá úskalí v interpretaci výsledků PSA, zejména:

- závislost hladiny PSA na věku pacienta
- poměr fPSA/PSA
- stanovení cut off hodnoty, která nastaví poměr mezi specificitou a senzitivitou

Uvedeme také některé nové poznatky z oblasti molekulárního výzkumu karcinomu prostaty a biochemické markery související s touto problematikou.

V experimentální části se zaměříme na vyšetření koncentrace PSA a fPSA v krvi srážlivé (sérum) i v krvi nesrážlivé (plazma) a porovnání rozdílů. Oba druhy krve přicházejí do laboratoře ke zpracování.

3 SOUHRN

Karcinom prostaty patří mezi nejčastěji se vyskytující zhoubné nádory v urologii a z epidemiologického hlediska patří dokonce na samý vrchol co do četnosti výskytu.

Tato práce podává ucelenou informaci o prostatě, její stavbě, funkci a je zaměřena zejména na patologii – karcinom prostaty (CaP) a jeho laboratorní diagnostiku.

Prostatický specifický antigen (PSA) a jeho odvozené parametry (PSA velocita - PSA-V - růst koncentrace PSA/rok, PSA doubling time - PSA-DT - doba ke zdvojnásobení koncentrace, věkově specifický PSA, index volný PSA/PSA) mohou významně přispívat k diferenciální diagnostice CaP.

Užití krevního testu PSA k záchytu karcinomu prostaty se musí hodnotit s rozvahou. Jedno vyšetření PSA, pokud je jeho hodnota nižší než 4,0ng/ml, tento karcinom nevylučuje. Je vhodné využívat poměru fPSA/PSA, PSA-V, eventuálně PSA DT. Vyšetření by se mělo nejméně jednou za rok opakovat, a pokud dojde k jeho zvýšení o 0,5 ng/ml/rok, je indikována biopsie prostaty.¹

Měření volné frakce (fPSA) je vhodné k odlišení mezi CaP a benigní hyperplazií prostaty (BPH) při nízkých a středně zvýšených hodnotách PSA (obvykle 2,5 – 10,0 ng/ml). Poměr mezi f/t PSA menší než 20 % je jasnou indikací k biopsii prostaty, neboť představuje výrazně vyšší riziko karcinomu prostaty.

Rozdíly hladin PSA i fPSA v krvi srážlivé (sérum) a nesrážlivé (plazma) jsou uvedeny v experimentální části této práce.

Nemalá část je věnována nejnovějším poznatkům v laboratorní diagnostice CaP. Aplikace mikroanalytických technologií DNA a proteomiky otevírá možnosti rozlišit pomalu rostoucí a agresivní nádory pomocí molekulárních „otisků“. S využitím nové molekulárně biologické metody byl objeven onkogen, který se vyskytuje u většiny CaP, a objasněn je i mechanismus jeho vzniku translokací promotorové oblasti TMPRSS2 genu do lokusu rodiny transkripčních faktorů ETS. Aktivátor transkripce STAT5 byl identifikován jako důležitý faktor pro přežití buněk CaP. Značný pokrok byl také učiněn ve vysvětlení úlohy epigenetických faktorů pro genezi CaP. Zatím

nevýrazné výsledky přineslo hledání lokusů zodpovědných za dědičnou formu tohoto onemocnění.

Byla uvedena téměř stovka markerů, které by mohly být použitelné pro diagnostiku CaP. Pro tuto práci jsou vybrány některé z nich (kallikrein hK2, kallikrein hK11, prostatický antigen kmenových buněk, prostatický specifický membránový antigen, telomerázová reverzní transkriptáza, chromogranin A). Sledování markerů CaP v moči se rovněž věnuje značné úsilí a bylo testováno více než 20 různých markerů, ale rozsah studií je dosud malý. Zvyšuje se význam technik umožňujících detekci a charakterizaci cirkulujících nádorových buněk.

4 SUMMARY

Prostate carcinoma belongs to most frequently occurred and from an epidemiological point of view it even should be placed to the very top place because of its occurrence frequency.

This dissertation gives coherent information on prostate - about its structure, function - and it is mainly aimed at pathology, at prostate carcinoma and its laboratorial diagnosis.

Prostate specific antigen (PSA) and its derived parameters (PSA velocity – PSA – V, PSA concentration growth per year, PSA doubling time – PSA – DT – a time for doubling the concentration, PSA specific for a given age, free index PSA/fPSA) may contribute significantly to CaP diagnosis differentiation.

Using the PSA blood test for intercepting prostate carcinoma must be analyzed with composure. One PSA examination, whether its level is lower than 4,0ng/ml, doesn't exclude this carcinoma. It is appropriate to use proportion fPSA / PSA, PSA - V, eventually PSA DT. The examination should be repeated at least once a year, and if its values will increase for 0,5 ng/ml/yr, a prostate biopsy is being indicated.

A free fraction (fPSA) measuring is necessary for differentiation between CaP and benign prostate hyperplasia (BPH) at low and middle increased PSA values (usually 2,5 – 10,00 ng/ml). The proportion between f/t PSA being lower than 20 % is a clear indication of prostate biopsy, because it poses a hugely higher risk of prostate carcinoma.

Both PSA and fPSA level remainders, coaguable in blood (serum) and incoaguable (plasma), are mentioned in the experimental part of the dissertation.

A considerable part is given to the newest knowledge in CaP laboratory diagnosis. By DNA micro - analytical and by proteomics there is being opened an opportunity to differentiate slowly growing and aggressive tumors by using the molecular "prints". The oncogen, which occurs at the majority of CaPs has been developed, by using a new molecular – biological method. Even the mechanisms of its incipency by a translocation of promoter area TMPRSS2 of gene into locus family of the ETS transcript factors are explained. Activator of

STAT5 transcription has been identified as an important factor for CaP cells survival. A considerable process has also been made in explanation of what task does the epigenetic factor have for CaP genesis. Searching for locuses responsible for transmissive form of this illness hasn't so far brought noticeable results.

Almost a hundred markers that should be used for CaP diagnosis has been mentioned. For this dissertation are chosen some of them (kallikrein hK2, kallikrein hK11, stem cells prostate antigen, specific prostate membrane antigen, telomerase reverse transcriptase, chromogranin A). A considerable effort is also given to observing CaP markers in urine. More than 20 markers have so far been tested, but the extant of these studies is not large. The importance of techniques enabling detection and characterization of the circulating tumoral cells is growing.

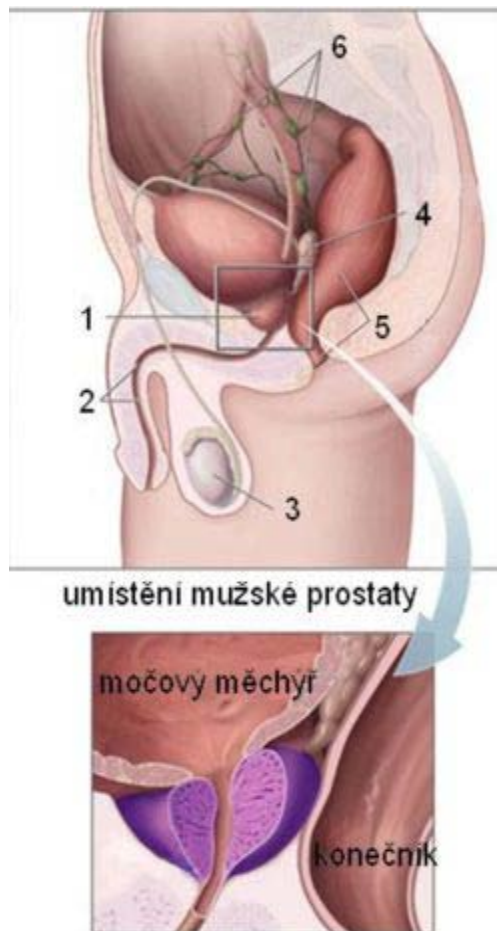
5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Prostata

Prostata (předstojná žláza) je přídatná pohlavní žláza, jejíž sekret je součástí ejakulátu a zvyšuje životaschopnost spermií. Prostata zdravého muže je velká asi jako vlašský ořech, je umístěna pod močovým měchýřem (obr. 1) jako prstenec obkružuje močovou trubici. Je vklíněná do prostoru mezi stydkou kostí a konečníkem – faktu, že se dotýká stěny konečníku a je tak poměrně snadno dostupná, se využívá při rektálním vyšetření prostaty.

Obrázek č.1: Nákres prostaty

- 1.- prostata
- 2.- močová trubice
- 3.- varle
- 4.- semenný váček
- 5.- konečník
- 6.- mízní uzliny



5.1.1 Funkce

Základní funkcí prostatických žlázek. je vylučovat sekret, který se při ejakulaci mísí se spermiemi a tvoří 10-30% ejakulátu. Sekret sám o sobě je bezbarvá nebo slabě opaleskující tekutina, se slabě kyselou reakcí (pH 6,4). Má typický zápach. Obsahuje bílkoviny (u člověka méně než 1% objemu), hlavně imunoglobuliny, kyselou fosfatázu, proteázy a prostatický specifický antigen (PSA), dále nacházíme polyaminy spermin a spermidin, prostaglandiny, kyselinu citrónovou a zinek.

Každá z těchto složek nějakým způsobem umožňuje nebo zvyšuje šanci na oplodnění. Proteázy a prostatický specifický antigen udržují sperma dostatečně řídké, spermin a spermidin zvyšují pohyblivost spermií, prostaglandiny stimulují svalovinu dělohy, kyselina citrónová ve formě citrátů slouží jako pufr.

Zinek ovlivňuje metabolismus testosteronu v předstojné žláze. Jako všechny přídatné pohlavní žlázy, i prostata potřebuje ke svému růstu a správné funkci vliv androgenů, tedy mužských pohlavních hormonů, z nich hlavně testosteronu. Bez nich produkce sekretu ustává a žláza časem involuje.

5.1.2 Stavba

Prostata je svalově-žláznatý orgán (obr.1,2), tvořený 30-50 tuboalveolárními žlázkami, obklopenými hladkou svalovinou a vazivovým stromatem. Vývody žlázek ústí kolem semenného hrbolku do močové trubice. Na povrchu je krytá vazivovou kapsulou, která je opředená sítí cév a nervů.

U lidí se, z anatomického hlediska, prostata skládá z pěti laloků: pravého, levého, předního, zadního a středního. V průběhu života srůstají a v dospělosti již zcela splynou. V urologické praxi se proto používá rozdělení prostaty podle McNeala na tři zóny:

Periferní zóna:

Zahrnuje tu část prostaty, která obklopuje distální část močové trubice, epitel žlázek pochází z urogenitálního sinu. Periferní zóna je největší, tvoří asi 65% předstojné žlázy. V periferní zóně také vzniká největší procento karcinomů prostaty, až 70%.

Centrální (vnitřní) zóna:

Je část prostaty, která se nachází kolem ejakulačních vývodů. Epitel jejích žlázek pochází z urogenitálního sinu i z Wolffova vývodu. Tvoří 25% objemu prostaty a vzniká v ní asi čtvrtina všech karcinomů prostaty.

Tranzitorní (přechodná) zóna:

Je nejmenší část, která tvoří jen 5% předstojné žlázy. Obklopuje proximální část močové trubice. Ve vyšším věku může být místem vzniku benigní hyperplazie prostaty. U starších mužů (i samců dalších savců) se někdy uvnitř vývodů hromadí kalcifikovaný materiál (corpora amylacea). Může ucpávat vývody a stává se také součástí ejakulátu.²

5.1.3 Onemocnění

- Zánět prostaty (prostatitis)
- Benigní hyperplazie prostaty (BHP)
- Nádorové léze

5.1.3.1 Zánětlivá onemocnění prostaty

Je možné rozdělit na:

- akutní infekční prostatitis
- chronická infekční prostatitis

- chronická neinfekční prostatitis, která je zahrnuta pod pojmem Chronic Pelvic Pain Syndrome. Ta se dále dělí:

- a) zánětlivá neinfekční prostatitis (jsou-li přítomny bílé krvinky v prostatickém sekretu nebo v moči)
- b) nezápětlivá neinfekční prostatitis (nejsou-li přítomny bílé krvinky v prostatickém sekretu nebo v moči)

Z tohoto poměrně složitěho výčtu různých druhů zánětu prostaty si lze dobře představit, jak pestré mohou být projevy takového onemocnění.

5.1.3.2 Benigní hyperplazie prostaty (BHP)

BHP je nezhoubné zbytnění tkáně, které začíná v přechodové zóně prostaty. Tato zóna těsně obkružuje uretru a při jejím zbytnění na ni tlačí, narušuje výtok moči z močového měchýře a je příčinou obtěžujících příznaků.

Benigní prostatická hyperplazie postihuje většinu mužů, pokud mají normální endokrinní funkci varlat a žijí dostatečně dlouho. Její riziko začíná od 40. roku života, v 5. decenniu ji lze očekávat u 20 % mužů, v 6. decenniu u 60 % a v 7. decenniu u 70 % mužů, pouze asi 25 % z nich však potřebuje léčbu. Do začátku devadesátých let bylo jedinou léčebnou alternativou pouhé sledování nebo operační léčba.³

5.1.3.3 Nádorové léze

Dělení:

- Prostatická intraepiteliální neoplázie
(intraduktální dysplázie, velkoacinarní atypická hyperplázie, atypická

primární hyperplázie, hyperplázie s maligními změnami, dukto-acinární dysplázie)

- **Adenokarcinom prostaty (AKP) – nejčastěji se vyskytující**
- Další epitelové nádory
- Smíšené nádory prostaty
- Další primární nádory prostaty, metastázy do prostaty

5.2 Etiologie karcinomu prostaty

Při vzniku onemocnění se podílí řada faktorů:

5.2.1 Hormonální vlivy

Působení dihydroandrosteronu, který stimuluje produkci růstových faktorů s parakrinními a autokrinními vlivy.

5.2.2 Genetické vlivy

Rodinná (familiální) forma CaP představuje podle některých zdrojů asi 10 – 20 % a dědičná forma jen asi 5 – 10 % všech případů karcinomu prostaty v populaci.⁴ Část rodinných výskytů CaP lze totiž vysvětlit rodinnými návyky, stravou, kouřením a vlivem prostředí. Familiální výskyt CaP lze také jen obtížně odlišit od sporadického, vyvolaného citlivými geny. Riziko onemocnění způsobeného náchylnými geny je podstatně vyšší v kombinaci s účinkem potravy a životního prostředí.

Dědičná forma CaP je pravděpodobně způsobena vzácnými alelami genů, které jsou v současnosti předmětem intenzivního genetického mapování.

Přenos vlastností charakteristických pro nádorovou buňku na další generace buněk rostoucího nádoru je podle našich současných znalostí možný pouze dvěma způsoby: **geneticky nebo epigeneticky**.

5.2.2.1 Genetické změny

V případě genetické změny můžeme předpokládat dva možné případy. **Změna zděděná po rodičích, která se vyskytuje ve všech buňkách jedince** (např. polymorfismus spojený se zvýšeným rizikem CaP), **nebo genetická změna, která nastala pouze v jedné buňce postiženého orgánu** (somatická genetická změna), vede ke vzniku nádoru nebo prenádorových buněk. **V reálné situaci dochází patrně ke kombinaci všech těchto způsobů** přenosu informace, protože genetických a epigenetických změn nutných pro vznik nádorového fenotypu je vždy celá řada a vzájemně se podmiňují a doplňují.

Pravděpodobně **nejdůležitější somatickou změnou vedoucí ke vzniku nádorové buňky je vznik onkogenu z protoonkogenu**. Protoonkogeny jsou normální součástí buněčných regulačních kaskád a signál k proliferaci buňky dávají pouze v citlivé závislosti na podněty přicházející z okolí buňky. Jejich mutace však může vést k tomu, že začnou dávat silný, nekontrolovatelný signál vedoucí k proliferaci buňky. Pokud v důsledku dalších mutací selžou i ostatní kontrolní mechanismy (apoptóza, antionkogeny aj.), začne buňka nekontrolovaně proliferovat.

5.2.2.2 Epigenetické změny

Epigenetické změny jsou definovány jako **děditelné změny genové exprese při nezměněné DNA sekvenci**.

Většina genů, které buňka obsahuje, je v dané chvíli nepoužívaná a je organizována ve vysoce kondenzované formě. Skupiny nepoužívaných genů jsou zkrouceny do superšroubovice a navinuty na histony. V přesně určených místech jsou pak upevněny na lešení buněčného jádra. Pokud má být nějaký dosud nepoužívaný gen aktivovaný, musí dojít ke změnám uspořádání, které

vedou k rozvolnění dané kličky DNA a tím k uvolnění přístupu molekulám, které regulují a provádějí transkripci. Tyto změny zahrnují mimo jiné změny metylace DNA a také různé modifikace histonů. Oba tyto epigenetické mechanismy často kooperují a mění šablonu genové exprese. Po případném rozdělení buňky je pak daný vzor sdílen oběma dceřinými buňkami, a představuje tak formu děděné informace, která není přímo zahrnuta v primárním kódu DNA.

Mechanismus, vedoucí k epigenetickým změnám v nádorové buňce, není doposud plně objasněn, a není jasné ani to, jestli jsou epigenetické změny následkem nebo příčinou kancerogeneze. Evidentně však hrají v procesu kancerogeneze důležitou roli.

5.2.3 Dietetické vlivy

Dietetické zvyklosti mají pravděpodobně velký podíl na vzniku CaP. Jsou velké mezinárodní rozdíly v incidenci CaP, nezávislé na dědičných předpokladech. Incidence u národností se mění po přestěhování!

Růst incidence dobře koreluje s adaptací na potravní zvyklosti nové země:

- v Číně je velmi nízká incidence (1,3 na 100 000)
- u Číňanů v Honkongu 5x vyšší
- u Číňanů v USA 16x vyšší⁵

5.2.4 Profesionální vlivy

Radioaktivní záření, herbicidy a pesticidy a některé těžké kovy. Jejich karcinogenita nebyla jednoznačně prokázána, zřejmě hraje významnou roli délka a intenzita expozice.

5.2.5 Sexuální aktivita

Klesá věk mužů zahajujících pohlavní život, zvětšilo se spektrum pohlavních chorob, stoupla promiskuita.

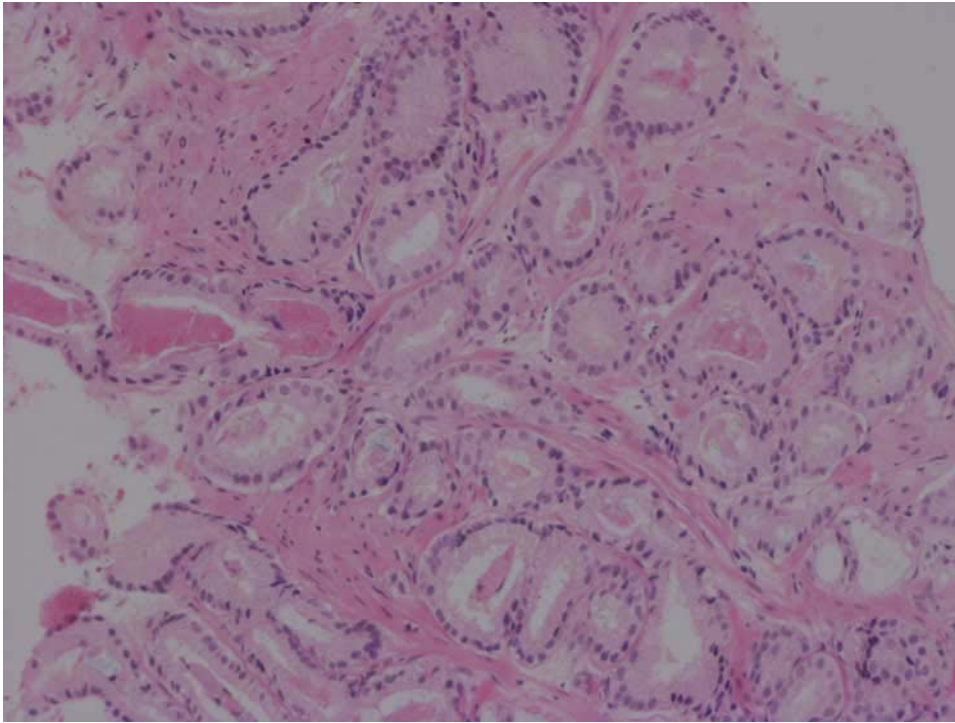
5.3 Histologie

Histologický vzhled AKP se liší podle gradů. Obecně platí, že AKP je tvořen malými nahloučenými žlázkami, které jsou relativně uniformní. Vždy je nutné věnovat pozornost žlázkám, které se výrazně liší od svého okolí. Někdy vytváří glomeruloidní struktury. Dále je nutné zaměřit se na invazi suspektních žlázek. Podezřelé jsou žlásky infiltrující mezi jednoznačně benigní žlásky, dále glandulární struktury tvořící pruhy, splývající ve větší celky či naopak jednotlivé buňky mezi normální prostatickou tkání. Vždy je vysoce suspektní, nepodaří-li se prokázat basální vrstvu buněk. Ovšem je nutné si uvědomit, že u řady dalších afekcí je bazální vrstva nesouvislá.

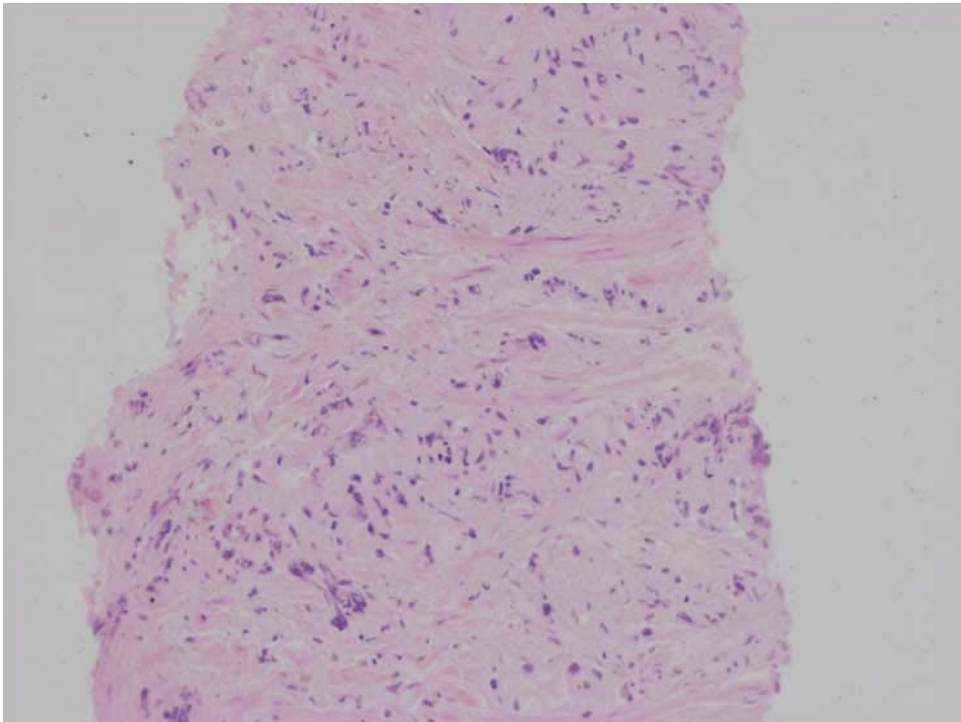
Z cytologických charakteristik je nutné věnovat pozornost buňkám s jadernou polymorfií, nápadnými jádérky a mitózami. Dále pro diagnózu karcinomu hovoří nález buněk s výrazně odlišnou cytoplazmou, než v okolních benigních žlázkách, dále buněk s amfofilní a vodojasnou cytoplazmou. V lumen žlázek AKP se nachází modravý hlen, jemně vločkovitý růžový materiál, krystaloidy či nekrotická hmota.

Zcela bez diskuse AKP patří v našich zeměpisných šířkách k velmi častým onemocněním. AKP je velmi vzácný ve věku do 40 let, poté jeho incidence zvolna vzrůstá. V současné době probíhají diskuse o možném zavedení screeningu AKP. **Je poměrně velký rozpor mezi nálezy tzv. latentních AKP při pitvách a výskytem nádorů s klinickou symptomatologií. Prevalence v pitevním materiálu dosahuje až 80% u mužů v 9. dekádě.**

Obrázek č.2: Dobře diferencovaný adenokarcinom prostaty



Obrázek č.3: Špatně diferencovaný adenokarcinom prostaty



5.3.1 Varianty prostatického adenokarcinomu

Prostatický duktální adenokarcinom (*papilární karcinom, endometroidní karcinom, adenokarcinom s endometroidními rysy*):

Tvoří cca 0,2-0,8% adenokarcinomů prostaty. Častěji se nachází u starších mužů (průměrný věk 65 let), příznakem bývá hematurie a močová obstrukce či nucení na močení, jen vzácně akutní retence moči. U pacientů **bývají normální hladiny PSA**, pouze u případů s kostními metastázami bývá hladina PSA .

Mucinózní adenokarcinom

Mucin lze prokázat ve velkém počtu případů AKP

Adenokarcinom z prstenčitých buněk

Jde o velmi vzácný tumor

Sarkomatoidní (metaplastický) karcinom (karcinosarkom)

Sarkomatoidní karcinom se vyskytuje u starších mužů pod příznakem urinární obstrukce (maximum případů ve věkovém rozmezí 67-71 let). **V době diagnózy může být hladina PSA v séru normální!**

Prognóza je velmi špatná

Adenokarcinom s neuroendokrinními buňkami (adenocarcinoma with Paneth-like cells)

Basocelulární adenokarcinom (*adenoidně basocelulární tumor, adenoid cyst-like tumor, adenoidně cystický karcinom*)

Klinické příznaky nevybočují z běžného rámce AKP. Vyskytuje se u pacientů v poměrně širokém věkovém rozpětí (28-72 let, průměr 50 let). Obvykle, oproti klasickému AKP, **nebývají zvýšené hladiny sérového PSA**.

Adenokarcinom s onkocytárními rysy

Karcinom podobný lymfoepiteliomu (lymfoepiteliom, lymphoepithelioma-like carcinoma, medulární karcinom)

Kribriformní adenokarcinom

Komedokarcinom

Jde o špatně diferencovanou variantu acinárního AKP

Dlaždicobuněčný a adenosquamózní karcinom

V prostatě jde o velmi vzácné nádory, které tvoří méně než 0,5% maligních nádorů prostaty.

Biologické chování tumorů, zejména dlaždicobuněčného, je agresivní.

5.3.2 Prognostické faktory prostatického adenokarcinomu:

Prognostické faktory prostatického adenokarcinomu lze rozdělit do 3 hlavních skupin (podle Bostwicka a kol., 2000).

Kategorie zahrnuje faktory, které jsou dobře dokumentovány a často používány:

- Sérová hladina **PSA**
- **Gleason** grade
- Patologický **staging**
- Chirurgické okraje

Kategorie zahrnuje faktory, jejichž přínos je prozatím slibný, ovšem neověřený na velké sérii pozorování:

- DNA ploidy
- Objem nádorové hmoty v radikální prostatektomii
- Objem karcinomu v jehlové punkční biopsii
- Histologický podtyp

Kategorie zahrnuje faktory, jejichž význam je prozatím nejasný:

- Perineurální propagace
- Mikrometastázy v lymfatických uzlinách
- “Kulovitý“ tvar jader
- Chromatinový vzor
- Mitotické figury
- MIB-1
- PCNA
- Apoptotický index
- Frakce PSA
- Androgenní receptory
- Neuroendokrinní diferenciacce
- Human glandular kallikrein 2
- Prostatický specifický membránový antigen
- Densita mikrovaskulatury
- Integriny
- TGF-beta

5.3.3 Staging a grading ADK

Staging ADK 1997:

| Primární tumor - klinická klasifikace (T) | |
|---|---|
| TX | primární tumor nemůže být posouzen |
| T0 | primární tumor není detekován |
| T1 | klinicky nedetekovatelný tumor (nepalpovatelný a nezobrazitelný žádnou metodou) |
| T1a | tumor je nalezen náhodně histologicky a tvoří méně než 5% tkáně |
| T1b | tumor je nalezen náhodně histologicky a tvoří více než 5% tkáně |
| T1c | Tumor byl nalezen v punkční biopsii |
| T2 | tumor přítomen pouze v prostatě |
| T2a | tumor infiltruje jeden lalok |
| T2b | tumor infiltruje oba laloky |
| T3 | tumor přerůstá pouzdro prostaty |
| T3a | tumor přerůstá přes pouzdro |
| T3b | tumor roste do semenných váčků |
| T4 | Tumor je fixován či infiltruje další okolní struktury (kromě semenných váčků): krček močového měchýře, externí sfinkter, rectum, mm. levatores, a/nebo stěnu pánevní. |
| Primární tumor - patologická klasifikace (pT) | |
| pT2 | tumor omezen na prostatu |
| pT2a | infiltrace 1 laloku |
| pT2b | infiltrace obou laloků |
| pT3 | extenze mimo prostatu |
| pT3a | tumor roste přes pouzdro prostaty |
| pT3b | invaze do semenných váčků |
| pT4 | invaze do močového měchýře a rekta |

| Regionální lymfatické uzliny (A) | |
|----------------------------------|---|
| NX | regionální lymfatické uzliny nemohou být posouzeny |
| N0 | bez metastáz v regionálních uzlinách |
| N1 | metastáza či metastázy v regionálních lymfatických uzlinách |
| Vzdálené metastázy (M) | |
| MX | vzdálené metastázy nemohou být posouzeny |
| M0 | bez vzdálených metastáz |
| M1 | vzdálené metastázy |
| | M1a lymfatická uzlina (kromě regionálních) |
| | M1b kost |
| | M1c jiné lokalizace |

Grading:

| | |
|----|---|
| G1 | dobře diferencovaný tumor, Gleason skóre 2-4 |
| G2 | středně diferencovaný tumor, Gleason skóre 5-6 |
| G3 | středně až špatně diferencovaný tumor, Gleason skóre 7 |
| G4 | špatně diferencovaný tumor, Gleason skóre 8-10 ⁶ |

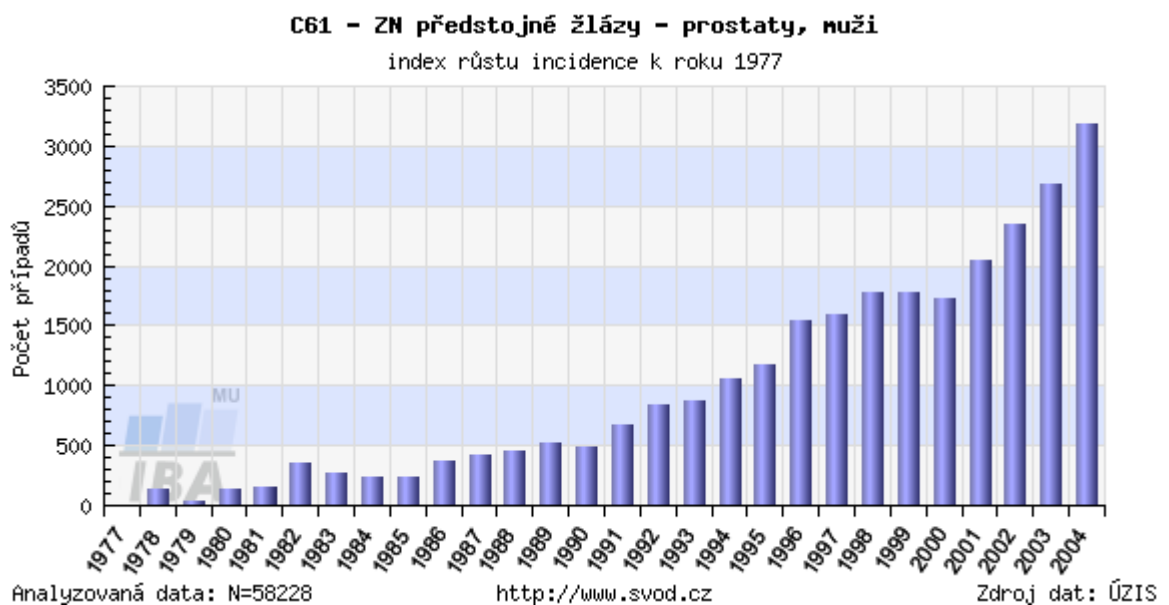
5.3.4 Epidemiologie

Karcinom prostaty patří mezi nejčastěji se vyskytující zhoubné nádory v urologii a z epidemiologického hlediska patří dokonce na samý vrchol co do

četnosti výskytu. V USA představuje druhou nejčastější příčinu úmrtí mužů na zhoubný nádor.⁷

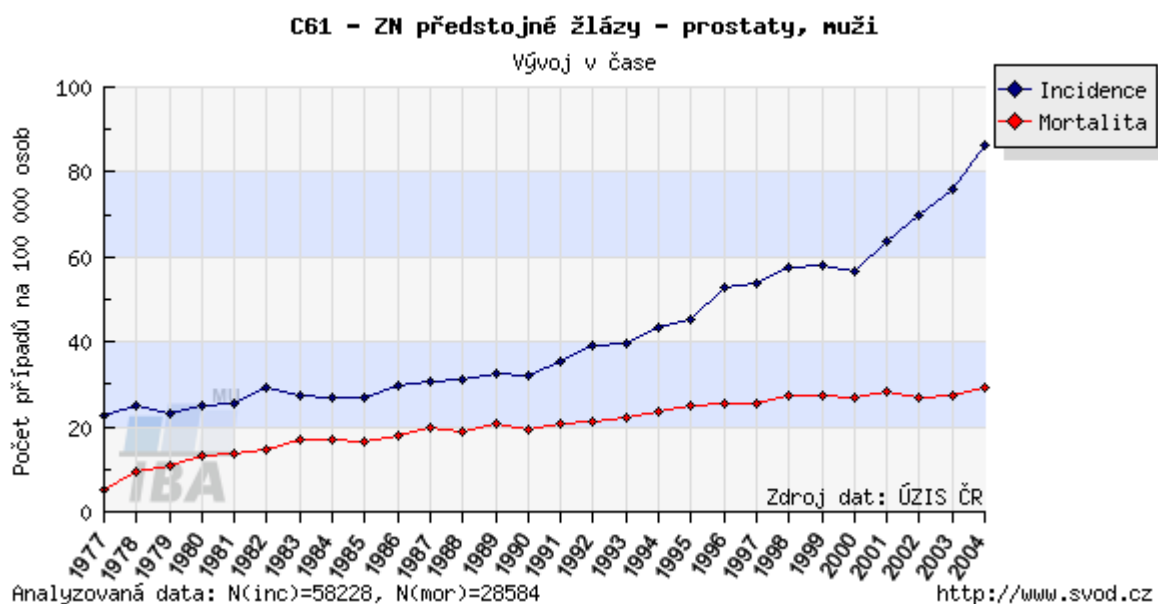
V České republice také stoupá incidence tohoto onemocnění (graf č.1) :

Graf č.1: Incidence karcinomu prostaty v ČR – od roku 1977 do 2004



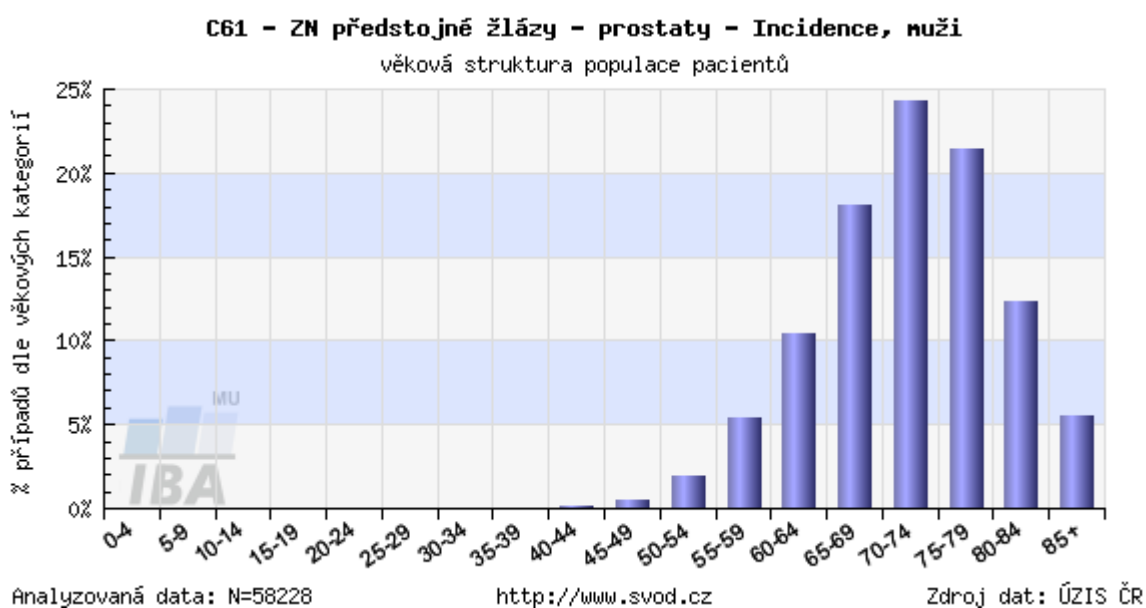
Přestože dochází k růstu incidence, mortalita se výrazněji nemění (graf č.2):

Graf č.2: Incidence a mortalita karcinomu prostaty v ČR – vývoj v čase



Tato skutečnost je dána vysokým věkem nemocných (graf č.3), trpících řadou dalších onemocnění, která je usmrtí dříve než karcinom.

Graf č.3: Incidence karcinomu prostaty v ČR – dle věku



5.4 Fyzikální diagnostika a další diagnostické metody

5.4.1 Fyzikální diagnostika

Vyšetření zaměřené na palpaci per rectum. Vyšetření by měli minimálně 1x ročně podstoupit všichni muži starší 50 let v rámci preventivní onkologické prohlídky. Hodnotí se velikost, symetrie, ohraničení, povrch, palpační citlivost a konzistence prostaty.

5.4.2 Další diagnostické metody

- Ultrazvukové vyšetření
- Rentgenové vyšetření
- Urodynamické vyšetření

5.5 Laboratorní diagnostika

Přestože se v ČR dosud neprovádí standardizovaný screening karcinomu prostaty (CaP), je toto onemocnění druhou nejčastější malignitou u mužů nad 50 let. Jednou z možností vyhledávání časných stadií CaP je vyšetření **PSA** (prostatický specifický antigen). Hodnotu celkového PSA je vhodné hodnotit v kontextu věkově specifického PSA, doplnit využitím poměru PSA volné (free) / PSA celkové (total) = **fPSA/PSA**, PSA velocita = **PSA-V** eventuálně PSA doubling time = **PSA-DT**.

5.5.1 Co je to vlastně PSA?

Antigen prostaty (PSA nebo také tPSA=total PSA), poprvé identifikovaný a popsáný Wabgem a kol. v roce 1979, je glykoproteinový monomer vykazující **proteázovou aktivitu**. Izoelektrický bod PSA je přibližně 6,9 a molekulová

hmotnost přibližně 33–34 kDa a asi 10% hmotnosti představují karbohydráty.

PSA je lokalizován v cytoplazmě duktálního epitelu prostaty a v sekretech duktálního lumina. Protože PSA je sekrečním proteinem, je možné jej odebrat a rafinovat jak z prostatické tkáně, tak ze semenné plazmy. PSA je dále v mléčné, potní, periuretrální, anální žláze a děložní sliznici. Zdroje mimo prostatu produkují málo PSA!⁹

Tabulka č.1: Distribuce PSA v séru:³

| Distribuce PSA v séru | |
|------------------------------------|-----------------------|
| | Zastoupení (%) |
| Vázaný na proteiny | 60 - 95 |
| Alfa-1-antichymotrypsin | 60 – 90 |
| Alfa-2-makroglobulin | 10 -20 |
| Alfa-1-trypsinový inhibitor | 1 – 5 |
| Volný – enzymově inaktivní | 5 - 40 |

5.5.2 K čemu slouží PSA?

Bylo zjištěno, že PSA je především spojen s prostatickou tkání a zvýšená hladina PSA v séru byla indikována u pacientů s rakovinou prostaty, benigní hypertrofií prostaty a při zánětech přilehlých tkání.

Možné role PSA v patogenezi nádoru:

- PSA štěpí IGFBP-3 (insuline-like growth factor binding protein 3) a uvolňuje IGF-1 (insulin-like growth factor), který je růstovým faktorem CaP:

Inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) zprostředkuje působení růstového hormonu (GH) na buňky a tkáně a ve fetálním období a v dětství významně ovlivňuje vývoj organismu. Hromadí se však poznatky, které ukazují i

na jeho možnou souvislost se vznikem nádorů. Byly provedeny studie, při nichž byly cíleně vyšetřeny vzorky krve, v minulosti odebrané lidem, kteří posléze onemocněli karcinomem. Některé pocházely z období až 14 let před objevením nádoru. Byla zjištěna významná souvislost vysoké hladiny IGF-1 se vznikem karcinomu prostaty, premenopauzálního karcinomu prsu a karcinomu kolon.

Zdá se, že IGF-1 se uplatňuje významněji, než většina dosud známých rizikových faktorů.¹⁰

- Štěpení extracelulárních matrixových glykoproteinů (fibronectin, laminin) usnadňuje vznik metastáz
- Aktivace plazminogenového aktivátoru urokinázového typu usnadňuje vznik metastáz
- Proteolytická modulace osteoblastů (podporuje metastázy do kostí)
- Antiangiogenní aktivity – potlačení tvorby kapilár v diferencovaném nádoru

Kombinace měření PSA a ultrasonografického rektálního vyšetření v případě patologického nálezu může představovat lepší metodu zjištění rakoviny prostaty než samotné rektální vyšetření.

Stanovení PSA má při odhalení rakoviny prostaty oproti digitálnímu rektálnímu vyšetření nebo ultrasonografii několik výhod. Výsledek je objektivní, vyjádřený kvantitativně a získaný nezávisle na dovednostech vyšetřujícího. Způsob vyšetření je rovněž pro pacienty přijatelnější než jiné metody.¹¹

Stanovení PSA je užitečné při detekci metastatického nebo přetrvávajícího onemocnění u pacientů po chirurgickém zákroku nebo léčbě rakoviny prostaty.¹² Přetrvávající zvýšená hladina PSA po léčbě, nebo nárůst koncentrace PSA vůči stavu před léčbou, jsou znaky recidivy nebo

residuálního onemocnění. Proto je stanovení PSA obecně akceptováno jako pomůcka při péči o pacienty.¹³

5.5.3 Je PSA vhodné ke screeningu CaP?

Přestože **existuje řada protichůdných názorů na efektivnost aktivního vyhledávání karcinomu prostaty na podkladě zvýšené hodnoty PSA**, data publikovaná v poslední době efektivnost včasné detekce karcinomu prostaty dokazují.¹⁴

Zastánci včasné detekce CaP za využití PSA připomínají, že léčitelný jen pouze lokalizovaný karcinom, kdy onemocnění nepřekročilo hranice prostaty. Tedy včasnou detekcí můžeme snížit i mortalitu onemocnění.

Bylo publikováno několik prací, které nám pomáhají lépe pochopit rozvoj progresu CaP. Johansson publikoval sérii studií, u kterých byl diagnostikován lokalizovaný CaP v Orebro medical center ve Švédsku. Byly sledovány 2 skupiny mužů – muži bez léčby (watchful waiting, WW) a muži s aktivní iniciální léčbou. Zpočátku autoři zjišťovali během 5 až 10 let sledování jen velmi nízkou mortalitu u mužů s lokalizovaným onemocněním bez ohledu na to, zda bylo použito aktivní léčby nebo ne. Avšak po 21 letech sledování se u 40 % pacientů objevila progresse, u 17 % sledovaných byly zjištěny metastázy a u 16 % byl jako příčina úmrtí stanoven karcinom prostaty. Závěry jejich studií tedy předpokládají prospěch z užití PSA screeningu u mužů s lokalizovaným karcinomem prostaty, u kterých je pravděpodobnost 15letého přežití.

Britská a skandinávská škola upozorňuje, že většina karcinomů prostaty je objevena jako náhodný pitevní nález u mužů, kteří před smrtí neměli žádné obtíže. Propagují strategii „watch and wait“, varují před neuváženou agresivní léčbou, která nezajišťuje vyšší délku a kvalitu života. V protikladu s tím zejména Američané zpochybňují tuto vyčkávací taktiku, upozorňují, že aktivní přístup vedl ke 30%nímu vzestupu včas zachycených karcinomů prostaty, počet radikálních prostatektomií stoupl v USA 10x... Je zřejmé, že karcinom prostaty představuje heterogenní jednotku, která má formy indolentní (netečné), na

druhé straně formy vysoce virulentní (nebezpečné). Problém s odlišením spočívá v tom, že karcinom prostaty je v převážné většině klasifikován na základě klasické buněčné morfologie prováděné pomocí běžné světelné mikroskopie, místo metod molekulární patologie - genomové a proteomové analýzy.

Ve screeningu brání nízký stupeň standardizace – hodnoty výsledků PSA vyšetření se liší mezi jednotlivými výrobci až o stovky procent. Situaci nezlepšil ani tzv. stanfordský standard, který měl sjednotit jednotlivé výrobce (matrice bovinní sérum, PBS pufr, PSA ze seminární tekutiny, nikoliv z krve...).

5.5.4 Jaké hodnoty PSA jsou suspektní pro CaP?

Největším problémem při stanovování sérové koncentrace PSA zůstává definovat hranici – **cut-off**, nad kterou se hodnota PSA považuje již za zvýšenou. **Čím níže tuto hranici stanovíme, tím vyšší senzitivity testu dosáhneme, avšak naopak za cenu nízké specificity.** Pokud hranici pro normální hodnotu stanovíme příliš vysoko, pak specifika výrazně vzroste, avšak na úkor senzitivity.

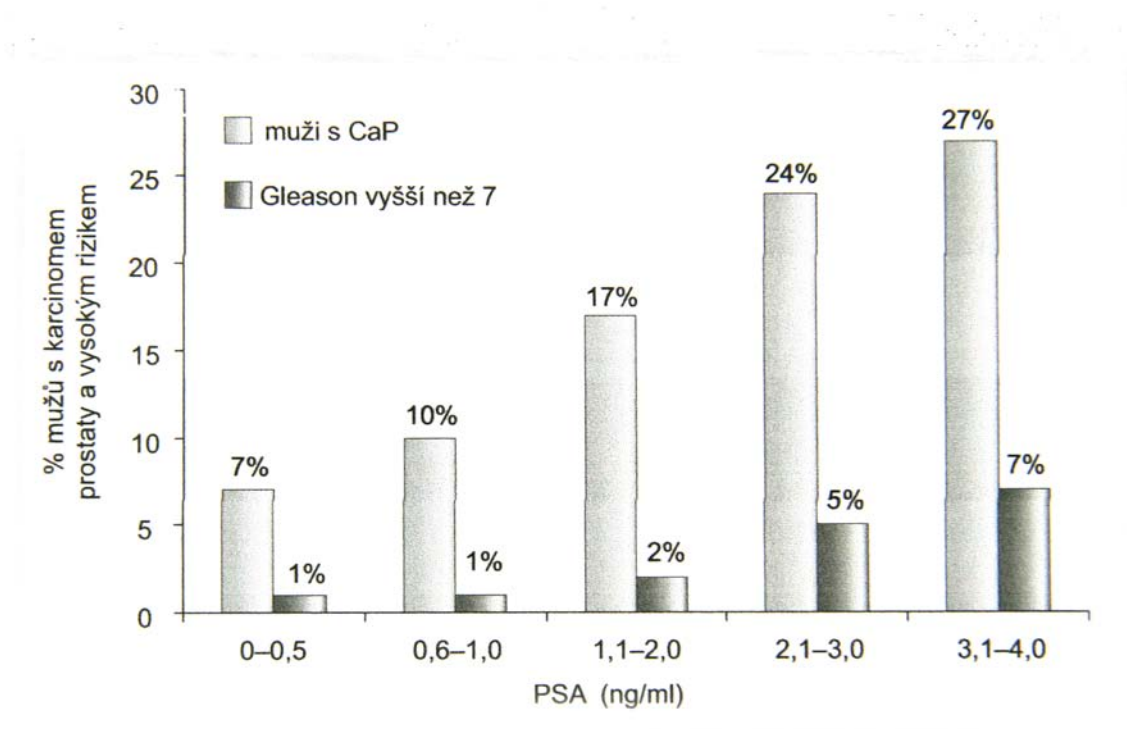
V roce 1991 Catalona doporučil užití PSA jako screeningového testu. Jako suspektní pro CaP byly určeny hodnoty **4,0 ng/ml a vyšší**. Posléze byla tato spodní hodnota upravena na **2,5 ng/ml**. Doporučované hodnoty PSA dle věku ukazuje tabulka č.2.

Tabulka 2: Doporučované hodnoty PSA dle věku u nás

| Věk (let) | Koncentrace PSA v séru (ng/ml) |
|------------------|---------------------------------------|
| 40 - 49 | 0 - 2,5 |
| 50 -59 | 0 - 3,5 |
| 60 - 69 | 0 - 4,5 |
| 70 - 79 | 0 - 6,5 |

Velice zajímavé jsou závěry studie Thomsona v roce 2004 (graf č.4).¹⁵ Na podkladě jeho získaných dat byl **prokázán karcinom prostaty i při velmi nízkých hodnotách PSA** až v 27 %^{16,17}, nelze považovat muže s hladinou PSA < 4 ng/ml nebo i < 2,5 ng/ml za muže s normální hladinou PSA, vylučujícím přítomnost karcinomu prostaty. V této souvislosti bylo prokázáno, že pokud jejich **PSA je vyšší než jejich věkově střední hodnota PSA**, mají **zvýšené riziko karcinomu prostaty**. Čím vyšší PSA tím se zvyšuje pravděpodobnost CaP a **rovněž to může znamenat i vyšší agresivitu karcinomu s dalším nepříznivým průběhem**.¹³

Graf č.4: Prevalence karcinomu prostaty a PSA



Věkově střední hodnoty doporučovány v USA (NCCN – Practice guidelines in oncology v. 2. 2005) jsou uvedeny v tabulce č.3:

Tabulka č.3: věkově střední hodnoty doporučované v USA

| Věková skupina | Medián PSA (ng/ml) |
|----------------|--------------------|
| 40-49 | 0,7 |
| 50-59 | 0,9 |
| >60 | 1,4 |

Hledaly a hledají se proto další způsoby, jak zvýšit senzitivitu a specifiku PSA vyšetření a zpřesnit tak diagnostiku karcinomu prostaty.

5.5.5 Kinetika PSA a karcinom prostaty

Při užití PSA jako markeru pro včasnou detekci karcinomu jsou často kladeny následující otázky:

Lze na základě hodnoty PSA v individuálním případě předpovědět vývoj karcinomu prostaty? Může plazmatická hladina PSA určit dlouhodobé riziko rakoviny prostaty? Komu provést biopsii prostaty? Koho léčit? Lze predikovat úmrtí na CaP před radikální terapií? Odpovědi na tyto otázky nám přináší užití kinetiky PSA v detekci karcinomu prostaty.

PSA velocita (PSA-V) představuje absolutní rychlost změny PSA v čase. Nejčastěji se uvádí v průběhu jednoho roku. Dříve udávaná hodnota PSAV 0,75 ng/ml/rok se stále snižuje. Nicméně tato hodnota PSA predikuje téměř 25% riziko progresu v průběhu 3 let. Carter (2005) prokázal ve své studii s medianem sledování 15,4 let mezi prvním a posledním odběrem PSA, že pokud je hodnota **PSAV >0,16 ng/ml/rok**, má sledovaný muž **8x vyšší riziko úmrtí na karcinom prostaty**.

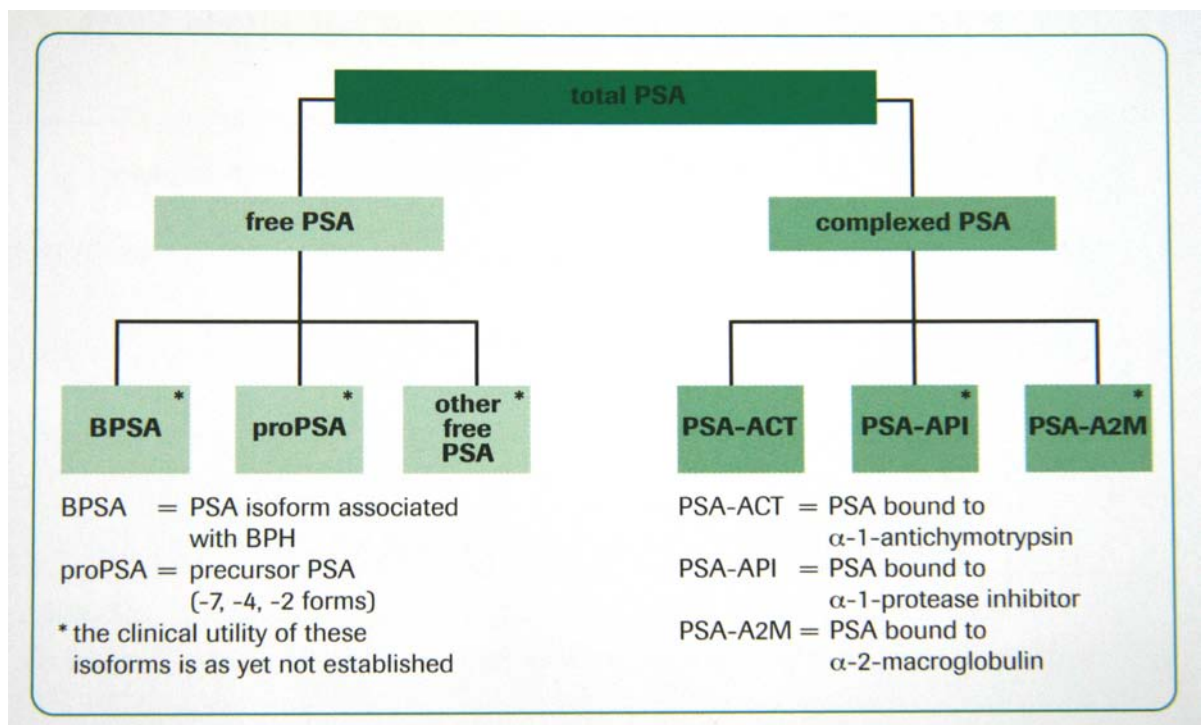
PSA doubling time (PSA-DT) je čas potřebný pro zdvojnásobení hodnoty PSA, může rovněž být využit pro včasnou detekci, ale častěji se používá v monitoraci úspěšnosti léčby.

5.5.6 Stanovení Free PSA / celkové PSA (fPSA/PSA)

Co je fPSA?

Jak ukazuje obrázek č.3 fPSA má několik isoformem:

Obrázek č.4: PSA isoformy¹⁸



Většina PSA přítomného v séru je ve vázané formě na alfa-1-antichymotrypsin. Jen malé množství je ve volné formě. Zjištění, že **PSA existuje v séru v několika různých molekulárních formách**, a že koncentrace a poměr těchto forem se liší u maligních a benigních onemocnění,

reprezentuje další významný pokrok v diagnostice časného karcinomu prostaty a jeho odlišení od benigní hyperplazie prostaty.

Poměr volný/celkový prostatický specifický antigen (f/t PSA) je u pacientů s karcinomem prostaty signifikantně nižší, než u pacientů s benigní hyperplazií prostaty. Určení hraniční hodnoty podílu volného PSA pro klinickou praxi je komplikováno částečnou závislostí podílu volného PSA na věku pacienta, velikosti prostaty a koncentraci celkového PSA. Je nutné také zdůraznit, že hraniční hodnoty volného PSA se liší, pokud jsou kombinovány různé metodiky vyšetření volného a celkového PSA od různých výrobců.

Většina evropských autorů se kloní k nižší referenční hodnotě podílu volného PSA s obvyklým přístupem k jejímu výpočtu při zachování pravidla nutné 90 až 95 % specifiky (senzitivita je však nízká). Avšak američtí autoři tvrdí, že hlavním zájmem lékaře i nemocného v těchto případech je neopomenout indikovat žádnou biopsii prostaty, která by mohla být maligní, tudíž prvotním požadavkem je vysoká, tj. 90 až 95 % senzitivita.

Catalona a Smith prokázali, že stanovení volné frakce (f-PSA) pro hodnoty PSA mezi 2,5 – 10 ng/ml sníží procento biopsií prostaty o 38%, přičemž je stále zachyceno 90% všech karcinomů prostaty. Jako rozhodující hranici považovali 20% volného PSA.^{19,20}

V následující prospektivní multicentrické studii pak Catalona a kol. doporučují hraniční hodnotu 25% volného PSA pro pacienty s koncentrací PSA mezi 4,0 – 10,0 ng/ml a benigním palpačním nálezem na prostatě, bez ohledu na věk pacienta a velikost prostaty. Hraniční hodnota 25% volného PSA zachytila 95% případů s karcinomem prostaty a zamezila provedení 20% zbytečných biopsií.²¹ Stanovení f/t PSA má svůj význam i u pacientů s hodnotou sérové koncentrace PSA 2,5 – 4,0 ng/ml a negativním vyšetřením per rektum.²²

Věk, prostatický objem a sérová koncentrace PSA jsou důležitými faktory, které je nutno vzít v úvahu při volbě hraniční hodnoty poměru f/t PSA. Oesterling a kol. uvádějí, že sérové koncentrace všech tří molekulárních forem PSA (volný, vázaný a celkový PSA) jsou závislé na věku pacienta.²³ Stanovení poměru f/t PSA zvyšuje specifiku PSA vyšetření pro detekci karcinomu prostaty a zároveň umožňuje eliminovat řadu zbytečných biopsií prostaty s negativním vyšetřením per rektum a hodnotami PSA 4,0 – 10,0 ng/ml.

Poměr mezi f/t PSA menší než 20 % je jasnou indikací k biopsii prostaty, neboť představuje výrazně vyšší riziko karcinomu prostaty. Rovněž rychlejší snížení poměru f/t PSA předurčuje vyšší pravděpodobnost progresu onemocnění.

Následující tabulka č.4 ukazuje statistickou past při interpretaci:

Tabulka č.4: Specificita a sensitivita při f/tPSA³

| Cut-off f/t PSA | Specificita | Sensitivita |
|------------------------|--------------------|--------------------|
| 13,1 % | 95 % | 49 % |
| 16,3 % | 90 % | 63% |
| 23,0 % | 38% | 90 % |
| 25,9 % | 26 % | 95 % |

5.5.7 Přínos PSA pro diagnostikování CaP

- PSA vynikající při predikci kostních metastáz:
 - PSA < 10ng/ml – metastázy nepravděpodobné
 - nicméně < 1% pacientů s normálním PSA má metastázy!

- PSA po úspěšné radikální prostatektomii:
 - po 3 týdnech neprokazatelné
 - po 6 měsících < 0,4ng/ml

5.5.8 Jak tedy postupovat v diagnostice karcinomu prostaty ?

V USA je kupříkladu doporučováno začít s včasnou detekcí karcinomu prostaty ve 40 letech. Pokud je sérová hladina PSA < 0,6ng/ml a vyšetření per rektum (DRE – digitální rektální vyšetření) negativní, stačí následující PSA odebrat ve 45 letech. Při opakované negativitě pak opakovat v 50 letech a poté již každoročně. Ale pokud je PSA > 0,6ng/ml, je nezbytné nejméně jednou ročně vyšetření DRE a PSA. Nalezneme-li hodnotu PSA v rozmezí 2,6 – 4,0ng/ml anebo PSA-V > 0,5, je nezbytné zvažovat možnost biopsie prostaty.²⁴

Dle doporučení National NCCN (comprehensive cancer network – practice guidelines in oncology v. 2. 2005) je nejvhodnější využít PSA velocitu (PSA-V).^{12,13} To je rychlost nárůstu sérové hladiny PSA za určité období, nejčastěji se stanovuje za rok. Pro vysvětlení uvádí, že každý muž může mít svou hladinu PSA na různé úrovni, ale teprve její nárůst o 0,5ng/ml/rok může znamenat výrazné riziko karcinomu prostaty. Nutno ovšem dodat, že odběr PSA musí být proveden nejméně po třídenní sexuální abstinenci, přesněji ejakulaci. PSA má totiž v mužském těle za úkol zkapalnění spermatu.

Pro kuřáky, u kterých je statisticky vyšší výskyt karcinomu prostaty, je důležité zjištění, že tito mají nižší hladiny PSA (o 0,1ng/ml).²⁵ Proto musí být jejich hladiny PSA posuzovány přísněji. Rovněž tak i PSA u obézních mužů je vzhledem k jejich nižší hladině testosteronu nižší, ale karcinom prostaty je u nich častější a agresivnější.

5.6 Nejnovější poznatky v laboratorní diagnostice CaP – molekulární podstata

Aplikace mikroanalytických technologií DNA a proteomiky otevírá možnosti rozlišit pomalu rostoucí a agresivní nádory pomocí molekulárních „otisků“.

5.6.1 *Transkripční faktory ERG nebo ETV1*

Hledání specifického onkogenu zodpovědného za vznik nádorové buňky bylo po řadu let v případě karcinomu prostaty neúspěšné. V roce 2005 však byla publikována práce, která by mohla být zásadním průlomem v této problematice.²⁶ Pomocí nově vyvinuté metody COPA (Cancer Outlier Profile Analysis) bylo zjištěno, že **u většiny prostatických nádorů jsou silně exprimovány transkripční faktory ERG nebo ETV1** patřící do rodiny ETS proteinů.

Proteiny patřící do rodiny ETS transkripčních faktorů jsou silně evolučně konzervované (vyskytují se například i u *Drosophily*). Byly původně objeveny v roce 1983 jako *v-ets* onkogen ve viru ptačí leukémie E26. ETS proteiny regulují geny, které hrají roli v buněčné proliferaci, diferenciaci, hematopoéze, apoptóze, angiogenezi, atd. Bylo identifikováno více než 200 cílových genů těchto faktorů, což dobře ilustruje jak rozsah jejich aktivit, tak i důležitost těchto proteinů pro buněčnou regulaci a kancerogenezi.

Tyto onkogeny jsou silně exprimovány v několika nádorových buněčných liniích a v řadě patientských vzorků z lokalizovaných i metastatických prostatických karcinomů. Ukazuje se, že příčinou aktivace těchto onkogenů je **translokace promotoru pocházejícího z genu TMPRSS2** (Trans membrane serine 2 protease), který obsahuje element regulovaný androgeny. Nejčastěji dochází k delecí proměnlivého úseku DNA mezi TMPRSS2 (lokus 21q22.2) a ERG (lokus 21q22.3) na stejném chromozomu. Typickým produktem fúzního genu jsou různé varianty ERG onkogenu (nebo jen některých exonů ERG), obvykle ve formě fúzního proteinu s částí TMPRSS2. Jsou vysoce exprimované. Obdobně vznikají translokací TMPRSS2 fúzní geny s ETV1 (lokus 7p21.2) nebo vzácněji s ETV4 (lokus 17q21) genu (asi 2 % karcinomů).²⁷

TMPRSS2 je jedním z 12 členů rodiny transmembránové serinové proteázy typu II. Je exprimována v normální prostatické tkáni a **velmi silně exprimována v epitelu prostatického nádoru**. Za normálních okolností je to transmembránová molekula. Pokud je aktivována, doména s proteázovou aktivitou je uvolněna z buněčného povrchu do mezibuněčného prostoru, kde aktivuje například PAR – 2 (abnormal embrionic PARTitioning of cytoplasm) receptor, který hraje důležitou roli při vzniku metastáz. Exprese TMPRSS2 je

regulována androgeny. Fakt, že při fúzi s ETS proteiny hraje důležitou roli promotor regulovaný androgeny, může být důležité při hledání mechanismu účinku hormonální terapie u karcinomu prostaty. Naopak změna vlastností fúzního proteinu může být jedním z možných vysvětlení vzniku tumoru nezávislého na hormonech.

Zjištění, že se **translokace TMPRSS2 vyskytuje u 70 – 80 % primárních karcinomů prostaty** (podle jiných údajů asi u poloviny prostatických nádorů zjištěných screeningem), ukazuje, že jde o časnou a snad i primární událost v etiologii vzniku karcinomu. Stejná translokace byla objevena nejen u karcinomů, ale i v některých prekursorových lézích. Zdá se, že v případě prostatické kancerogeneze se jedná o velmi časnou událost, která předchází dalším případným změnám na chromozomální úrovni.²⁸

Objev tohoto mechanismu vzniku karcinomu prostaty by mohl mít velký vliv na vývoj nové generace markerů (zvláště v kombinaci s technologií analýzy cirkulujících nádorových buněk) i na vývoj nové generace léčiv.

Somatické genetické změny se týkají kromě již výše uvedeného genu **také genu GSTP1 a genu PTEN** (homolog fosfatázy a tenzinu), který kóduje aktivitu fosfatázy vůči bílkovinám a lipidům. Jeho koncentrace je při rozvinutých CaP často snižena. **Jako významný se jeví i gen CDKN1B** (p27) kódující na cyklinu závislý kinázový inhibitor, který tlumí nádorové bujení. Ztráta DNA sekvencí 12p12-3 byla popsána u 23 % lokalizovaných CaP a 47 % vzdálených metastáz CaP.

Také **onkogen STAT5** (převodník signálu a aktivátor transkripce) byl identifikován jako důležitý faktor pro přežití buněk CaP.

5.6.2 Lokální DNA hypermetylace nebo hypometylace.

Metylace cytosinu na 5' uhlíku v tzv. CpG sekvencích DNA jsou katalyzované jednou ze tří DNA-metyltransferáz (DNMT1, DNMT3a nebo DNMT3b). Metylované jsou nejčastěji tzv. CpG ostrovy vyskytující se v 5' oblastech více než poloviny všech genů. **Změny v metylaci mohou vést k transkripční inaktivaci nebo aktivaci genů popsané i u mnoha typů nádorů.**

V případě karcinomu prostaty je hypermetylace popsána u více než 30 genů. Mezi nimi jsou geny tumor-supresorů, geny kontrolující buněčný cyklus, geny kontrolující hormonální regulaci, geny řídící opravy poškozené DNA, invazivitu a morfologii nádorových buněk aj.

Snížení transkripce genu pro glutathion-S-transferázu $\pi 1$ (GSTP1) je nejběžnější dosud popsanou epigenetickou změnou (> 90 %) pro CaP.²⁹ **PCR metoda specifická pro metylaci dovoluje úspěšně detekovat metylaci GSTP1 v tělních tekutinách** (sérum, plazma, moč, ejakulát). GSTP1 chrání DNA před elektrofilními metabolity karcinogenů a reaktivními oxidanty tím, že je konjuguje na glutathion. Při CaP vede snížená exprese uvedeného enzymu často k rozvoji hypermetylace, zatímco u jiných malignit je tento jev pozorován vzácně. **Pomocí GSTP1 lze spolehlivě rozlišit intraepiteliální tvorbu nádoru od BHP** (při BHP je vždy negativní), **ale spolehlivá pozitivita u CaP je pouze u pacientů s cirkulujícími nádorovými buňkami**. V případě lokalizovaného onemocnění CaP je pozitivní nález GSTP1 jen u 36 % pacientů. Nicméně **takto lze detekovat 80 – 90 % adenokarcinomů prostaty**. Změna v genové expresi GSTP1 (snížení transkripce) vede ke zdvojnásobení rizika onemocnění v časném stádiu CaP a exprese GSTP1 nezávisí na koncentraci PSA.

5.6.3 Modifikace histonů

Kovalentní modifikace histonů zahrnují acetylaci, metylaci a fosforylaci, které provádějí specifické chromatin modifikující enzymy. Způsob této modifikace je označován jako „histonový kód“ a slouží jako druhý stupeň epigenetické regulace genové exprese. Acetylace histonů uvolňuje promotorové oblasti genů a umožňuje tak jejich transkripci, deacetylace naopak transkripci brání.

Modifikace histonů hraje významnou roli ve vzniku a vývoji karcinomu prostaty. Zvláštní význam má EZH2 gen kódující protein s doménou zodpovědnou za metyltransferázovou aktivitu důležitou pro metylaci histonů. Vysoká exprese tohoto genu v případě karcinomu prostaty vede například k utlumení exprese DAB2IP supresoru tím, že metyluje histon H3-K27

na DAB2IP promotoru a indukuje jeho deacetylaci. Jiným známým genem, který je kontrolován metylací histonu, je gen pro PSA.^{30,31}

5.6.4 HPC1 a dědičná forma CaP

Rodinná (familiální) forma karcinomu prostaty představuje podle některých zdrojů asi 10 – 20 % a **dědičná forma** jen asi 5 – 10 % všech případů karcinomu prostaty v populaci.³² Část rodinných výskytů CaP lze totiž vysvětlit rodinnými návyky, stravou, kouřením a vlivem prostředí. Familiální výskyt CaP lze také jen obtížně odlišit od sporadického, vyvolaného citlivými geny. Riziko onemocnění způsobeného náchylnými geny je podstatně vyšší v kombinaci s účinkem potravy a životního prostředí.

Dědičná forma CaP je pravděpodobně způsobena **vzácnými alelami genů**, které jsou v současnosti **předmětem intenzivního genetického mapování**. Uskutečněné i probíhající studie využívají klasické metody genetického mapování a sledují genetickou vazbu hledaných genů u postižených rodin v dané populaci. Mají často obrovský rozsah. Důvodem velkého rozsahu těchto studií je snaha o překonání potíží, které jsou způsobeny tím, že je dědičná forma onemocnění překryta daleko vyšší frekvencí sporadické formy onemocnění, malou velikostí sledovaných rodin, heterogenitou alel atd. Výsledky těchto studií jsou tedy dosud často kontroverzní a nejasné.

Nejpravděpodobnějším dosud nalezeným kandidátem je **lokus 1q24-25 pojmenovaný HPC1 (hereditary prostate cancer 1)**. Byl nalezen u velkých rodin v USA a ve Švédsku a **jedná se o různě mutovaný gen pro ribonukleázu L**. Tento gen byl následně zkoumán několika vědeckými skupinami včetně International Consortium for Prostate Cancer Genetics zahrnující týmy z USA, Austrálie, Finska, Norska, Švédska a UK.

U některých dalších polymorfních genů také existují alely asociované se zvýšeným rizikem CaP. **Androgenní receptor obsahuje úseky polymorfního polyglutamin trinukleotidu (CAG) a zkrácení těchto úseků vede ke zvýšení rizika CaP**. Polymorfismus spojený se zvýšeným rizikem CaP se projevuje také u receptoru vitamínu D, zejména u rozvinutých nádorů.

Pokud budou nalezeny alely způsobující dědičnou formu karcinomu prostaty a případné mutace dobře definovány, stane se zřejmě genetický screening dědičné formy karcinomu prostaty realitou.³¹

5.7 Nejnovější poznatky v laboratorní diagnostice CaP – biochemické markery sledované při CaP

Byla uvedena téměř **stovka markerů³³**, která by mohla být použitelná pro diagnostiku CaP. Tyto látky mají mnoho biochemických a buněčných funkcí.

Řadu z nich tvoří **enzymy**, např. proteáza, kináza, fosfatáza, reverzní transkriptáza, racemáza, reduktáza, syntáza, hydroláza, RNáza, ale také **bílkoviny řídící propustnost buněčné membrány, transkripční faktor, proteázový inhibitor, cytokin, nebo bílkoviny jaderné matrice, výztuže membrán a další.**

Pro výběr markeru jsou podstatná klinická data a vědecké poznatky podporující jeho potenciální užitečnost. Marker by měl být stanovitelný robustní a dobře reprodukovatelnou běžně dostupnou metodou v séru, moči nebo seminální tekutině. Významně může pomoci také mikroanalýza tkání. Perspektivní markery jsou velmi rozdílné velikosti: od jednoho z nejmenších enzymů - jaderné cholin/etanolaminové kinázy 6 000, jejíž funkce není známa, až po jádro spojené s matricí, které slouží k rozmnožování buněk a má velikost 358 000.

5.7.1 Metody založené na vazebných schopnostech PSA

Při imunoanalýze PSA použito > 80 MAb (monoklonálních protilátek):

- molekulární struktura MAb se uplatňuje v 6 oblastech PSA
- při vazbě PSA na bílkovinu jsou mnohé epitopy PSA pro MAb nedostupné
- **při vazbě na -2-makroglobulin** (viz. tab.č1-distribuce PSA v séru) dokonce **není PSA detekovatelný standardními imunochemickými metodami!!!**

Postup ke stanovení PSA vázaného na α -2-makroglobulin prokázal, že zastoupení tohoto aduktu při CaP klesá.

Stanovení celkového PSA včetně PSA vázaného na α -2-makroglobulin:

- imunoabsorpce PSA na magnetických kuličkách
- separace séra a denaturace α -2-makroglobulinu při pH 11,4 22°C 30 min
- neutralizace
- detekce PSA soupravou DELFIA

Kombinace stanovení PSA vázaného na α -2-makroglobulin a sledování poměru f/t PSA zvyšuje specifitu stanovení.

5.7.2 Kallikreiny

Protože nejznámější marker PSA patří do rodiny tkáňových kallikreinů (má označení hK3 – human kallikrein), byly studovány i další kallikreiny. Tyto jsou lokalizované **na chromozomu 19q13.4 a zakódované pomocí 15 strukturně podobných, hormony regulovaných genů**, tj. největším seskupením sousedících proteázových genů v celém genomu.³⁴

Název kallikrein byl zaveden podle řeckého označení pro pankreas, kde byl poprvé nalezen hK1. Kallikreiny jsou **jednořetězcové serinové proteázy** (pravděpodobně všechny jsou glykoproteiny) a jejich translace probíhá ve formě preproenzymů s molekulovou hmotností 23 000 až 26 000. V prostatě probíhá na úrovni mRNA téměř výhradně **exprese genů pro kallikreiny: hK2, hK3, hK4, hK11 a hK15**. Imunohistochemicky bylo prokázáno, že kallikreiny hK3, hK4 a hK11 jsou lokalizovány převážně v cytoplazmě žlázo­vého epitelu, odkud jsou pravděpodobně vylučovány. Regulace transkripce je prokázána u hK2 a hK3 jako odezva na androgeny a progestiny v prostatě a pro hK4 na androgeny v prostatě.

5.7.2.1 Kallikrein hK2

Lze použít pro **diferenciální diagnostiku mezi CaP a benigní hyperplazií prostaty (BHP) a také pro rozlišení mezi orgánově specifickým a nespecifickým onemocněním**. Sekvence aminokyselin je u hK2 s 80 % homologická s PSA. Koncentrace hK2 je v séru 100x nižší než u PSA, přičemž se ale významně větší podíl hK2 (81 – 96 %) nachází ve volné formě a pouze zbytek je vázaný na bílkoviny. **Specifita hK2/fPSA > f/tPSA!**

5.7.2.2 Kallikrein hK11, hK3, hK5, hK11

Je zvýšený u 60 % mužů s CaP. **Koncentrace hK11 i poměr hK11/tPSA jsou signifikantně nižší u pacientů s CaP než u pacientů s BHP**. Protože poměr hK11/tPSA má senzitivitu 90 %, bylo by možné se vyhnout přibližně 50 % zbytečných biopsií, pokud jsou prováděny při podílu fPSA < 20 %.

Také je známo, že snížená koncentrace **hK3** ve tkáni prostaty je spojena s agresivnější formou nádoru. Naproti tomu zvýšené koncentrace **hK5 a hK11** indikují příznivou prognózu CaP.

Kallikreiny jakožto sekreční proteiny jsou přítomny nejen v séru, ale také v seminální plazmě a mateřském mléce.

5.7.3 Prostata specifický membránový antigen (PSMA)

PSMA je transmembránový glykoprotein na povrchu buněk epitelu prostaty a je vysoce specifický pro prostatu.

PSMA je antigen vázaný na membránu → detekce v séru předpokládá existenci cirkulujících prostatických buněk.

- koncentrace PSMA: CaP > BHP
- senzitivita testu: 39 – 91 %
- specifita testu: 60 – 96 %

PSMA detekce:

– imunotechnika na proteinovém biočipu použitelná pro kvantitativní stanovení

5.7.4 Telomerázová reverzní transkriptáza (TERT)

- aktivita TERT není většinou prokazatelná v benigní tkáni
 - TERT má schopnost vyvolávat nesmrtelnost buněk
- TERT aktivita u 63 –94 % CaP
- TERT je nezávislý marker
 - nezávisí na koncentraci PSA
- nevýhody TERT:
 - není specifický pro prostatu

5.7.5 Prostatický antigen kmenových buněk (PSCA)

- je na povrch buněk připojen glykosylfosfatidylinositolovou kotvou
- uplatňuje se při dělení buněk a signální transdukci
- převážně vzniká v prostatě
- je zvýšený u většiny CaP
- je potenciálním cílem při terapii
- stanovuje se:
 - in situ* hybridizací
 - kvantitativní reverzní transkriptázovou PCR (RT-PCR)
 - chromatografií s hydrofobní interakcí
- vyskytuje se u 48 –94 % CaP
- je intenzivně uvolňován při metastázách
- **protilátky proti PSCA inhibují růst nádoru a vznik metastáz**

nedostatky PSCA:

- málo zkušeností (chybí publikace)
- potřeba lepších kvantitativních metod

5.7.6 Chromogranin A (GRN-A)

- prohormon nacházející se ve většině endokrinních a neuroendokrinních buněk
- koncentrace koreluje s rozvojem nádoru
- identifikuje CaP nezávislý na androgenech³⁵
 - předvídá špatnou prognózu

nedostatky GRN-A:

- CaP nemusí obsahovat endokrinní buňky
- GRN-A není schopen prokázat časně stádium CaP
- nevhodný pro rozlišení BHP a CaP⁴

5.7.7 Sledování markerů CaP v moči

Sledování markerů CaP v moči se rovněž věnuje značné úsilí³⁶, zejména při návrhu screeningových testů. Bylo **testováno více než 20 různých markerů**, ale rozsah studií je dosud malý a často se jedná o obtížně stanovitelné látky.

Markery pro stanovení jsou nukleové kyseliny DNA, resp. RNA nebo proteiny. **V moči** mohou být sledovány už dříve uváděné markery **GSTP1, resp. TERT**. Z bílkovin byly v moči při CaP prokázány **MCM-5 (minichromosome maintenance complex component 5), fibronectin, argininamidáza, transferin, fPSA a další**. Přestože uváděná specifita je velmi vysoká a někdy dosahuje i 100 % (např. pro GSTP1), je senzitivita tohoto markeru nízká (36 %). Celkově nejlepší výsledky byly zaznamenány pro MCM-5 protein, a to senzitivita 92 % a specifita 82 %. Ovšem studie obsahovala pouze 12 pacientů s CaP. Další rozšíření analýz v moči předpokládá rozvoj molekulárně biologických metod a detekci pomocí hmotnostní spektrometrie.

5.7.7.1 Slibný marker – DD3 (differential display code 3) a studie v ČR

Jedním z velice slibných markerů je **DD3**, což je **pro prostatu specifická nekodující mRNA, která je ve větší míře exprimován v nádorové tkáni.**

Ve FN Plzeň proběhly první studie s tímto markerem u nás:

Materiál, metodika:

Jako primární biologický materiál byla použita **moč** (30–50 ml první porce moči), která byla odebrána po 60sekundové masáži prostaty. Moč byla stabilizována detergentním činidlem a zmražena na 70°C před finálním zpracováním. Moč byla odebrána od dvou skupin pacientů:

- První skupinu tvořili pacienti (n = 65) indikováni k biopsii prostaty z důvodu suspektního per rectum nálezu či patologické hodnoty PSA.
- Druhou kontrolní skupinu (n = 45) tvořili pacienti s minimálním rizikem CaP (normální per rectum nález, PSA < 1,5 ng/ml).

U pacientů indikovaných k biopsii prostaty byl odebrán vždy jeden vzorek tkáně na expresi DD3 přímo v tkáni žlázy. DD3 a PSA mRNA byly izolovány z moči a tkáně a následně amplifikovány a kvantifikovány pomocí RT PCR metodiky.

Pro každou skupinu byl vyhodnocen celkový počet kopií DD3 z moči a DD3/PSA mRNA poměr. Analogicky bylo postupováno u zpracování tkáně prostaty.

Výsledky:

V rámci studie bylo dosaženo 72 % výtěžnosti prostatických buněk, poskytujících dostatek RNA pro RT PCR metodu z první porce moči po masáži prostaty.

Jak celkový počet kopií DD3, tak poměr DD3/PSA mRNA byl signifikantně odlišný u skupiny pacientů s průkazem karcinomu prostaty od skupiny pacientů s negativní histologií (p < 0,05) a kontrolní skupinou pacientů (p < 0,001).

Expresí DD3 v tkáni prostaty byla přítomna u 98 % pacientů s CaP.

Závěr:

V souboru pacientů bylo dosaženo **65% senzitivity** pro DD3 a DD3/PSA mRNA poměr při **85% specifitě**. Patologická exprese DD3 u pacientů s negativní histologií může být nápomocna k indikaci časně rebiopsie.

Expresse DD3 v tkáni karcinomu prostaty dosahuje prakticky 100 %.³⁷

5.7.8 Cirkulující nádorové buňky

Rozsev buněk karcinomu prostaty do sekundárních tkání je proces, který předchází vzniku metastáz a předpokládá cestování nádorových buněk žilním systémem. V případě karcinomu prostaty dochází po provedení radikální prostatektomie k rekurenci nádoru ve formě metastáz ve 20 – 30 % případů. Ke zvýšení hladiny PSA, která jako první rekurenci signalizuje, může v některých případech dojít až deset nebo patnáct let po operaci, a navíc zde často ještě dochází ke zpoždění výskytu metastáz po zvýšení hladiny PSA. Podle provedených studií stoupá pravděpodobnost rekurence nádoru stále s dobou po operaci. To vše ukazuje na existenci spících buněk karcinomu v periferních tkáních - v případě karcinomu prostaty téměř vždy v kostech. Podle některých údajů se tyto buňky do kostí dostávají už od časných stadií vzniku karcinomu.

Cirkulující nádorové buňky by mohly mít velký význam pro diagnostiku i léčbu karcinomu prostaty. Zpočátku se většina vědeckých a klinických týmů soustřeďovala na detekci a kvantifikaci nádorových buněk (v případě karcinomu prostaty epiteliálních) v cirkulaci nebo v periferních tkáních. **Podle některých studií má počet cirkulujících buněk význam pro prognózu pacienta a dnes už existuje několik účinných metod pro jejich stanovení (např. RT-PCR detekce mRNA pro PSA).**

Metoda RT-PCR

Olsson zavedl do klinické praxe **RT-PCR** (polymerázová řetězová reakce s použitím reverzní transkriptázy) test **pro stanovení PSA pozitivních buněk z periferní krve**. RT-PCR zvyšuje přesnost stagingu nádoru na 93 %.

Pokud byla předoperační hodnota sérového PSA vyšší než 10 ng/ml a RT-PCR na PSA pozitivní buňku v periferní krvi negativní, pak 81 % těchto pacientů, kteří podstoupily radikální prostatektomii měli CaP skutečně omezený pouze na samotnou žlázu. Naopak pokud bylo u pacientů PSA vyšší než 10 ng/ml a RT-PCR test pozitivní, pak 90 % nemocných mělo pozitivní okraj nebo invazi do semenných váčků popřípadě postižení uzlin. Pokud bylo při biopsii prostaty prokázáno perineurální šíření CaP a RT-PCR bylo pozitivní, pak autoři při radikální prostatektomii našli extraprostatické šíření CaP ve 100% případech.³⁸

Větší možnosti však slibuje izolace jednotlivých cirkulujících nádorových buněk a jejich podrobná analýza. Během izolace dochází k postupné koncentraci nádorových buněk vzhledem k ostatním buňkám v krevním oběhu. Tato koncentrace probíhá v několika krocích, které obvykle zahrnují centrifugaci v gradientu a pozitivní či negativní záchyt buněk na magnetických mikročasticích pokrytých protilátkami proti povrchovým buněčným antigenům. V případě karcinomu prostaty jsou pro pozitivní záchyt využívány obvykle protilátky proti cytokeratinům, protože se jedná o epitelální buňky. Stejně markery mohou být využity i pro vizualizaci jednotlivých buněk. Mikromanipulačním pipetovacím systémem mohou pak být vizualizované nádorové buňky odděleny od ostatních a podrobně charakterizovány.³⁹

5.7.9 Růstové faktory

Růstové faktory jsou důležité pro normální vývoj a růst prostaty, ale nevhodná exprese jednotlivých členů této rodiny vede k progresi CaP. **Dlouhodobá expozice IL-6 na buňky CaP usnadňuje růst nádoru.**⁴⁰ Receptor hepatocytového růstového faktoru (c-met) je protoonkogenní bílkovina, která byla zjištěna u velkého počtu CaP, a bylo prokázáno, že **c-met zvyšuje invazní potenciál buněk CaP.**

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Cíl experimentu

Zjistit rozdíly v koncentracích PSA i fPSA v krvi srážlivé (sérum) a nesrážlivé (plazma). Oba druhy krve přichází do laboratoře ke zpracování. Plazma spíše pro statimová (urgentní) vyšetření a sérum pro ostatní.

Z příbalového letáku k setu PSA: „Použití zkumavek pro odběr krve od různých výrobců může přinášet rozličné hodnoty v závislosti na materiálech a přísadách včetně gelových nebo fyzických bariér, aktivátorů sraženin a/nebo antikoagulačních činidel. Stanovení PSA na analyzátoru IMMULITE 2000 nebylo testováno se všemi možnými varianty jednotlivých typů zkumavek.“

Z příbalového letáku k setu fPSA: „Použití zkumavek pro odběr krve od různých výrobců může přinášet rozličné hodnoty v závislosti na materiálech a přísadách včetně gelových nebo fyzických bariér, aktivátorů sraženin a/nebo antikoagulačních činidel. K určení dopadu použití alternativních typů vzorků pro toto stanovení jsme odebrali krev 15 dobrovolníkům do obyčejných, heparinizovaných, EDTA a Becton Dickinson(SST ®) vacutainer zkumavek. Vzorky jsme následně stanovili metodou fPSA na analyzátoru IMMULITE 2000. Podle lineární regrese:

Heparin = korelační koeficient 0,997

EDTA = korelační koeficient 0,998

SST (obyčejné zkumavky) = korelační koeficient 0,990⁴⁰

6.2 Vlastní provedení

Na našem pracovišti – „Oddělení klinické biochemie a diagnostiky – Oblastní nemocnice Náchod a.s.“ se provádí stanovení hladin PSA a fPSA na přístroji IMMULITE 2000 firmy DPC (USA).

Princip:

Stanovení pomocí **sekvenční chemiluminiscenční imunochemické reakce v pevné fázi**:

Pevná fáze (kulička) je potažena specifickou **myšší monoklonální protilátkou** proti PSA (fPSA). Vzorek pacienta je inkubován s kuličkou v prvním cyklu, během této doby se PSA ze vzorku váže na monoklonální protilátku na kuličce. Nenavázané sérum je odstraněno centrifugačním mytím. Reagencie obsahující **alkalickou fosfatázu** (z telecího střeva) **navázanou na polyklonální kozí protilátku anti-PSA** specifickou pro PSA je přidána během druhého cyklu a váže se na PSA na kuličce za tvorby **sendvičového komplexu** s protilátkou. Nenavázaný enzymový konjugát je odstraněn centrifugačním mytím. Nakonec je přidán **chemiluminiscenční substrát** ke kuličce a generovaný signál je úměrný množství navázaného enzymu.

Podmínky stanovení:

Pro náš experiment jsme zvolili skupinu 31 pacientů (bohužel větší skupinu pacientů nebylo možné vyšetřit, vzhledem k finanční náročnosti stanovení), u kterých jsme odebrali krev jak srážlivou, tak i nesrážlivou v rámci jednoho odběru (vpichu) do vakuových primárních zkumavek od firmy Becton – Dickinson: sérum = zkumavka s dělícím gelem

plazma = zkumavka s antikoagulanciem (Li-Heparin)

Následoval transport na naše oddělení (potrubní pošta). Po standardní centrifugaci došlo k oddělení séra/plazmy od krevního koláče. Sérum i plazmu téhož pacienta jsme vložili v jeden okamžik do analyzátoru.

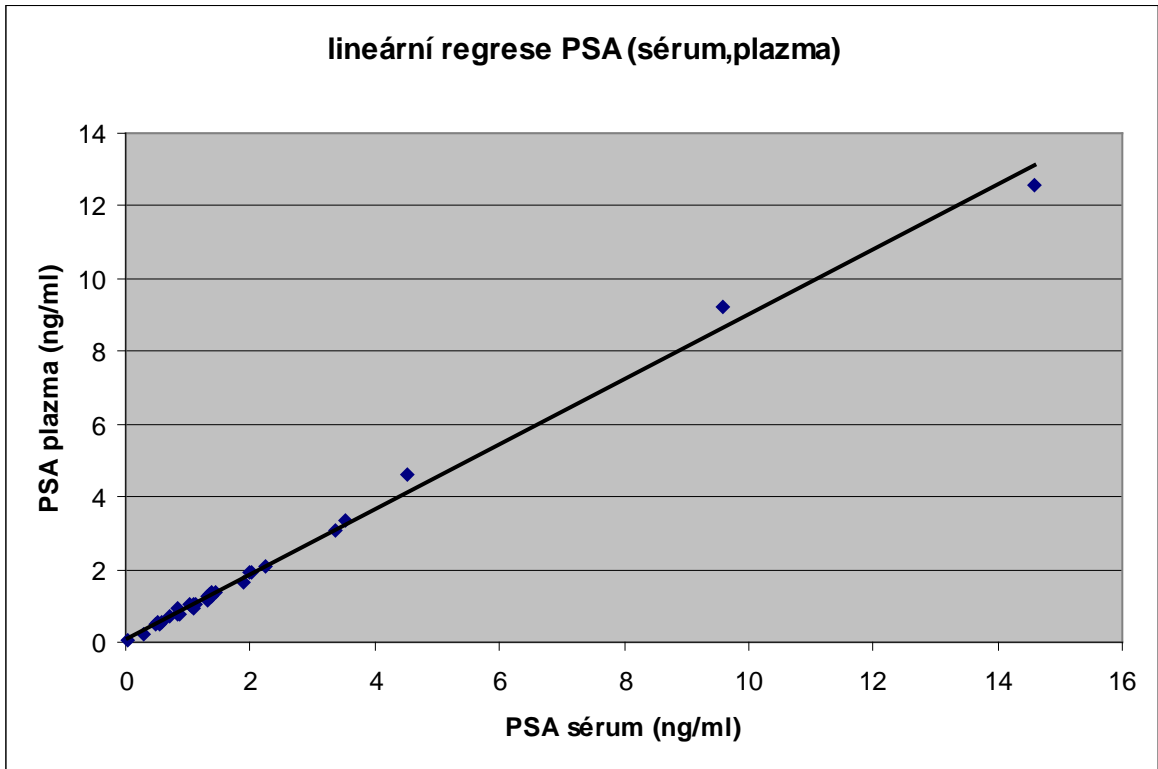
Výsledky jsme vyhodnotili pomocí lineární regrese, korelačních koeficientů a Bland-Altmanova diferenčního grafu.

6.3 Výsledky experimentu

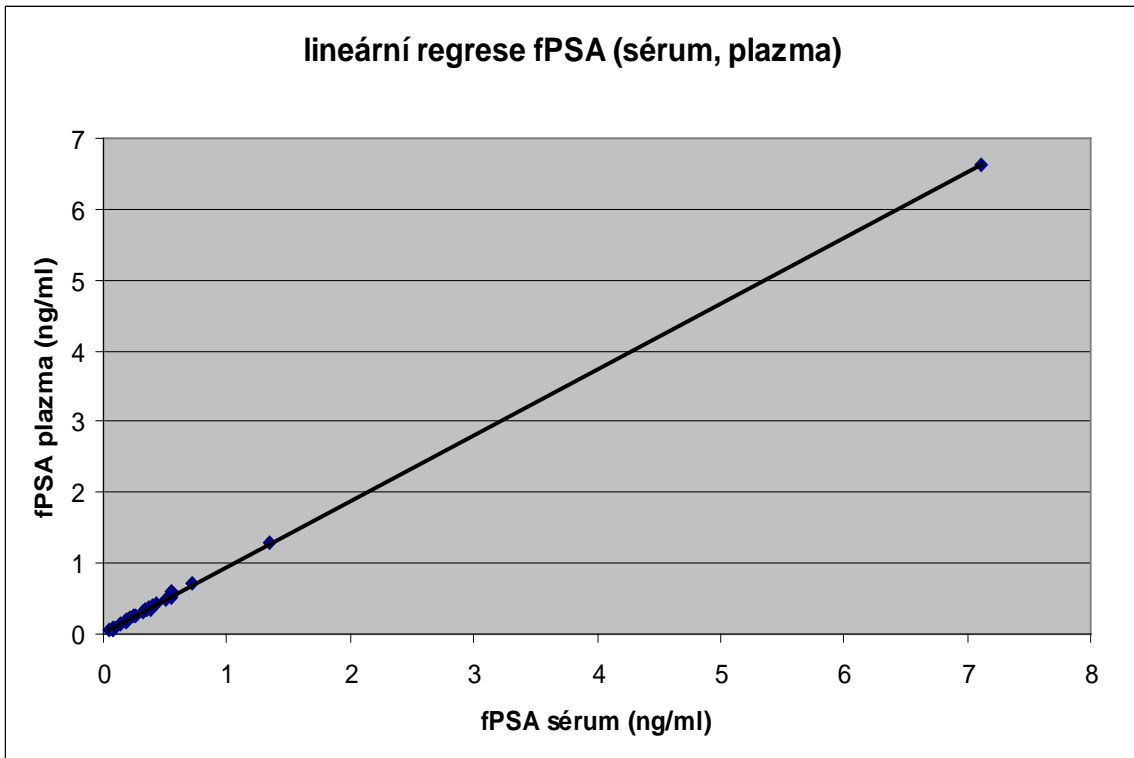
Tabulka č.5: Hodnoty PSA a fPSA v séru a plazmě

| | PSA(ng/ml) | fPSA(ng/ml) | PSA(ng/ml) | fPSA(ng/ml) |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|
| číslo vyš. | sérum | sérum | plazma | plazma |
| 1. | 0,56 | 0,14 | 0,52 | 0,14 |
| 2. | 1,36 | 0,427 | 1,3 | 0,417 |
| 3. | 1,9 | 0,549 | 1,65 | 0,592 |
| 4. | 0,526 | 0,18 | 0,538 | 0,192 |
| 5. | 2 | 0,252 | 1,92 | 0,252 |
| 6. | 3,38 | 0,714 | 3,09 | 0,712 |
| 7. | 1,1 | 0,321 | 1,04 | 0,311 |
| 8. | 0,84 | 0,319 | 0,788 | 0,311 |
| 9. | 3,53 | 0,378 | 3,35 | 0,356 |
| 10. | 0,84 | 0,201 | 0,92 | 0,19 |
| 11. | 1,45 | 0,508 | 1,35 | 0,489 |
| 12. | 0,86 | 0,201 | 0,76 | 0,208 |
| 13. | 1,07 | 0,144 | 0,99 | 0,148 |
| 14. | 0,49 | 0,217 | 0,479 | 0,222 |
| 15. | 0,7 | 0,087 | 0,712 | 0,082 |
| 16. | 2,24 | 0,55 | 2,1 | 0,53 |
| 17. | 1,39 | 0,402 | 1,4 | 0,39 |
| 18. | 1,31 | 0,36 | 1,27 | 0,36 |
| 19. | 1,39 | 0,18 | 1,29 | 0,18 |
| 20. | 1,1 | 0,35 | 0,94 | 0,34 |
| 21. | 1,33 | 0,07 | 1,16 | 0,07 |
| 22. | 9,6 | 1,34 | 9,2 | 1,3 |
| 23. | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,05 |
| 24. | 0,28 | 0,08 | 0,24 | 0,09 |
| 25. | 1,02 | 0,18 | 1,04 | 0,16 |
| 26. | 4,52 | 0,57 | 4,59 | 0,56 |
| 27. | 0,57 | 0,34 | 0,57 | 0,33 |
| 28. | 1,11 | 0,322 | 1,05 | 0,312 |
| 29. | 2,02 | 0,254 | 1,94 | 0,254 |
| 30. | 9,43 | 0,481 | 9,38 | 0,456 |
| 31. | 13,1 | 1,73 | 11,5 | 1,57 |
| průměr: | 2,292129032 | 0,383774194 | 2,165064516 | 0,373354839 |
| SD: | 2,961385113 | 0,346809394 | 2,752903089 | 0,323565175 |
| korelační koeficient: | PSA: 0,997611237 | fPSA: 0,998203852 | | |

Graf č.5: Lineární regrese PSA (sérum, plazma)



Graf č.6: Lineární regrese fPSA (sérum, plazma)



Podle **lineární regrese a korelačních koeficientů (r):**

$$r(\text{PSA sérum, plazma}) = 0,99761$$

$$r(\text{fPSA sérum, plazma}) = 0,99820$$

– vykazují hodnoty sérum vs. plazma téměř lineární závislost (viz. tab. č.5 a grafy č.5 a 6):

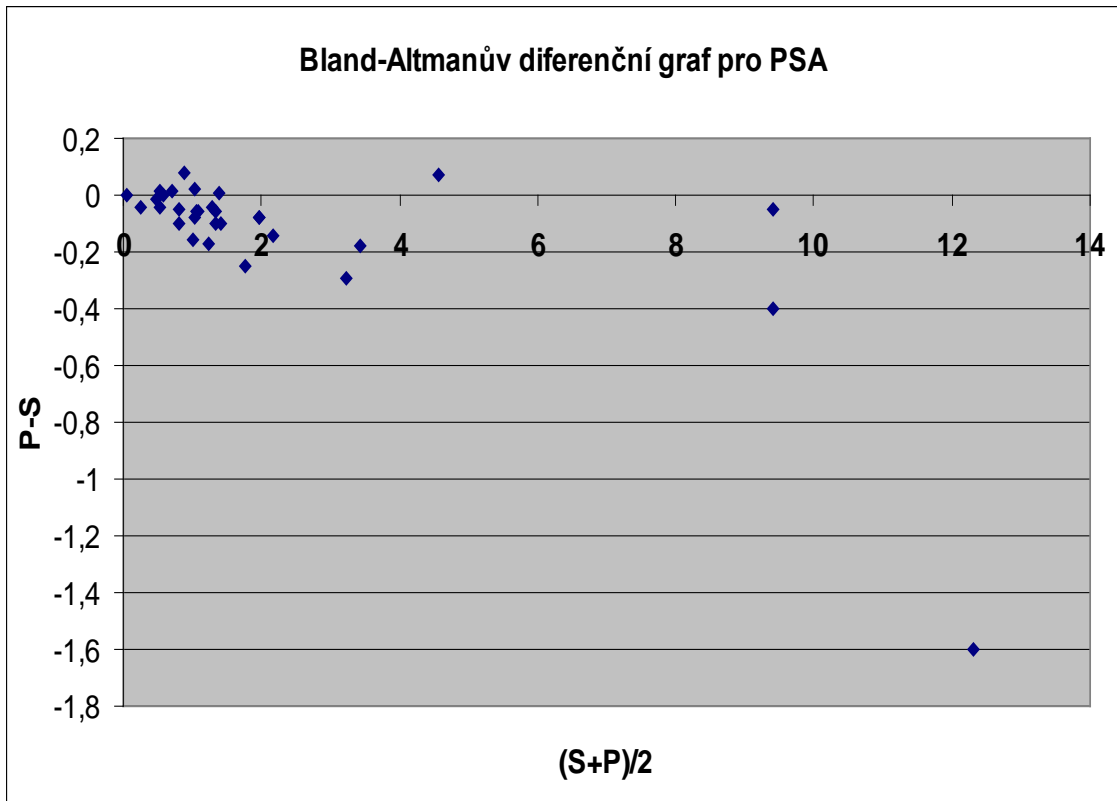
Analytický nástroj Korelace se používá k testování jednotlivých dvojic měřených proměnných a zjištění závislosti dvou měřených proměnných. Hodnota korelačního koeficientu se pohybuje od -1 do +1. Závislost znamená, že vysoké hodnoty jedné proměnné odpovídají vysokým hodnotám druhé proměnné (kladná korelace) nebo že nízké hodnoty jedné proměnné odpovídají vysokým hodnotám druhé proměnné (záporná korelace). Pokud jsou hodnoty obou proměnných nezávislé je korelace blízká nule.

Pro statistické zpracování jsme vytvořili **Bland-Altmanovy diferenční grafy:**

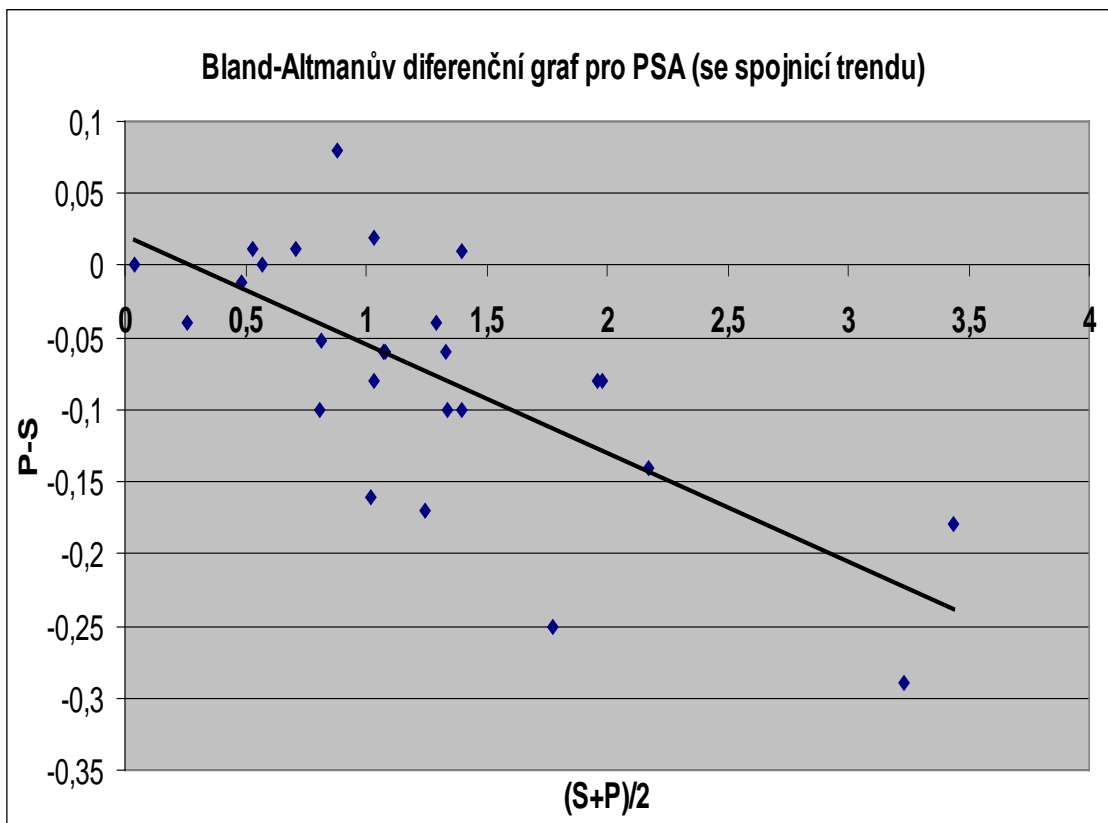
Určili jsme si, že hodnoty v séru (S) budou ležet na ose x a vztahneme na ně hodnoty v plazmě (P). Osa x tedy obsahuje průměr metod (S+P)/2 a osa y rozdíl hodnot P-S. Pokud budou hodnoty porovnávané metody (plazma) vyšší než referenční metoda (sérum), tak se budou body nacházet nad osou x a naopak (graf č. 7 a 8).

Pro lepší přehlednost a korektnost (vzhledem k tomu, že se nám během probíhajícího experimentu nepodařilo nasbírat větší počet hodnot ve vyšších hladinách) jsme tento graf upravili. Vypustili jsme vyšší hodnoty a zaměřili se pouze na hodnoty v nižších hladinách, kde máme největší procento hodnot. Pak jsme graf proložili spojnici trendu (graf č.9 a 10).

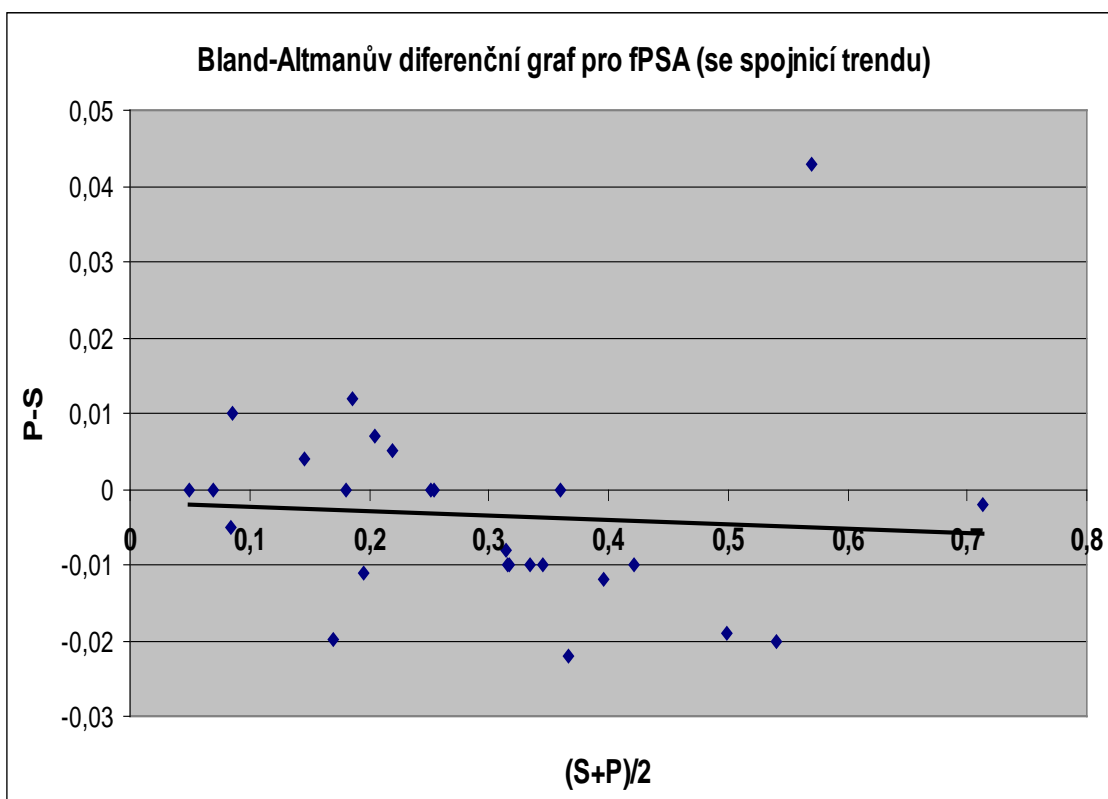
Graf č.7: Bland-Altmanův diferenční graf pro PSA



Graf č.9: Bland-Altmanův diferenční graf pro PSA (se spojnicí trendu)



Graf č.10: Bland-Altmanův diferenční graf pro fPSA (se spojnicí trendu)



6.4 Diskuse

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo především porovnání hodnot PSA a fPSA v různém biologickém materiálu: sérum = krev srážlivá (zkumavka s dělicím gelem) a plazma = krev nesrážlivá (zkumavka s antikoagulanciem: Li-Heparin).

Výhody plazmy z klinického hlediska jsou:

- 1./ úspora času je možno ihned centrifugovat (sérum: 30min srážení)
- 2./ bližší systému „in vivo“
- 3./ neobjevuje se pocentrifugační koagulace
- 4./ menší nebezpečí hemolýzy
- 5./ cca o 15- 20% vyšší výtěžnost
- 6./ široký sortiment odběrových zkumavek

Zřejmě tyto výhody jsou příčinou proč např.v USA, Kanadě či Japonsku provádí drtivou většinu stanovení právě v plazmě. Zatímco u nás je trend spíše opačný. V poslední době se vedou diskuze i o vlivu dělicího gelu, antikoagulancií na různá stanovení – včetně PSA a fPSA. Z příbalových letáků k setům PSA, fPSA: „Použití zkumavek pro odběr krve od různých výrobců může přinášet rozličné hodnoty v závislosti na materiálech a přísadách včetně gelových nebo fyzických bariér, aktivátorů sraženin a/nebo antikoagulačních činidel. Stanovení PSA na analyzátoru IMMULITE 2000 nebylo testováno se všemi možnými varianty jednotlivých typů zkumavek.“ Pouze fPSA bylo testováno na 15 dobrovolnících, což je poměrně malá skupina (Heparin = korelační koeficient 0,997; EDTA = korelační koeficient 0,998; SST-obyčejné zkumavky = korelační koeficient 0,990).⁴¹

V našem experimentu jsme rozšířili skupinu na 31 (bohužel větší rozsah nebyl možný pro finanční náročnost) a provedli stanovení PSA a fPSA současně v plazmě i séru.

Podle lineární regrese a korelačních koeficientů (r):

$$r(\text{PSA sérum, plazma}) = \mathbf{0,99761}$$

$$r(\text{fPSA sérum, plazma}) = \mathbf{0,99820}$$

Prokázali jsme lineární závislost mezi vyšetřeními v plazmě a séru jak u PSA tak i u fPSA (graf č.5 a 6).

Po zhotovení Bland-Altmanových diferenčních grafů (graf č.7 a 8) bylo už na první pohled zřejmé, že statisticky jsou hodnoty v plazmě (jednotlivé body grafu) nižší než v séru (leží na ose x).

Pro lepší přehlednost a korektnost (vzhledem k tomu, že se nám během probíhajícího experimentu nepodařilo nasbírat větší počet hodnot ve vyšších hladinách) jsme tento graf upravili. Vypustili jsme vyšší hodnoty a zaměřili se pouze na hodnoty v nižších hladinách, kde máme největší procento stanovení. Pak jsme graf proložili spojnicí trendu (graf č.9 a 10).

Jak je z těchto grafů patrné **metoda PSA vykazuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami v séru a plazmě: hodnoty v plazmě jsou nižší než v séru**. Tuto skutečnost potvrzuje i průměr hodnot v tabulce č.5:

$$\text{průměr}_{(\text{PSA plazma})} = 2,1650$$

$$\text{průměr}_{(\text{PSA sérum})} = 2,2921$$

Metoda fPSA (dle Bland-Altmanových diferenčních grafů) **nevykazuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami v séru a plazmě**. Tuto skutečnost potvrzuje i průměr hodnot v tabulce č.5:

$$\text{průměr}_{(\text{fPSA plazma})} = 0,3733$$

$$\text{průměr}_{(\text{fPSA sérum})} = 0,38377$$

Znovu zde ale musíme zopakovat, že pro plnohodnotnou studii je třeba mnohem většího souboru vyšetření v různých koncentracích. Pro nás je toto nemožné jak z technických, tak i z finančních důvodů.

Již v době trvání tohoto experimentu probíhaly a stále probíhají jednání mezi firmou DPC (USA) a jejich zastoupením v ČR ve věci výběru vhodného typu zkumavek. Měly by být provedeny rozsáhlejší studie a celá záležitost by měla být synchronizována v rámci EU ale i celosvětově. Protože se ale sérum využívá pro většinu analytů a stanovení v plazmě může vykazovat určitá specifika vzhledem k obsahu antikoagulačního činidla, tak se v rámci ČR v drtivé většině vyšetřuje PSA i fPSA v séru.

Za velkou chybu bych považovala střídání odběrů sérum/plazma, zejména při monitorování léčby v čase. Zde by mohlo dojít k výkyvům hladin, způsobených špatnou volbou biolog. materiálu.

6.5 Závěr z vlastního měření

Prokázali jsme lineární závislost mezi vyšetřeními v plazmě a séru jak u PSA tak i u fPSA (graf č.5 a 6).

Metoda PSA (dle Bland-Altmanových diferenčních grafů) vykazuje statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi v séru a plazmě: hodnoty v plazmě jsou nižší než v séru. Tuto skutečnost potvrzuje i průměr hodnot.

Metoda fPSA (dle Bland-Altmanových diferenčních grafů) nevykazuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami v séru a plazmě. Tuto skutečnost potvrzuje i průměr hodnot.

V naší laboratoři nadále vyšetřujeme PSA i fPSA jak v séru tak i v plazmě (stanovení v séru zcela převažují) a čekáme na závěry jednání amerického výrobce se zastupující firmou v ČR.

7 ZÁVĚR

Karcinom prostaty je nejčastějším maligním nádorem urogenitálního systému a tvoří asi 15% všech maligních nádorů u mužů nad 50 let. V laboratorní diagnostice má zatím nezastupitelnou roli vyšetření prostatického specifického antigenu (PSA) a volného prostatického specifického antigenu (fPSA) a parametrů z nich odvozených. I když se vedou velké diskuze o jejich využití v screeningu karcinomu prostaty, stanovení těchto nádorových markerů se zatím nejvíce přibližuje svou vypovídací hodnotou screeningovému vyšetření ze všech obecně prováděných tumor markerů.

PSA je tkáňově specifický, ale jeho hodnotu koncentrace zvyšují některá jiná onemocnění prostaty (např. benigní hyperplazie), z tohoto důvodu bylo zavedeno vyšetření fPSA a další parametry z nich odvozené. Pro stanovení diagnózy musí být vždy provedena další vyšetření (biopsie, vyšetření per rectum,...)

Velice důležitá je také standardizace analytických a klinických postupů. Vliv typu biologického materiálu (sérum – plazma) na vyšetření PSA a fPSA je tématem experimentální části této bakalářské práce. Prokázali jsme lineární závislost mezi vyšetřeními v plazmě a séru jak u PSA tak i u fPSA (graf č.5 a 6). Metoda PSA (dle Bland-Altmanových diferenčních grafů) však vykazuje statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi v séru a plazmě: hodnoty v plazmě jsou nižší než v séru. Tuto skutečnost potvrzuje i průměr hodnot. Metoda fPSA (dle Bland-Altmanových diferenčních grafů) nevykazuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami v séru a plazmě. Tuto skutečnost potvrzuje i průměr hodnot. Avšak pro plnohodnotnou studii je třeba mnohem většího souboru vyšetření v různých koncentracích! Pro nás je toto nemožné jak z technických, tak i z finančních důvodů. Protože se ale sérum využívá pro většinu analytů a stanovení v plazmě může vykazovat určitá specifika vzhledem k obsahu antikoagulačního činidla, tak se v rámci ČR v drtivé většině vyšetřuje PSA i fPSA v séru.

Aplikace mikroanalytických technologií DNA a proteomiky otevírá možnosti rozlišit pomalu rostoucí a agresivní nádory pomocí molekulárních „otisků“.

8 SEZNAM ZKRATEK

| | |
|------------|--|
| AKP | adenokarcinom prostaty |
| BHP | benigní hyperplazie prostaty |
| CaP | karcinom prostaty |
| COPA | Cancer Outlier Profile Analysis |
| DD3 | differential display code 3 |
| DRE | digitální rektální vyšetření |
| fPSA | volný prostatický specifický antigen |
| GRN-A | chromogranin A |
| hK | human kallikrein |
| HPC1 | hereditary prostate cancer 1 |
| IGF-1 | insulin-like growth factor |
| IGFBP-3 | insuline-like growth factor binding protein 3 |
| MAb | monoklonální protilátky |
| MCM-5 | minichromosome maintenance complex component 5 |
| PSA (tPSA) | prostatický specifický antigen |
| PSA-DT | PSA doubling time |
| PSA-V | PSA velocita |
| PSCA | prostatický antigen kmenových buněk |
| PSMA | prostata specifický membránový antigen |
| RT-PCR | polymerázová řetězová reakce s použitím reverzní transkriptázy |
| TERT | telomerázová reverzní transkriptáza |
| TMPRSS2 | trans membrane serine 2 protease |

9 SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

Obrázek č.1: Nákres prostaty (str.9)

Obrázek č.2: Dobře diferencovaný adenokarcinom prostaty (str.17)

Obrázek č.3: Špatně diferencovaný adenokarcinom prostaty (str.17)

Obrázek č.4: PSA isoformy (str.32)

Graf č.1: Incidence karcinomu prostaty v ČR – od roku 1977 do 2004 (str.23)

Graf č.2: Incidence a mortalita karcinomu prostaty v ČR – vývoj v čase (str.24)

Graf č.3: Incidence karcinomu prostaty v ČR – dle věku (str.24)

Graf č.4: Prevalence karcinomu prostaty a PSA (str.30)

Graf č.5: Lineární regrese PSA (sérum, plazma) (str.51)

Graf č.6: Lineární regrese fPSA (sérum, plazma) (str.51)

Graf č.7: Bland-Altmanův diferenční graf pro PSA (str.53)

Graf č.8: Bland-Altmanův diferenční graf pro fPSA (str.53)

Graf č.9: Bland-Altmanův diferenční graf pro PSA (se spojnicí trendu) (str.54)

Graf č.10: Bland-Altmanův diferenční graf pro fPSA (se spojnicí trendu) (str.54)

Tabulka č.3: Distribuce PSA v séru (str.26)

Tabulka č.2: Doporučované hodnoty PSA dle věku u nás (str.29)

Tabulka č.3: Věkově střední hodnoty doporučované v USA (str.31)

Tabulka č.4: Specificita a sensitivita při f/tPSA (str.34)

Tabulka č.5: Hodnoty PSA a fPSA v séru a plazmě (str.50)

10 LITERATURA

5 _____

1. Catalona, W. J., Loeb, S.: The PSA era is not over for prostate cancer. *Eur Urol* 2005; 48 (4): s541–545, převzato z: *Urologie pro praxi*, 2006, 5, 214-218

2. http://cs.wikipedia.org/wiki/Předstojná_žláza, dne 3.11.2007

3. Pacík, D.: Benigní prostatická hyperplazie. *Postgraduální medicína*, 2007, s546-548

4. Langeberg W. J., Isaacs W. B., Stanford J. L. Genetic etiology of hereditary prostate cancer. *Front. Biosci.*, 2007, 12, p. 4101 – 4110.

5. Štern, P., Vranovský, K.: Přednáška - Imunochemické markery benigní hyperplazie a karcinomu prostaty, Symposium klinické biochemie Pardubice (17.9.-19.9.2006) - <http://www.stapro.cz/fons/prednasky>

6. <http://www.prostata.nadory.cz>, autoři: Doc. MUDr. Ondřej Hes, PhD, Prof. MUDr. Michal Michal - Fakultní nemocnice Plzeň, Šiklův patologicko-anatomický ústav, dne 20.10.2007

7. Lukeš, M., Záleský, M., et al.: Molekulární genetika karcinomu prostaty, Galén, 2002, s12

8. <http://www.svod.cz>, dne 30.11.2007

9. Příbalový leták diagnostického setu PSA, Diagnostic Products Corporation 5700 West 96th Street Los Angeles CA 90045-5597 USA

10. Smith, G. D., Holly, J. *Brit. Med. J.* 321, 7 October 2000, s847

11. Catalona, W.J., et al.: Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *New Engl J Med* 1991, 324, 1156-61

12. Brawer, M.K., Lange, P.H.: Prostate-specific antigen: its role in early detection staging and monitoring prostatic carcinoma, *J Endocrinol* 1989, 3, 227-36

13. Stamey, T.A.: Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. In: Stamey TA editor. *Monographs in Urology*. Princeton NY: Medical Directions Publishing Co. Inc. 1989; 10(4), 50-64

14. Hornirger, W M.D., et al.: Screening for prostate cancer: updated experience from the Tyrol study, *Can J Urol* 2005; 12 (Suppl 1): s7–13, s92–93., převzato z: *Urologie pro praxi*, 2006, 5, 214-218

15. D'Amico, A.V., Chen, M.H., Roehl, K.A., Catalona, W.J.: Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med* 2004; 8, 351(2): s125–135. převzato z: *Urologie pro praxi*, 2006, 5, 214-218

16. Thomson, I.M., et al.: Prevalence of prostate cancer among men with prostatic specific antigen level < 4,0 ng per mililiter. *N Engl J Med* 2004; 27, 350(22): s2239–2246, převzato z: *Urologie pro praxi*, 2006, 5, 214-218

17. Loeb, S., et al.: Baseline PSA compared with median PSA for age group as predictor of pathologic tumor features in men < 60 years of age. AUA, San Antonio 2005: Abstract 533, převzato z: *Urologie pro praxi*, 2006, 5, 214-218

18. Total PSA and free PSA, Going straight for the answer – příručka Roche Diagnostics, Germany, r 2005 (www.roche-diagnostics.com)

19. Catalona, W. J., Smith, D. S., Wolfert, R. L. et al.: Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA*, 274, 1995, s1214-1220, převzato z: *Klinická onkologie*, 14, 2001, 4, 114 - 119

20. Smith, D. S., Catalona, W. J., Keetch, D. W.: Comparison of percent free PSA and PSA density as method to enhance the specificity of PSA screening. *J. Urol.*, 155, 1996, 422A, převzato z: *Klinická onkologie*, 14, 2001, 4, 114 - 119

21. Catalona, W. J., Partin, A. W., Slawin, K. M. et al.: Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease. A prospective multicenter clinical trial. *JAMA*, 279, 1998, s1542-1547, převzato z: *Klinická onkologie*, 14, 2001, 4, 114 - 119

22. Catalona, W. J., Partin, A. W., Finlay, J. A. et al.: Use of percentage of free prostate-specific antigen to identify men at high risk of prostate cancer when PSA levels are 2,51 to 4 ng/ml and digital rectal examination is not

suspicious for prostate cancer: an alternative model. *Urology*, 54, 1999, s220-224, převzato z: *Klinická onkologie*, 14, 2001, 4, 114 - 119

23. Oesterling, J. E., Jacobsen, S. J., Klee, G. G. et al.: Free, complexed and total serum prostate-specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J. Urol.*, 154, 1995, s1090-1095, převzato z: *Klinická onkologie*, 14, 2001, 4, 114 - 119

24. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/prostate.pdf, převzato z: *Urologie pro praxi*, 2006, 5, s214-218

25. Študent, V., Fiala, R. První výsledky studie Kapros v Olomouckém kraji. *Čes Urol* 2006; 1, s19–22, převzato z: *Urologie pro praxi*, 2006, 5, 214-218

26. Tomlins S. A., Rhodes D. R., Perner S. et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 2005, 310, p. 644 - 648.

27. Tomlins S. A., Mehra R., Rhodes D. R., Smith L. R. et al. TMPRSS2:ETV4 Gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res.*, 2006, 66, p. 3396 – 3400.

28. Cerveira N., Ribeiro F. R., Peixoto A. et al. TMPRSS2-ERG gene fusion Causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia*, 2006, 8, p. 826 – 832.

29. Henrique, R., Jeronimo, C. Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. *Eur. Urol.* 2004, 46, p. 660-669.

30. Nelson W. G., Yegnasubramanian S., Agoston A. T. et al. Abnormal DNA methylation, epigenetics, and prostate cancer. *Front. Biosci.*, 2007, 12, p. 4254 – 4266.

31. Li L. CH., Dyhiya R. Epigenetics of prostate cancer. *Front. Biosci.*, 2007, 12, p. 3377 – 3397.

32. Langeberg W. J., Isaacs W. B., Stanford J. L. Genetic etiology of hereditary prostate cancer. *Front. Biosci.*, 2007, 12, p. 4101 – 4110.

33. Tricoli, J. V., Schoenfeldt, M., Conley, B. A. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, p. 3943-3953.

34. BorgoZo, A., Iacovos, P. M., Diamandis, P. Human tissue kallikreins: physiological roles and applications in cancer. *Mol. Cancer Res.* 2004, 2, p. 257-280

35. Stenman, U. H., Abrahamsson, P. A., Aus, G. et al. Prognostic value of serum markers for prostate cancer. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.*, 2005, 216, p. 64-81

36. Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., O'Leary, J. Molecular pathology of prostate cancer. *J. Clin. Pathol.* 2005, 58, p. 673-684

37. Klecka, J., Hora, M., Pesta, M., Holubec, L., Topolcan, O., Eret, V.: DD3/PCA3 (differential display code 3) in prostate cancer diagnosis – first data from Czech Republic, *Urology*, Volume 70, Issue 3, 96-97

38. Olsson, C. A., de Vries, G. M., Buttyan, R., Katz, A. E.: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays for prostate cancer. *Urol. Clin. North. Am.*, 24, 1997, 367-378

39. Morgan T. M., Lange P. H., Vessella R. L. Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells. *Front. Biosci.*, 2007, 12, p. 3000 – 3009

40. Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., O'Leary, J. Molecular pathology of prostate cancer. *J. Clin. Pathol.* 2005, 58, p. 673-684.

41. Příbalový leták firmy DPC – Immulite 2000 PSA, fPSA