

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Význam biochemických markerů karcinómu prostaty v diagnostice malignity

Diplomová práce

2022

Bc. Natálie Šamajová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

The importance of biochemical markers of prostate cancer in the diagnosis
of malignancy

Diploma Thesis

2022

Bc. Natália Šamajová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Natália Šamajová**
Osobní číslo: **C20484**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Význam biochemických markerů karcinomu prostaty v diagnostice malignity**
Téma práce anglicky: **The Importance Of Biochemical Markers Of Prostate Cancer In The Diagnosis Of Malignancy**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Teoretická část bude obsahovat: karcinom prostaty, biochemické markery PSA, fPSA, neuron specifická enoláza (NSE), testosteron, PCA3, prostatická kyselá fosfatáza, metody stanovení. V literatuře zjistěte, zda byla doložena spojitost karcinomu prostaty s výskytem neuroendokrinních znaků, např. výskytem NSE.

Experimentální část:

Tato práce je zaměřená na stanovení markerů karcinomu prostaty PSA, fPSA, testosteron v séru pacientů a statistické zpracování dat. Na základě stanovení biochemických markerů a posouzení dalších parametrů (např. věk) je možné rozlišit nádory benigní a maligní, a vyloučit nutnost biopsie. Experimentální práce je prováděná na externím pracovišti – Kysucká nemocnice s poliklinikou v Čadci a bude obsahovat dílčí kroky:

1. Zpracování patientských vzorků.
2. Seznámení se laboratorními metodami.
3. Analýza zadaných parametrů ve vzorcích.
4. Zpracování výsledků včetně statistického.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy. Další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Ing. Danka Jurášková**
Kysucká nemocnice s poliklinikou Čadca
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prehlasujem:

Prácu s názvom „Význam biochemických markerov karcinómu prostaty v diagnostike malignity“ som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., o autorskom práve, o právach súvisiacich s autorským právom a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon) v znení neskorších predpisov, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 ods. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k užitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Zb., O vysokých školách a o zmene a doplnení niektorých zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernice Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidlá pre odovzdávanie, zverejňovanie a formálnu úpravu záverečných prác, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejňovaná prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 05. 05. 2022

Bc. Natália Šamajová v. r.

POĎAKOVANIE

Rada by som touto cestou poďakovala vedúcej diplomovej práce pani Mgr. Slovákové Marcele Ph.D. za poskytnutie rád pri spracovaní tejto práce. Predovšetkým by som sa chcela poďakovať aj konzultantke Ing. Juráškovej Danke, za ochotu, trpezlivosť, poznatky a čas, ktoré mi boli poskytnuté v priebehu celého vypracovania práce. Ďalej by som sa rada poďakovala Kysuckej nemocnici s poliklinikou v Čadci, v ktorej som mohla diplomovú prácu spracovávať. V poslednej rade taktiež ďakujem mojej rodine a priateľom, ktorí ma podporovali po celú dobu štúdia.

NÁZEV

Význam biochemických markerů karcinomu prostaty v diagnostice malignity

ANOTACE

Diplomová práce je zaměřena na význam biochemických markerů karcinomu prostaty a jejich diagnostice při stanovení malignity. V teoretické části, práce obsahuje popis prostaty a karcinomu prostaty, jeho příčiny vzniku a klasifikaci. Zabývá se biochemickými markery, které jsou charakteristicky stanovovány u karcinomu prostaty. Praktická část obsahuje postupy stanovení prostatického specifického antigenu, testosteronu a neuron specifickéj enolázy. Na základě stanovení těchto markerů a dalších parametrů, jako je volná frakce prostatického specifického antigenu a index zdravé prostaty, poukazuje na možnost rozlišení nádorů na benigní a maligní, s vyloučením nutnosti provedení biopsie. Zaměřuje se také na zjištění spojitosti mezi karcinomem prostaty s výskytem nových neuroendokrinních markerů.

KLÍČOVÁ SLOVA

biochemické markery, karcinóm prostaty, neurón specifická enoláza, prostata , prostatický specifický antigen, testosteron

NÁZOV

Význam biochemických markerov karcinómu prostaty v diagnostike malignity

ANOTÁCIA

Diplomová práca je zameraná na význam biochemických markerov karcinómu prostaty a ich diagnostike pri stanovení malignity. V teoretickej časti, práca obsahuje popis prostaty a karcinómu prostaty, jeho príčiny vzniku a klasifikáciu. Zaoberá sa biochemickými markermi, ktoré sú charakteristicky stanovované pri karcinóme prostaty. Praktická časť obsahuje postupy stanovenia prostatického špecifického antigénu, testosterónu a neurón špecifickej enolázy. Na základe stanovení týchto markerov a ďalších parametrov, ako je voľná frakcia prostatického špecifického antigénu a index zdravej prostaty, poukazuje na možnosť rozlíšenia nádorov na benígne a malígne, s vylúčením nutnosti vykonania biopsie. Zameriava sa aj na zistenie spojitosti medzi karcinómom prostaty s výskytom nových neuroendokrinných markerov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

biochemické markery, karcinóm prostaty, neurón špecifická enoláza, prostata, prostatický špecifický antigén, testosterón

TITLE

The importance of biochemical markers of prostate cancer in the diagnosis of malignancy

ANNOTATION

The diploma thesis is focused on the importance of biochemical markers of prostate cancer and their diagnosis in the determination of malignancy. The practical part contains a description of the prostate and prostate cancer, its causes and classification. It deals with biochemical markers that are determined in prostate cancer. The practical part contains specific procedures for the determination of prostate specific antigen, testosterone and neuron specific enolase. Based on the determination of these markers and other parameters, such as free fraction of prostate specific antigen and healthy prostate index, it points to the possibility of distinguishing between benign and malignant tumors, eliminating the need for a biopsy. It also focuses on the association between prostate cancer and the occurrence of new neuroendocrine markers.

KEYWORDS

biochemical markers, neuron specific enolase prostate, prostate cancer, prostate specific antigen, testosterone

OBSAH

OBSAH	10
ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK	12
ZOZNAM OBRÁZKOV	16
ZOZNAM TABULIEK	17
ZOZNAM GRAFOV	18
ÚVOD	19
1 TEORETICKÁ ČASŤ	20
1.1 Prostata	20
1.1.1 Anatómia prostaty	20
1.1.2 Karcinóm prostaty.....	21
1.1.3 Skríning karcinómu prostaty.....	25
1.2 Diagnostika karcinómu prostaty	26
1.2.1 Digitálne rektálne vyšetrenie	26
1.2.2 Bioptické vyšetrenie tkaniva prostaty	27
1.2.3 Transrektálne ultrasonografické vyšetrenie	29
1.3 Onkomarkery.....	30
1.3.1 Prostatický špecifický antigén	31
1.3.2 Prostatická kyslá fosfatáza.....	38
1.3.3 PCA3 marker	40
1.3.4 Testosterón.....	41
1.3.5 Neurón špecifická enoláza	42
1.4 Metódy stanovenia onkomarkerov	43
1.4.1 Imunoanalytické metódy.....	43
1.4.2 Rozdelenie imunoanalytických metódy	44
2 CIEĽ PRÁCE	56
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	57

3.1	Prístroje a vybavenie	57
3.1.1	Advia Centaur XPT	57
3.1.2	Kalibrácia Advia Centaur XPT	58
3.1.3	Analýza prostatického voľného antigénu a jeho voľnej frakcie	61
3.1.4	Access 2 Immunoassay system.....	65
3.1.5	Kalibrácia Acces 2 Immunoassay system.....	65
3.1.6	Analýza testosterónu	68
3.1.7	Cobas e 411	70
3.1.8	Kalibrácia Cobas e 411	70
3.1.9	Analýza neurón špecifickej enolázy	72
4	VÝSLEDKY	74
4.1	Metodika práce	74
4.2	Charakteristika súboru pacientov	75
4.3	Stanovenie hodnôt PSA na základe vekových skupín pacientov	75
4.4	Vylúčenie nutnosti biopsie	77
4.5	Receiver operating characteristic	81
4.6	Stanovenie súvislosti medzi karcinómom prostaty a NSE.....	83
4.7	Monitorovanie pacientov na hormonálnej liečbe	85
5	DISKUSIA	88
	ZÁVER	92
	CITÁCIA	94
	PRÍLOHY	103

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

ACPT	testikulárna kyslá fosfatáza (z angl. testicular acid phosphatase)
AKT	poroteínová kináza B (z angl. protein kinase B)
ALA	alanín
AR	androgénne receptory
ARG	arginín
AUC	plocha pod ROC krivkou (z angl. area under the curve)
BHP	benígna hyperplazia prostaty
CAG	telomerický genóm asociovaný s rakovinou (z angl. cancer-associated telomeric genome)
CaP	karcinóm prostaty
CEA	karcinoembryonálny antigén (z angl. carcinoembryonic antigen)
CLIA	chemiluminiscenčná imunoanalýza (z angl. chemiluminescent immunoassay)
CV	variačný koeficient
DELFLIA	fluorescenčná heterogénna imunoanalýza (z angl. dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay)
DHEA	dehydroepiandrosterón (z angl. dehydroepiandrosterone)
DHEA-S	dehydroepiandrosterón-sulfátu (z angl. dehydroepiandrosterone sulfate)
DHT	5-alfa-dihydrotestosterón (z angl. dihydrotestosterone)
DRE	digitálne rektálne vyšetrenie (z angl. digital rectal examination)
ECLIA	elektrochemiluminiscenčná imunoanalýza (z angl. electrochemiluminescence immunoassay)
EIA	enzýmová imunoanalýza (z angl. enzyme immunoassay)
ELISA	heterogénna enzymová imunoanalýza (z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay)

ERK	extracelulárny signál regulovanej kinázy (z angl. extracellular signal-regulated kinase)
FIA	fluorescenčná imunoanalýza (z angl. fluorescence immunoassay)
FITC	fluorescein-5- isothiokyanát (z angl. fluorescein isothiocyanate)
FPIA	fluorescenčná polarizačná imunoanalýza (z angl. fluorescence polarization immunoassay)
FPSA	voľný prostatatický špecifický antigén (z angl. free prostate specific antigen)
ILE	isoleucín
ILMA	imunoluminometrická analýza (z angl. immunoluminometric analysis)
IRMA	imunoradiometrická analýza (z angl. immunoradiometric analysis)
KLK	kalikrein
LEU	leucín
LH	luteinizačný hormón
LHRH	hormón uvoľňujúci luteinizačný hormón (z angl. luteinizing hormone releasing hormone)
LIA	luminiscenčná imunoanalýza (z angl. luminescent immunoassay)
LOH	hypogonadizmus s neskorým nástupom (z angl. late-onset hypogonadism)
LOCI	homogénna chemiluminiscencia založená na prenose kyslíka (z angl. luminescent oxygen channeling assay)
MAPK	mitogén aktivovanej proteínkinázy (z angl. mitogen activated protein kinase)
MRI	magnetická rezonancia (z angl. magnetic resonance imaging)
MpMRI	multiparametrická magnetická rezonancia (z angl. multi-parametric magnetic resonance imaging)
NSE	neurón špecifická enoláza (z angl. neuron specific enolase)
OPG	osteoprotegerín (z angl. osteoprotegerin)

PAP	prostatická špecifická kyslá fosfatáza (z angl. prostate specific acid phosphatase)
PCA3	prostatický karcinómový gén 3 (z angl. prostate cancer associated 3)
PI3K	signalizácia fosfatidylinozitol-3 kinázy (z angl. phosphoinositide 3-kinases)
PHI	index zdravej prostaty (z angl. prostate health index)
POD	peroxidáza (z angl. peroxidase)
PRO	Prolín
PreproPSA	jednoreťazový preproenzým prostatického špecifického antigénu (z angl. pre-pro precursor prostate specific antigen)
PSA	prostatický špecifický antigén (z angl. prostate specific antigen)
PSAD	PSA denzita (z angl. prostate specific antigen density)
PSADT	zdvojený čas PSA tranzitórnej zóny (z angl. prostate specific antigen doubling time)
PSAV	PSA velocita (z angl. prostate specific antigen velocity)
RANKL	receptorový aktivátor nukleárneho faktoru kappa B ligant (z angl. receptor activator of nuclear factor kappa B)
RIA	radioimunoanalýza (z angl. radioimmunoassay)
RLU	relatívna svetelná jednotka (z angl. relative light unit)
ROC	prevádzková charakteristika prijímača (z angl. receiver operating characteristic)
SD	smerodajná odchýlka
SER	serín
TPSA	celkový PSA (z angl. total prostate specific antigen)
TRACE	zosilnená homogénna fluorescenčná imunoanalýza (z angl. time resolved amplified cryptate emission)

TRITC	tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát (z angl. tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate)
TRT	testosterónová substitučná terapia (z angl. testosterone replacement therapy)
TRUS	trasnrektálna ultrasonografia (z angl. transrectal ultrasonography)

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Anatomické rozdelenie prostaty a okolitých štruktúr.....	21
Obrázok 2: Karcinóm prostaty	22
Obrázok 3: Schematický diagram Gleasonovho systému klasifikácie.....	24
Obrázok 4: Digitálne rektálne vyšetrenie prostaty	27
Obrázok 5: Rakovina prostaty (šípky) na farebnom Dopplerovi	29
Obrázok 6: Charakteristika lokusu kalikreínu a KLK3 génu	32
Obrázok 7: Molekulárne sérické formy PSA u mužov	34
Obrázok 8: Schematické znázornenie signalizácie ErbB-2 a androgénovej citlivosti regulovanej cPacP v bunkách CaP	39
Obrázok 9: Vylučovanie PCA3 vs. PSA.....	40
Obrázok 10: Kalibračné závislosti u kompetitívnych a nekompetitívnych metód.....	44
Obrázok 11: Princíp metódy - priama ELISA.....	47
Obrázok 12: Princíp metódy - nepriama ELISA	48
Obrázok 13: Princíp metódy - sendvičová ELISA	48
Obrázok 14: Princíp metódy - kompetitívna ELISA.....	49
Obrázok 15: Reakcia luminolu s peroxidom vodíka za katalýzy POD.....	50
Obrázok 16: Princíp metódy LOCI	52
Obrázok 17: Štruktúra tris(2,2-bipyridyl)ruthenia	52
Obrázok 18: Princíp reakcie ECLIA	53
Obrázok 19: Princíp metódy-RIA	54
Obrázok 20: Analyzátor Advia Centaur XPT	57
Obrázok 21: Schéma analyzátoru Advia Centaur XPT.....	58
Obrázok 22: Analyzátor Access 2 Immunoassay system	65
Obrázok 23: Analyzátor Cobas e 411	70

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: TNM klasifikácia systému	23
Tabuľka 2: Hodnoty PSA úmerné veku.....	36
Tabuľka 3: Pravdepodobnosť malignity na základe % fPSA	37
Tabuľka 4: Rozdelenie imunoanalytických metód	45
Tabuľka 5: Kalibračné hodnoty stanovenia PSA.....	59
Tabuľka 6: Hodnoty kalibrátorov pre stanovenie PSA.....	60
Tabuľka 7: Kalibračné hodnoty pre stanovenie fPSA	60
Tabuľka 8: Kalibrátory pre stanovenie fPSA.....	61
Tabuľka 9: Analytické parametre stanovenia PSA.....	61
Tabuľka 10: Reagencie analýzy PSA	62
Tabuľka 11: Riedenie pri analýze PSA.....	63
Tabuľka 12: Analytické parametre stanovenia fPSA.....	63
Tabuľka 13: Reagencie analýzy fPSA	64
Tabuľka 14: Kalibračná tabuľka pre stanovenie testosterónu.....	66
Tabuľka 15: Nepresnosť stanovenia Access immunoassay	68
Tabuľka 16: Analytické parametre stanovenia testosterónu	68
Tabuľka 17: Reagencie analýzy testosterónu	69
Tabuľka 18: Kalibračná tabuľka pre stanovenie NSE.....	73
Tabuľka 19: Kalibrátor pre stanovenie NSE.....	71
Tabuľka 20: Tabuľka presnosti analyzátora Cobas e 411.....	71
Tabuľka 21: Analytické parametre stanovenia NSE	72
Tabuľka 22: Reagencie analýzy NSE	72
Tabuľka 23: Riedenie pri analýze NSE	73
Tabuľka 24: Vek náhodne vybraných pacientov	76
Tabuľka 25: Hodnoty PSA náhodne vybraných pacientov	76
Tabuľka 26: Namerané hodnoty markerov na základe diagnózy	78
Tabuľka 27: Súhrn ROC analýz.....	82
Tabuľka 28: Distribúcia výsledkov podľa PHI a % fPSA pacientov s vykonanou biopsiou ...	83
Tabuľka 29: Namerané hodnoty NSE a PSA v jednotlivých skupinách	84

ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Distribúcia testosterónu v plazme zdravého muža	41
Graf 2: Kalibračná krivka PSA.....	59
Graf 3: Kalibračná krivka fPSA	60
Graf 4: Kalibračný graf testosterónu	67
Graf 5: Dvojbodová kalibrácia NSE.....	71
Graf 6: Rozdelenie pacientov podľa ochorenia na základe biopsie.....	77
Graf 7: Distribúcia ochorení po vykonanej biopsii na základe PHI	79
Graf 8: Krabicový graf pre tPSA	80
Graf 9: Krabicový graf pre PHI.....	79
Graf 10: Krabicový graf pre % fPSA	80
Graf 11: ROC analýza PHI	81
Graf 12: ROC analýza PSA.....	81
Graf 13: ROC analýza % fPSA	82
Graf 14: Porovnanie ROC analýz PHI, PSA a % fPSA	82
Graf 15: Závislosť PSA na NSE	84
Graf 16: Distribúcia hodnôt NSE v závislosti od ochorenia.....	85
Graf 17: Rozvoj CaP u pacienta XY.....	86
Graf 18: Rozvoj CaP u pacienta XZ	86

ÚVOD

Karcinóm prostaty (CaP) je zhubné ochorenie predstojnej žľazy (prostaty), ktoré je považované za jeden z hlavných medicínskych problémov mužskej populácie. CaP tvorí až 11 % všetkých nádorových ochorení u mužov v Európe. V 9 % sa CaP stáva príčinou úmrtia mužov v Európskej únii na zhubný nádor.

CaP oveľa častejšie postihuje mužov starších ako 70 rokov. Ročne sa na Slovensku zistí 1600 až 1800 nových prípadov a 500-600 mužov za rok na toto ochorenie umiera. Odhaduje sa, že v súčasnosti žije na Slovensku 11 000 pacientov s CaP a približne 10 % je v pokročilom štádiu.

Medzi faktory ovplyvňujúce karcinóm prostaty zaraďujeme vek, genetické predispozície, rasové faktory alebo hormonálne vplyvy. Nádor postihuje najmä starších mužov a so zvyšujúcim vekom jeho incidencia stúpa.

Základ diagnostiky CaP zahŕňa digitálne rektálne vyšetrenie (DRE), stanovenie prostatického špecifického antigénu (PSA) v krvi pacienta a odber vzorky prostatického tkaniva na histologické vyšetrenie. Vyššiu hladinu PSA je možné detegovať aj v prípade benígnej hyperplázie prostaty či zápalovom procese, čo je limitujúce pri rozhodovacom procese k indikácii biopsie. V súčasnej dobe je viac než 75 % biopsií vykonaných zbytočne. Pre presné určenie diagnózy sa vyšetrujú aj doplnkové markery ako je voľná frakcia PSA (fPSA) alebo index zdravej prostaty (PHI).

Cieľom tejto práce bolo stanoviť z náhodne vybratých pacientov hodnoty PSA a predikovať CaP. PSA ale nedáva spoľahlivú citlivosť, preto boli stanovené aj markery odvodené od PSA (fPSA, % fPSA, PHI). Na základe vyhodnotenia celkového profilu pacientov, ktorí podstúpili biopsiu bolo zisťované, či boli všetky vykonané biopsie nutné. V práci bola porovnaná diagnostická účinnosť testov, ktoré sa používajú v klinickej praxi na určenie diagnózy. V poslednej dobe je zmieňovaný ako nový možný marker pre stanovenie CaP neurón špecifická enoláza, preto sa táto práca zaoberala aj jej spojitosťou pri stanovení CaP.

1 TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 Prostata

Prostata alebo predstojná žľaza o veľkosti vlašského orechu a objeme cca 20 ml, obklopuje hornú časť močovej trubice. Vede močovú trubicu z močového mechúra do penisu. Umiestnená je tesne pod hrdlom močového mechúra a svojou zadnou časťou je priláhaná na stenu konečníka [1].

Má dôležitú úlohu v mužskom reprodukčnom systéme, kde tvorí prostatický sekret, ktorý je súčasťou ejakulátu a uľahčuje oplodnenie, transport a prežitie spermií. V dobe orgazmu a ejakulácie sa prostatický sekret a tekutina zo semenných vačkov dostávajú do močovej trubice a tvoria semeno [2].

Normálny rast ale aj správna funkcia, či ochorenia prostaty závisia od prítomnosti testosterónu. Zväčšená prostata môže spôsobovať vo vyššom veku problémy s močením a teda *hyperplaziu prostaty*. Medzi ďalšie časté ochorenia patria zápaly prostaty a CaP [1, 2, 3].

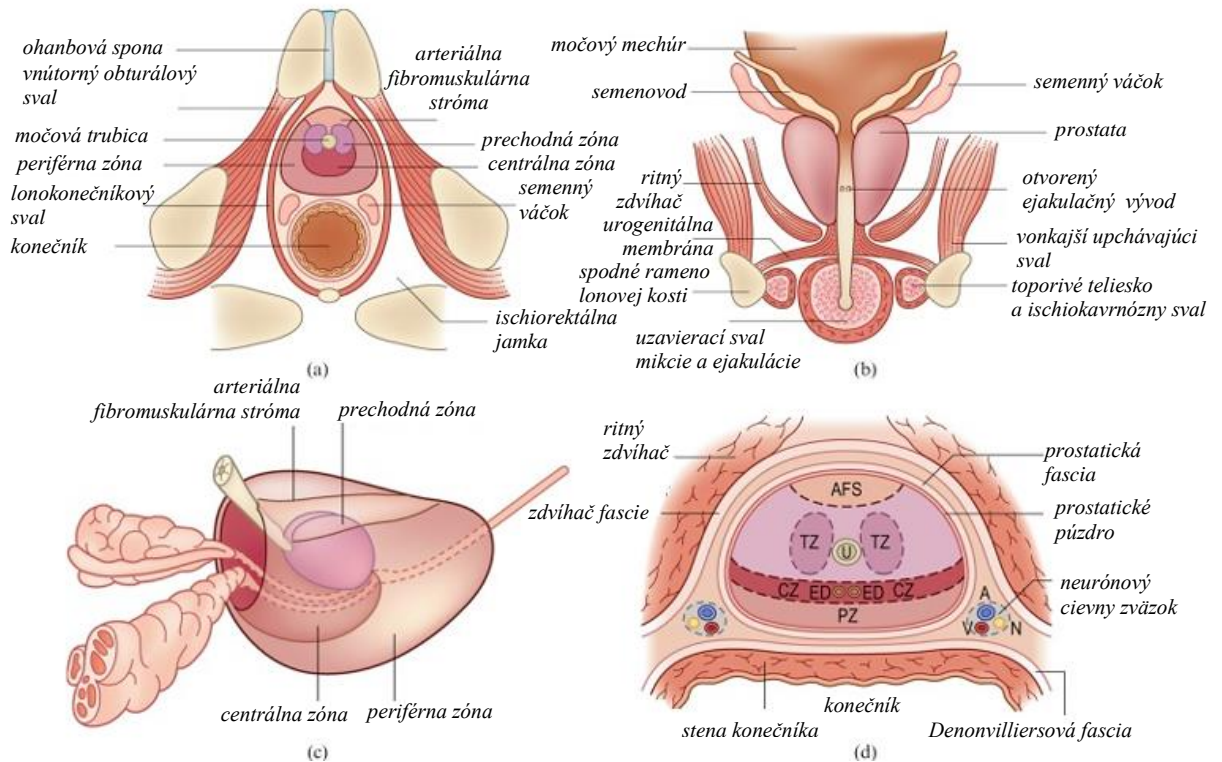
1.1.1 Anatómia prostaty

Prostata je 4 cm široká a 3,5 cm vysoká s hmotnosťou okolo 8 g. Delí sa na niekoľko anatomických oblastí. Rozlišujeme bázu, hrot, prednú plochu, zadnú plochu (*obr. č.1*). Báza (*basis prostatae*) prilieha k močovému mechúru. Hrot (*apex prostatae*) smeruje ventrokaudálne s dosahom až k svalom panvového dna (*diafragma urogenitale*). Zadná plocha (*facies posterior*) je otočená k rektu, cez ktorého stenu je prostata hmatateľná [1].

Uložená je pod močovým mechúrom. V prednej časti sa nachádza štrbina medzi močovým mechúrom a brušnou stenou a v zadnej časti sa nachádza väzivové septum. Blízko bázy prostaty, na hornom okraji sa nachádza preliačina, do ktorej vstupujú vypudzovacie kanáliky. Pomocou týchto kanálikov je prostata delená na kraniálny úsek tzv. stredný lalok prostaty (*lobus medius*) a kaudálny úsek. Celý povrch prostaty je pokrytý tenkým väzivovým puzdrom (*capsula propria*), na ktoré nadväzujú fibromuskulárne septa [3].

Koncový úsek zadnej časti prostaty je septom rozdelený na dva laloky. Smerom k vonkajšej časti väzivového puzdra sa nachádza žilový pletenec. Prostata je zložená z 20 až 30 drobných tubuloalveolárných žliaz, ktoré sú členené na zóny. Periurethrálna zóna je tesne okolo uretry a obsahuje slizničné žľazy. Vnútoraná zóna leží za periurethrálnou zónou

a obsahuje submukózne žľazy. Vonkajšia zóna obsahuje hlavné žľazy a obomkú vnútornú zónu. Spojenie vývodov žliaz prostaty je v 12-20 žľazovom vývode ústiace do uretry. Žľazy spoločne tvoria sekrét, ktorý neutralizuje kyslú reakciu sliznice pošvy [4].



Obrázok 1: Anatomické rozdelenie prostaty a okolitých štruktúr [25]

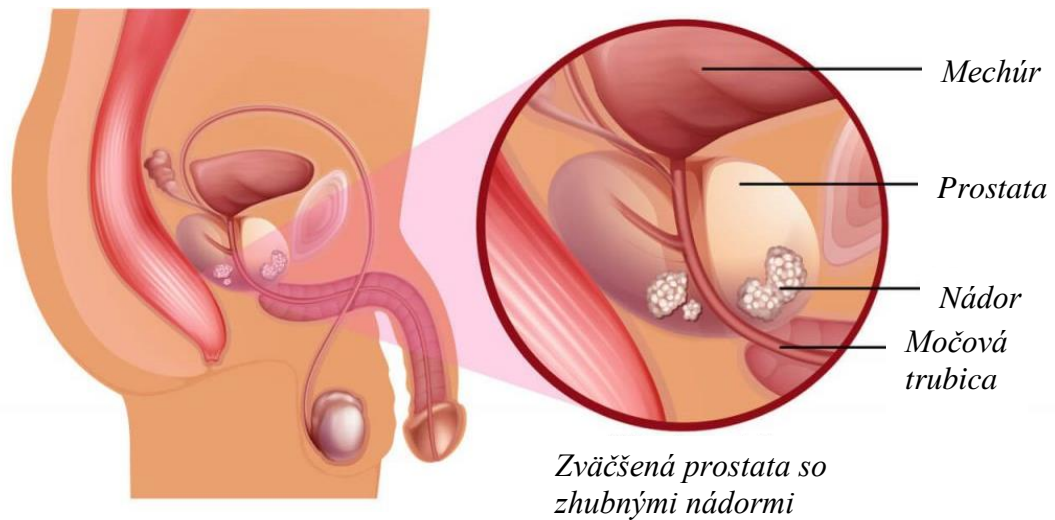
(a, b) Axialný a koronálny pohľad na prostatu a jej úzke anatomické vzťahy, (c) Zonálny model prostaty, (d) Fasciálne roviny okolo prostaty. A-tepna; AFS-predná fibromuskulárna stróma; CZ-centrálnej zóna; ED-ejakulačný vývod; N-nerv; PZ-periférnej zóna, TZ-prechodová zóna; U-močová trubica; V-žila

1.1.2 Karcinóm prostaty

Väčšiu časť malígnych nádorov prostaty tvorí karcinóm (obr. č.2). Histopatologické vyšetrenie zistí v 95 % adenokarcinóm, ktorý vzniká v periférnej časti žľazy a preto najmä v prvopočiatočnom štádiu karcinóm nemusí spôsobiť subjektívne problémy [5].

Benígna prostatická hyperplázia (BHP), nezhubné zväčšenie, vzniká v prechodnej zóne prostaty. Rast adenokarcinómu je ovplyvnený mužskými pohlavnými hormónmi (androgénmi). Dôležitý je najmä testosterón, ktorý je základným hormónom pre replikáciu prostatických buniek. Testosterón sa premieňa 5 α -reduktázou na dihydrotestosterón, ten sa naväzuje na špecifické androgénne receptory, čím sa iniciuje kaskádu dejov, pri ktorých dochádza k replikácií prostatickej nádorovej bunky a progresiu ochorenia.

Prostatická inraepiteliálna neoplázia je prekancerózou, pre ktorú je charakteristickým diagnostickým prekursorom produkcia prostatického špecifického antigénu, ktorého vyššie plazmatické hodnoty predstavujú vyšší objem žľazy či prítomnosť adenokarcinómu [6, 7].



Obrázok 2: Karcinóm prostaty [94]

Príčiny vzniku karcinómu prostaty

V súčasnosti nie je etiológia ochorenia karcinómu prostaty úplne jasná. Ochorenie je spôsobené multifaktoriálnym mechanizmom, čo zapríčiňuje, že štúdie, ktoré boli doposiaľ vykonané, nedokázali odhaliť špecifický onkogénny faktor. CaP ovplyvňuje rodinná anamnéza, kde bolo preukázané, že riziko výskytu sa zvyšuje u mužov, v ktorých rodinách sa toto ochorenie nachádzalo. Pri pozitívnej rodinnej anamnéze je výskyt karcinómu 2-3x vyšší [8].

Ďalší faktor pôsobiaci nepriaznivo sú rasové vplyvy. Bolo jednoznačne identifikované, že najväčšiu početnosť výskytu CaP na svete majú Afroameričania. Riziko u tejto rasovej skupiny sa zvyšuje takmer 2x než u bielych Američanov. Vývoj CaP u Afroameričana je omnoho skôr, je agresívnejší s väčším množstvom metastáz. Taktiež pri tejto skupine sa objavuje vyššia hladina PSA ako aj vyššia hladina denzity a vyššia hladina vekového špecifického PSA. Tieto rozdiely sú pravdepodobne spôsobené stravou, životným štýlom, prostredím a genetickými faktormi. Taktiež bolo preukázané, že riziko vzniku CaP sa zvyšuje s vekom [8, 9].

Klasifikácia karcinómu prostaty

Podľa primárne biologického správania rozdeľujeme nádory na karcinómy, sarkómy, mezoteliómy, nádory zo zárodočných buniek a nádory z nezárodočných buniek s embryonálnou diferenciáciou.

V súčasnosti je medzinárodne všetkými výbormi platný a prijatý *AJCC Cancer Staging Manual* v 7. vydaní. Podkladom je popis rozsahu primárneho nádoru (**T**), postihnutie alebo neprítomnosť metastáz v regionálnych lymfatických uzlinách (**N**) a popis vzdialených metastáz (**M**). Klasifikácia je označená ako **TNM** alebo c **TNM** a slúži k rozhodovaniu spôsobu liečby [10].

Na základe anatomického rozsahu ochorenia je v **TNM** systéme rozsah nádoru určený tromi parametrami, ktoré sú uvedené v *tab. č.1*.

Tabuľka 1: TNM klasifikácia systému [10]

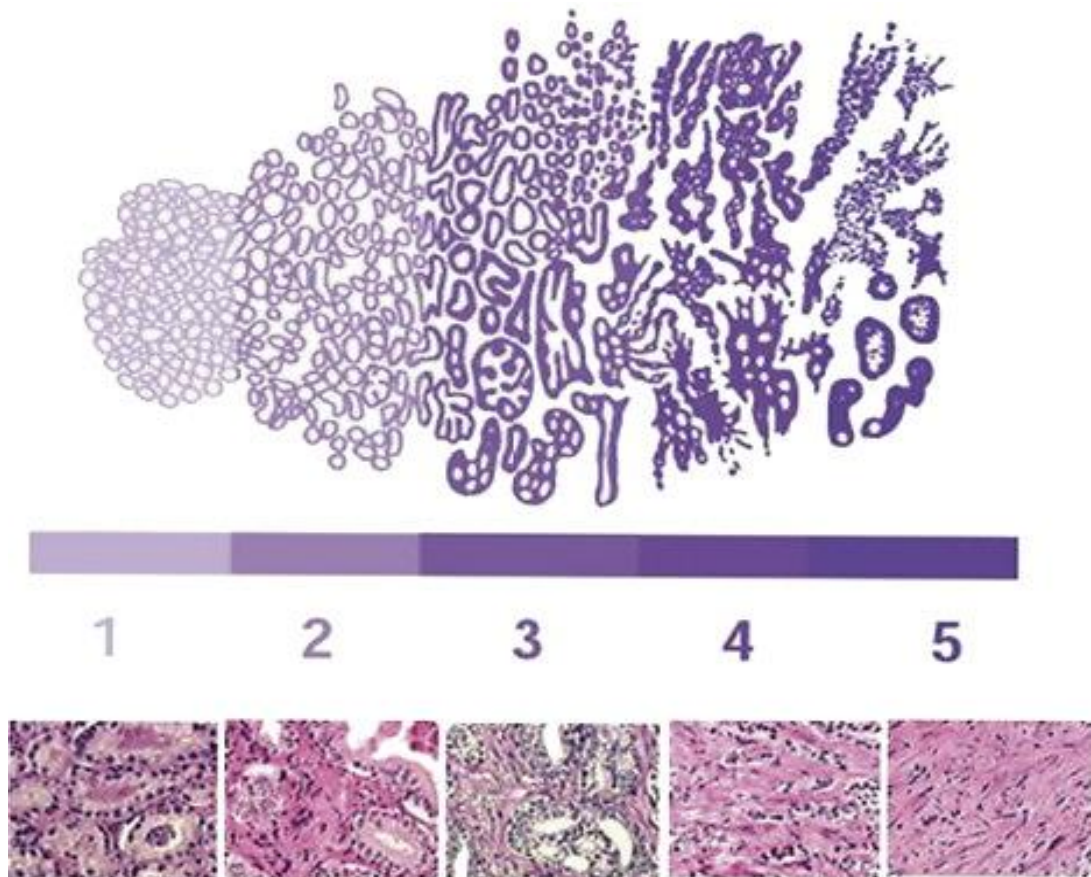
	<i>T rozsah primárneho nádoru</i>		<i>N regionálne postihnutie uzlín</i>		<i>M vzdialené metastázy</i>
TX	primárny nádor nehodnotiteľný	NX	regionálne uzliny nehodnotiteľne	MX	vzdialené metastázy nehodnotiteľne
T0	bez známok primárneho nádoru	N0	regionálne uzliny bez postihnutia	M0	bez vzdialených metastáz
TIS	karcinóm <i>in situ</i>			M1	vzdialené metastázy prítomne

Pri vyšetrení sentinelovej uzliny (najbližšia regionálna uzlina, ktorá naznačuje, že aj uzliny za ňou, môžu byť postihnuté nádorom) je označovaná ako **pNX(sn)**-nehodnotiteľná, **pN(sn)**-bez nálezu, **pN1**-pozitívny nález v sentinelovej uzline.

Rozsah postihnutia regionálnych uzlín popisuje označenie **N1**, **N2**, **N3**. Uzlínovou metastázou sa rozumie priame šírenie nádoru do uzliny, metastázy v iných ako regionálnych uzlinách sa považujú za vzdialené metastázy [11].

Gleasonovo skóre

Gleasonov systém na klasifikáciu rakoviny prostaty prideluje skóre na základe najrozšírenejšieho a druhého najrozšírenejšieho stupňa (*obr. č.3*). Hodnotí agresivitu nádoru a určuje prognózu pacienta. Potrebné sú bioptické preparáty tkaniva prostaty, ktoré sa hodnotia číslom 1-5, podľa stupňa ich vyzretosti. Čím sú bunky nádoru diferencovanejšie a podobné zdravému tkanivu, tým sú menej nebezpečné a majú nižšie číslo. Čím je nádor menej diferencovaný, tým je agresívnejší a aktívnejšie sa šíri do okolitého zdravého tkaniva, má vyššie číslo. Zistením dvoch typov najčastejšieho nádorového tkaniva z rôznych miest sa pridelené čísla sčítajú a výsledok je najčastejšie 6-10 bodov, kde 6 bodov má karcinóm nízkeho stupňa, 7 bodov karcinóm stredného stupňa, 8-10 bodov karcinóm vysokého stupňa. Nízke Gleasonovo skóre (< 6) svedčí o indolentnejšej malignancii s dobrou prognózou, zatiaľ čo vysoké Gleasonovo skóre (> 8) je spojené s agresívnym biologickým správaním a zvýšeným rizikom okultného systémového ochorenia [11, 12].



Obrázok 3: Schematický diagram Gleasonovho systému klasifikácie [12]

Štádia karcinómu prostaty

- 1) *lokalizovaný karcinóm prostaty*, rakovina je obmedzená na prostatickú žľazu
- 2) *lokálne pokročilý karcinóm prostaty* prekročil hranice prostaty, ale nie sú prítomné metastázy
- 3) *diseminovaný (metastatický) karcinóm prostaty* s metastázami najmä v lymfatických uzlinách, v kostiach ale aj v pečeni, pľúcach a mozgu
- 4) *kastračne (hormonálne) rezistentný karcinóm prostaty* sa zhoršuje aj napriek kastráčnym hladinám testosterónu, dosiahnutých hormonálnou liečbou pokročilého ochorenia

Včasné štádium CaP je bezpríznakové (asymptomatické). Prítomnosť príznakov znamená lokálne pokročilé alebo metastatické štádium.

Príznaky:

- 1) *štádium (lokalizovaný CaP)*: môže byť bez príznakov, poprípade sú prítomné poruchy močenia a zvýšená hladina PSA
- 2) *štádium (lokálne pokročilý CaP)*: môže byť prítomný krvavý moč, poruchy močenia, bolesť v podbrušku a na hrádzi, poruchy potencie (erektilná dysfunkcia), nedobrovoľný únik moču, bolesti v oblasti obličiek, príznaky zlyhávania obličiek (slabosť, vracanie), prítomnosť krvi v ejakuláte, bolesti v oblasti konečníka
- 3) *štádium (metastatický CaP)*: kostná bolesť, príznaky pripomínajúce zápal sedacieho nervu, ochrnutie, bolesti v bokoch, nemožno močiť, zväčšenie lymfatických uzlín, letargia, apatia, strata hmotnosti a celkové vyčerpanie, krvácanie do kože alebo zažívacieho traktu [13].

1.1.3 Skrining karcinómu prostaty

CaP diagnostikovaný klinicky na základe príznakov je už lokálne pokročilý alebo až metastázujúci a väčšinou sa nedá kuratívne liečiť. Liečba je paliatívna a prognóza zlá. Na vyhľadávanie pacientov s karcinómom prostaty v asymptomatickej (bezpríznakovej) populácii odporučili *American Cancer Society* a *American Urological Association* v roku 1993 robiť skrining karcinómu prostaty nasledovne:

- Muži vo veku nad 50 rokov by sa mali každoročne podrobiť vyšetreniam na dôkaz karcinómu prostaty. Malo by sa urobiť rektálne vyšetrenie (DRE), vyšetrenie sérových hladín prostatického špecifického antigénu a pri patologických nálezoch by sa mala urobiť aj transrektálna ultrasonografia.
- Na Slovensku je možnosť absolvovať každé tri roky preventívnu prehliadku u svojho urológa.

CaP má dlhú predklinickú fázu, čo umožňuje jeho diagnózu v skriningovom programe. Podstatný prognostický význam, v klinickej praxi má vyšetrenie hladiny tumor markerov, najmä PSA. Primárnym cieľom skriningu je zníženie mortality na dané ochorenie, pri udržaní plnohodnotnej kvality života, ako pred diagnostikovaním ochorenia. Sekundárnym cieľom je záchyt väčšieho množstva skorých a menšieho množstva počtu pokročilých štádií a zmapovanie výskytu ochorenia jeho štádia v určitom regióne [1, 14].

1.2 Diagnostika karcinómu prostaty

Diagnóza CaP sa stanovuje na základe vyhodnotenia anamnézy a:

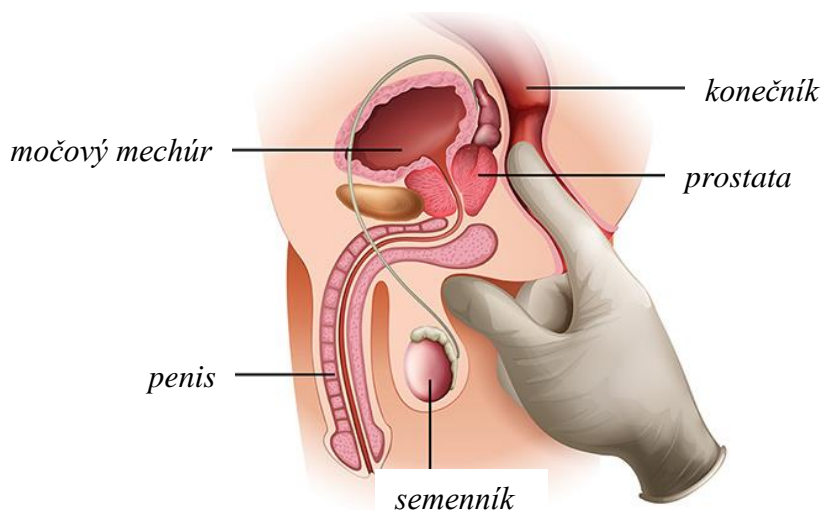
- digitálneho rektálneho vyšetrenia (DRE) *per rectum*,
- stanovenia hodnoty prostatického špecifického antigénu (PSA), prípadne jeho voľnej frakcie (fPSA) v krvi pacienta,
- bioptického vyšetrenia vzorku tkaniva prostaty (robí sa cez konečník s využitím ultrasonografie),

1.2.1 Digitálne rektálne vyšetrenie

DRE patrí medzi najčastejšie aplikované vyšetrenia, kedy nádor môže byť dosiahnuteľný pohmatom a prostata je zväčšená, asymetrická, so stratou ohraničenia a s ložiskovou alebo difúznou tuhou konzistenciou. Zdravá prostata je pri tomto type vyšetrenia elastická, symetrická, hladká, ohraničená a bez známkov zväčšenia. Toto vyšetrenie je obmedzené na dorzálnu časť prostaty, kde sa nachádza periférna zóna prostaty v ktorej sa najčastejšie nachádza CaP až 90% (*obr. č.4*).

Vyšetrenie pokračuje stanovením sérovej hladiny prostatického špecifického antigénu PSA a pri zvýšených hodnotách PSA sa dopĺňa aj stanovenie voľnej frakcie fPSA a vypočíta sa pomer fPSA/PSA [15].

Okrem týchto metód sa používajú ďalšie zobrazovacie postupy na stanovenie rozsahu ochorenia. Sú to najmä transrektálna ultrasonografia (TRUS), výpočtová tomografia, magnetická rezonancia, radioizotopové vyšetrenie a pozitronová emisná tomografia [15, 16].



Obrázok 4: Digitálne rektálne vyšetrenie prostaty [93]

1.2.2 Bioptické vyšetrenie tkaniva prostaty

Včasná detekcia je rozhodujúca pre dobrú liečbu pacientov s rakovinou prostaty. Markery na detekciu, ako je PSA a biopsia prostaty, sú rozhodujúce pre stanovenie účinnej diagnózy. Biopsia prostaty je zlatým štandardom diagnostickej techniky na detekciu CaP. Výber pacientov na biopsiu je zložitý a je ovplyvnený novým používaním prebiptického zobrazovania [17].

Urológ môže nariadiť biopsiu, ak je hladina PSA v krvi vyššia ako 4,0 ng/ml alebo ak sa počas DRE nájde abnormálna hrčka. Niektorí výskumníci však obhajujú biopsiu prostaty u mužov s hodnotou PSA v rozmedzí 2,5 až 4,0 ng/ml, v presvedčení, že použitie tohto parametra vedie k odhaleniu väčšieho počtu prípadov liečiteľného ochorenia. Ďalšou možnosťou pred biopsiou je ultrazvuk, kde namiesto prsta pri DRE vyšetrení sa zavedie malá sonda na fotenie prostaty [18].

Biopsia prostaty riadená magnetickou rezonanciou (MRI) sa môže použiť u pacientov, ktorí majú stúpajúcu hladinu PSA, ale negatívnu biopsiu riadenú ultrazvukom.

Akonáhle sa lekár rozhodne urobiť biopsiu prostaty, je to 10-minútový postup. Zavedú ihlu cez stenu konečníka až do prostaty, aby extrahovali bunky na testovanie. V niektorých prípadoch robia biopsiu vložением ihly cez kožu medzi miešok a konečník [19].

1) Priama biopsia

Priama biopsia riadená MRI zahŕňa získanie počiatkových údajov o lokalizácii multiparametrickej MRI (mpMRI) na opis oblastí s vysokým podozrením na nádor. Tento súbor údajov sa potom mapuje na anatomický sken, získaný tesne pred biopsiou. Oblasti podozrenia na nádor sú ciele na biopsiu pomocou nemagnetickej bioptickej ihly. Po umiestnení ihly do prostaty sa získajú rýchle snímky na určenie presného podania. Ukázalo sa, že tento prístup je účinný pri detekcii klinicky významnej rakoviny u pacientov so stúpajúcim PSA a predchádzajúcou negatívnou TRUS biopsiou [19].

Quentin *a kol.* porovnal biopsiu z vpichu so štandardnou biopsiou TRUS a preukázal vyššie percento postihnutia rakovinou na jadro s výrazne menším počtom požadovaných jadier [20]. Hoci výhody tejto techniky sú jasné, existuje niekoľko dôležitých nevýhod. Vnútorňa biopsia si vyžaduje značné počiatkové investície do zariadenia na biopsiu kompatibilnú s MR. Okrem toho koordinácia medzi urológiou, rádiológiou a anestéziológiou pridáva logistické komplikácie a ťažkosti s plánovaním, vďaka čomu je táto technika biopsie v modernej praxi o niečo menej bežná [21].

2) Fúzna biopsia

Fúzna biopsia MRI-TRUS bola navrhnutá tak, aby umožňovala odber biopsií v ordinácii, na rozdiel od priamej biopsie riadenej MRI. Zahŕňa použitie rôznych softvérových platforiem na integráciu údajov MRI do ultrazvuku na presnejšiu biopsiu. MRI-fúzne biopsie sa ukázali ako účinnejšie pri detekcii klinicky významného CaP v porovnaní so štandardnou systematickou biopsiou [19].

Valerio *a kol.* urobili metaanalýzu na vyhodnotenie miery detekcie rakoviny (CDR) fúzie MRI oproti štandardnej sextantovej biopsii. Zistili 30 % CDR s fúznou biopsiou na jadro oproti 7 % so štandardnou biopsiou na jadro [22]. Nevýhody spojené s touto metódou spočívajú v tom, že vyžaduje špecializované školenie operátora a vyžaduje použitie prídavného zariadenia [23].

Kognitívna fúzna biopsia

Kognitívna fúzna biopsia je najjednoduchšia technika na začlenenie údajov mpMRI do biopsie prostaty. Pacienti, ktorí potrebujú vyšetrenie rakoviny prostaty, podstupujú mpMRI ako pri iných technikách riadených MRI a identifikujú sa požadované lézie. Operátor

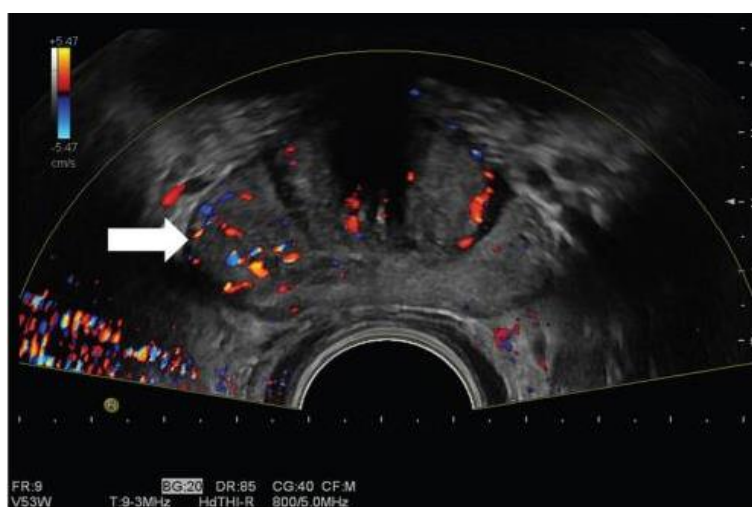
manuálne zacieli tieto lézie počas TRUS biopsie pomocou anatomických orientačných bodov viditeľných na ultrazvuku s odkazom na mpMRI sken [19].

Sciarra et al. študovali techniku kongitívnej fúznej biopsie, pre pacientov s trvalo zvýšeným PSA a negatívnou TRUS biopsiou. Zistili signifikantne lepšiu CDR s kognitívnou fúznou biopsiou v porovnaní so saturačnou biopsiou (45,5 oproti 24,4 %) [24].

Metóda fúznej biopsie je jednoduchá, rýchla, menej nákladná so zvýšenou presnosťou v porovnaní s konvenčnou systémovou biopsiou. Medzi nevýhody patrí veľká závislosť od technických schopností operátora a predpokladanej zníženej presnosti pre malé lézie [19].

1.2.3 Transrektálne ultrasonografické vyšetrenie

Transrektálne ultrasonografické vyšetrenie (TRUS) je v súčasnej dobe dostupná, cenovo nenáročná a presná zobrazovacia technika CaP. Veľmi podrobné a komplexné hodnotenie patologických zmien vnútorných mužských pohlavných orgánov umožňuje vysoké rozlíšenie spolu so zobrazením v dvoch rovinách s ďalšími možnosťami ako farebné Dopplerovské mapovanie, sonoelastografia, histoscanning a iné (*obr. č.5*) [25, 26].



Obrázok 5: Rakovina prostaty (šípky) na farebnom Dopplerovi [25]

Na vyšetrenie sa zvyčajne používajú sondy s vysokou frekvenciou okolo 7,5-12MHz s oblým kryštálom, ktorý umožňuje výseku 112-140°. Kryštály, zložené z 128-196 elementov, sú umiestnené na konci sondy s osou rovnobežnou so sondou alebo os kryštálov zoviera uhol 30-45°. Sonda obsahuje kanál alebo je k nej pripevnený nadstavec pre biopsiu [26].

1.3 Onkomarkery

Nádorové markery sú laboratórne stanoviteľné látky, ktoré sú prítomné v organizme v dôsledku vzniku a vývoja malígneho procesu. Nádorové markery zahŕňajú široké spektrum produktov patologicky zmenených tkanív. Sú dokázateľné v krvi a iných telesných tekutinách (humorálne nádorové markery) alebo v tkanivách (tkanivové nádorové markery). Ich prítomnosť a koncentrácia sa určuje najčastejšie imunochemickými metódami. Delíme ich na markery bunkových adhézií, cytokeratínové markery, enzýmové markery, hormonálne markery a markery združené s imunokompetentnými a transportnými procesmi. Nádorové markery možno v klinickej praxi využiť na tieto účely: skríning malignity, diagnostika malignity, určenie prognózy, sledovanie účinnosti liečby, sledovanie pacientov v remisií. V ideálnom prípade by nádorové markery mali byť vysoko citlivé, špecifické a spoľahlivé s vysokou prognostickou hodnotou a orgánovou špecifickosťou [27].

V súčasnosti používané biomarkery sú definované ako prognostické a prediktívne. Prognostické markery majú za cieľ objektívne zhodnotiť celkový výsledok pacienta, ako je pravdepodobnosť recidívy rakoviny po štandardnej liečbe. Prítomnosť alebo absencia prognostického markera môže byť užitočná pri výbere pacientov na liečbu, ale priamo nepredpovedá odpoveď na liečbu. Prediktívne markery sa zameriavajú na objektívne vyhodnotenie pravdepodobnosti prínosu konkrétnej klinickej intervencie alebo na rozdielne výsledky dvoch alebo viacerých intervencií vrátane toxicity [28].

Existujú dva hlavné typy nádorových markerov:

- 1) *cirkulujúce nádorové markery*
- 2) *markery nádorového tkaniva*

Cirkulujúce nádorové markery možno nájsť v krvi, moči, stolici alebo iných telesných tekutinách pacientov s karcinómom. Medzi využitie cirkulujúcich nádorových markerov patrí odhadnutie prognózy, určenie štádia karcinómu, odhalenie reziduálneho ochorenia, posúdenie aplikovanej liečby [29, 30].

Hoci zvýšená hladina cirkulujúceho nádorového markera môže naznačovať prítomnosť malignity a dopomôcť pri diagnostike karcinómu, to samo o sebe na diagnostiku rakoviny nestačí. Benígne stavy môžu taktiež spôsobiť zvýšenie hladín určitých nádorových markerov, preto sa merania cirkulujúcich nádorových markerov zvyčajne kombinujú s výsledkami iných testov, ako je biopsia alebo zobrazovacie metódy, pre lepšiu diagnostiku rakoviny. Zníženie

hladiny cirkulujúceho nádorového markera môže značiť, že rakovina reaguje na liečbu, zatiaľ čo zvýšená alebo nezmenená hladina môže naznačovať, že rakovina nereaguje. Cirkulujúce nádorové markery sa merajú pravidelne po ukončení liečby, aby sa skontrolovala recidíva [31].

Markery nádorového tkaniva (alebo buniek) sa nachádzajú v samotných skutočných nádoroch, typicky vo vzorke nádoru, ktorá sa odstráni počas biopsie. Markery nádorového tkaniva sa používajú na diagnostiku štádia alebo klasifikácie karcinómu, odhadnutie prognózy, zvolenie vhodnej liečby (napr. liečba cieľovou terapiou).

Keďže niektoré nádory vylučujú bunky a genetický materiál do krvi, niekedy je možné skúmať biomarkery vo vzorkách krvi. Hoci sa tieto „*tekuté biopsie*“ ešte bežne nepoužívajú, majú niekoľko potenciálnych výhod, pretože nezahŕňajú operáciu, môžu sa robiť častejšie ako štandardné biopsie. Môžu sa vykonávať aj vtedy, keď chirurgické biopsie nie je možné vykonať, napr. keď je ťažké dosiahnuť nádory alebo pacienti nechcú podstúpiť operáciu [30].

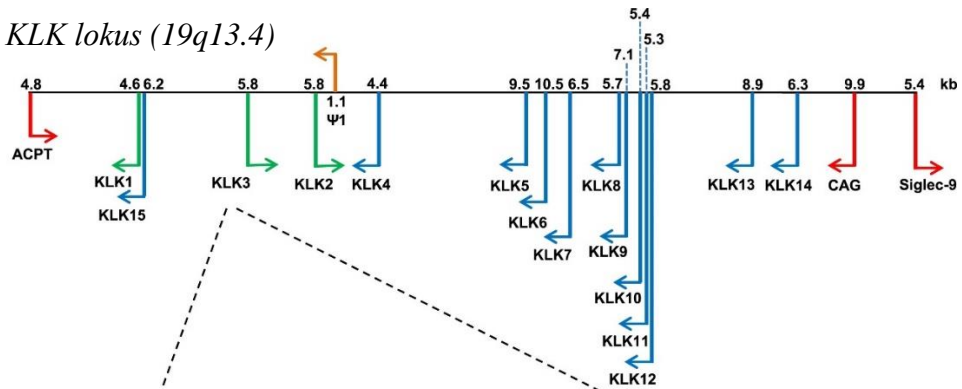
1.3.1 Prostatický špecifický antigén

PSA je najvýznamnejším nádorovým markerom v diagnostike CaP. Hoci nie je ideálnym nádorovým markerom, ale jeho citlivosť výrazne prevyšuje ostatné diagnostické vyšetrenia. Bol objavený v roku 1969, izolovaný v roku 1979 a už od 80-tých rokov sa klinicky využíva. Patrí do skupiny enzýmových onkomarkerov.

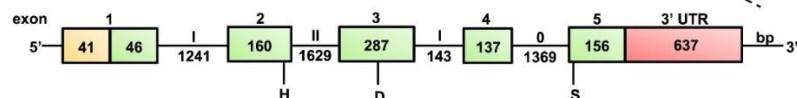
PSA je serínová proteáza zo skupiny tkanivových kalikreínov, ktorá je produkovaná epiteliálnymi prostatickými bunkami. Je to glykoproteín s molekulovou hmotnosťou 34 kDa. V krvi existujú 2 formy PSA voľná forma a forma komplexne viazaná na antiproteázy na α 1-antichymotrypsín a α 2-makroglobulín. Jeho hlavnou funkciou je hydrolyzovať vysokomolekulárne proteíny produkované semennými vačkami, čím umožňuje uvoľnenie spermií z koagula [32].

Kalikreíny sú skupinou serínových proteáz, ktoré sa nachádzajú v rôznych tkanivách a biologickej tekutine. Ľudský kalikreínový lokus má 15 génov (gény KLK) zoskupených v tandemovom poli v 300 kb oblasti okolo chromozómu *19q13.3-q13.4*. (obr. č.6). Tento lokus je centromericky viazaný génom testikulárnej kyslej fosfatázy (ACPT) a telomericky génom asociovaný s rakovinou (CAG) [33, 34].

A Ľudský *KLK* lokus (19q13.4)



B *KLK3* (PSA) gén (5.8 kb)



Obrázok 6: Charakteristika lokusu kalikreínu a *KLK3* génu. [34]

a) Lokus *KLK* u ľudí má 5' koniec je ohraničený génom *ACPT* a na 3' génom *CAG* a *Siglec 9*. Lokus pozostáva z 15 génov typu *KLK* usporiadaných v tandeme; smer génovej transkripcie je od teloméru po centroméru, okrem *KLK2* a *KLK3*.

b) Gén *KLK3*, ktorý kóduje proteín PSA, má dĺžku 5,8 kb a pozostáva z 5 kódujúcich exónov (sú v zelených rámečkoch a sú uvedené s číslami) a 4 intervenujúcich intrónov so zachovaným vzorom intrónovej fázy (I, II, I, 0). Prvý kódujúci exón má krátku 5'-netranslatovanú oblasť (oranžová), druhý exón obsahuje aminokyselinu histidín (H) katalytickej triády smerom ku koncu exónu, tretí exón obsahuje kyselinu asparágovú (D) katalytická triáda okolo stredu a piaty exón nesúci serín (S) katalytickej triády na začiatku exónu. Za stop kodónom, je 3'-nepreložená oblasť (červená).

Transkripcia génu PSA je pozitívne regulovaná androgénnym receptorom (AR). Androgény vykonávajú svoju funkciu prostredníctvom intracelulárneho AR, ktorý je členom rodiny receptorov steroidných hormónov. AR je kľúčový transkripčný faktor, po väzbe ligandu podlieha konformačným zmenám a translokuje sa do jadra z cytosolu, kde interaguje so špecifickými sekvenciami DNA a reguluje transkripčnú aktivitu cieľových génov, vrátane PSA [35].

PSA, podobne ako zvyšok kalikreínových proteínov je vylučovaný ako jednoreťazový preproenzým (preproPSA). Tento PreproPSA má 24-aminokyselinovú vedúcu sekvenciu, ktorá tvorí 17 zvyškov, čo je signálny peptid. Signálny peptid nasmeruje proteín na membránu endoplazmatického retikula, kde sa preproPSA štiepi, aby sa vytvoril a inaktivoval zymogénový proteín nazývaný proPSA (pPSA), ktorý je transportovaný vo vezikulách do plazmatickej membrány a je vylučovaný z bunky do lumina prostatických kanálikov [36]. Tento zymogén nebol nájdený v tkanive ani vo fyziologickej tekutine, zrejme

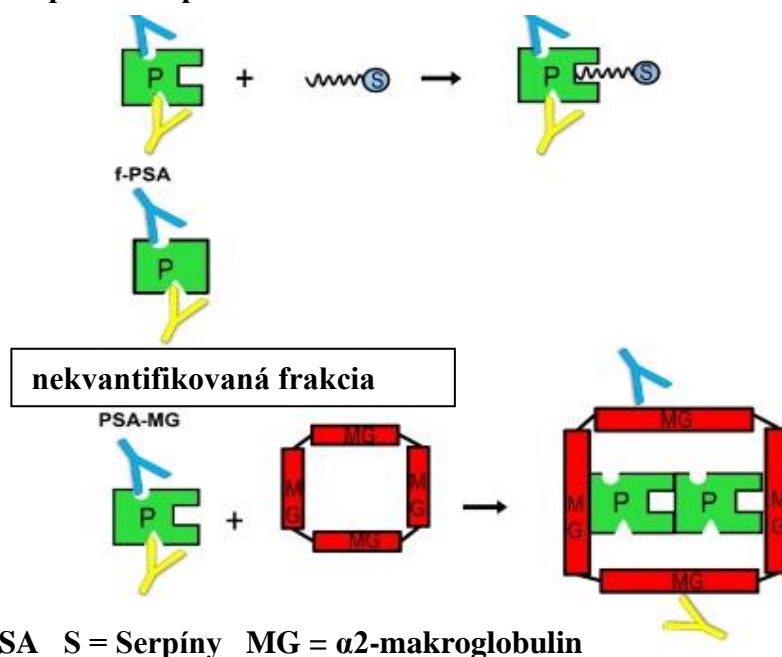
kvôli jeho rýchlej premene na aktívnu formu. Počas jeho aktivácie sa amino koniec (ALA-PRO-LEU-ILE-LEU-SER-ARG) uvoľní štiepením na ARG-ILE peptidovej väzby. ProPSA je aktivovaný trypsínovým ľudským glandulárnym kalikreínom 2 (KLK2) a inou proteázou zo semennej plazmy. ProPSA sa proteolýzou premieňa na aktívnu serínovú proteázu analogicky k aktivácii mnohých proteáz prítomných v krvi, pankrease a iných tkanivách. Žiadna z týchto izoforiem proPSA nebola doteraz hlásená v iných neprostatických tkanivách, ako sú prsník, hrubé črevo, pľúca, pankreas, vaječník, plodová voda a periuretrálne žľazy [34, 37].

PSA je produkovaný u mužov stĺpcovými epiteliálnymi bunkami prostaty periuretrálnych žliaz. Keď sa PSA vytvorí, vylučuje sa do tekutiny žľazových kanálikov. Pri zdravej prostate a benígnemu hyperplastickému tkanivu sa PSA dostáva do obehu len presakovaním do extracelulárnej tekutiny a difúziou do obehu. Pri rakovine prostaty sa však epiteliálne bunky správajú aberantne, čo spôsobuje stratu normálnych sekrečných ciest do prostatických kanálikov. To vedie k sekrécii PSA do extracelulárneho priestoru a do obehu. To vysvetľuje vysoké hladiny PSA v sére u pacientov s rakovinou prostaty [38, 39].

Keď sa PSA dostane do obehu, enzymatické proteázy ho inaktivujú tvorbou PSA-komplexu s inhibítormi proteázy v plazme. PSA je prítomný v ľudskej krvi ako komplexná zmes niekoľkých druhov. PSA je schopný tvoriť kovalentne spojené komplexy s určitými inhibítormi serínovej proteázy nachádzajúcimi sa v sére (*obr. č.7*). Hlavná imunodetekovateľná forma PSA v plazme je v komplexe s inhibítorom serínovej proteázy (serpín), α 1-antichymotrypsínom (ACT), ktorý je známy ako PSA-ACT alebo α 2-makroglobulin (α 2M).

Komerčné vyrábané imunoreaktívne súbory na stanovenie PSA detegujú molekuly PSA voľné aj viazané na ACT. V prípade väzby na α 2M sa molekula v tejto bielkovine uzavrie a nie je možné ju preukázať imunologickými metódami [34, 40].

PSA komplex so serpínmi: PSA-ACT a PSA- α 1-PI



Obrázok 7: Molekulárne sérické formy PSA u mužov [34]

TPSA zodpovedá imunodetekovateľným formám v sére, najmä fPSA a PSA-ACT. PSA-ACT, PSA sa kovalentne viaže na inhibítor al-antichymotrypsínu, hlavnú imunodetekovateľnú formu v sére. PSA- α -PI, PSA sa kovalentne viaže aj na al-antitrypsín, stopovú zložku v sére. fPSA, môže byť proteolyticky aktívny alebo neaktívny v semennej tekutine, neaktívny iba v sére. PSA-MG, PSA je kovalentne spojené a zapuzdrené v alfa 2-makroglobulíne.

PSA velocita

PSA velocita (PSAV) je údaj, ktorý popisuje vývin hladiny PSA v určitom časovom rozmedzí. Je definovaná ako vzostup PSA medzi dvoma odbermi, najčastejšie po uplynutí jedného roku. PSAV vychádza z predpokladu, že produkcia PSA sa zvyšuje pri CaP rýchlejšie než pri BHP. Pre kvalitné výsledky PSAV, je nutné vykonať meranie za dlhšieho časového obdobia, minimálne 3 merania počas 2 rokov. Je možné pozorovať exponenciálne zvýšenie hladiny PSA v priemere 5 rokov pred zistením CaP.

Pacienti pri prvom vyšetrení s hladinou PSA < 2,5 ng/ml, majú riziko výskytu CaP v nasledujúcich 4 rokoch len 1-2 %. Ak bola pacientovi nameraná hladina medzi 2,6-4,0 ng/ml, má riziko výskytu CaP až okolo 13 %. Muži vo veku < 70 rokov s počiatočnou hladinou < 4,0 ng/ml je detegovaný CaP v 47% prípadov. V 11% prípadov pri PSAV s hodnotou < 0,75 ng/ml bolo preukázané toto ochorenie. Senzitivita sa znižuje so zvyšujúcim vekom pacienta. Najväčší význam má stanovenie PSAV pri pacientoch s fyziologickou alebo postupne stúpajúcou hladinou PSA, taktiež je vhodné pri pacientoch s hladinou PSA > 4,0 ng/ml, pri ktorých nebol stanovený CaP TRUS biopsiou [41, 42].

PSA doubling time

PSA doubling time (PSADT), charakterizuje čas, za ktorý dôjde k znásobeniu koncentrácie PSA v séru na dvojnásobok. Bolo zistené, že bunky CaP v recidíve po radikálnej prostatektómii sa množia exponenciálne. Z tohto zistenia vyplýva lineárna závislosť logaritmus hodnôt PSA v závislosti na čase. Vďaka PSADT je možné rozlíšiť metastatické postihnutie od lokálnej recidívy, taktiež dopomáha k ovplyvneniu liečby a spresnenie predpovede priebehu ochorenia. Priemerná hodnota PSADT pri metastatickom postihnutí je 4,3 mesiaca, zatiaľ čo pri lokálnej recidíve 11,7 mesiaca. Bola navrhnutá cut-off hodnota 10 mesiacov, pri ktorej sa najlepšie rozlíši lokálna recidíva od metastáz [42, 43].

PSA denzita

PSA denzita (PSAD) je definovaná ako pomer celkovej hodnoty PSA a objemu / veľkosti prostaty. Predpokladá sa, že zvýšené hladiny PSA korelujú s objemom prostaty. Tento predpoklad pre výpočet niektorí autori potvrdzujú a vymedzujú hraničné hodnoty PSAD pre BHP od 0,10-0,15 ng/ml na gram prostatického tkaniva. Tento pomer pri pacientoch s CaP sa zvyšuje. V poslednej dobe sa v snahe zlepšiť špecifitu diagnostickej metódy upriamila pozornosť na výpočet PSAD len tranzitórnej zóny [43].

BHP vzniká v tranzitórnej zóne. Objavila sa nová idea, deliť hladinu PSA len objemom tranzitórnej zóny (objemom adenómu prostaty). Doporučuje sa používať hraničnú hladinu 0,3 ng/ml, v tomto prípade by sa zabránilo 51 % biopsiám, s tým že sa nezachytí 12% pacientov s CaP. Pokiaľ by sa hodnota PSAT znížila na 0,17 ng/ml výsledky by boli rovnaké ako u prostej PSAD [44].

Vekovo špecifický PSA

Hladina PSA s vekom rastie bez ohľadu na to, či je prítomný CaP alebo nie. Celkové PSA má význam stanoviť najmä u mladších pacientov medzi 50-60 rokom života, kedy PSA funguje aj ako marker prognózy ochorenia. Vzhľadom na vek pacienta sa posudzujú referenčné hodnoty tPSA (tab. č.2). Pri včasnej diagnostike CaP sa zahájením účinnej liečby, môže dôjsť k predĺženiu života pacientov s týmto ochorením [42].

Tabuľka 2: Hodnoty PSA úmerné veku [43]

Vekové rozhranie	Hodnoty PSA [ng/ml]
40-49	0-2,5
50-59	0-3,5
60-69	0-4,5
70-79	0-6,5

Podiel frakcie celkového / voľného PSA

So zvyšujúcim sa podielom voľnej frakcie PSA k celkovej hodnote PSA stúpa pravdepodobnosť vzniku CaP. Pomer voľného PSA (fPSA) k celkovému je 1 : 4. Pomer je závislý na možných patologických zmenách prostaty a môže sa teda líšiť. Meranie voľnej frakcie slúži na rozoznanie medzi BPH a CaP. Poskytuje odlišenie pred eventuálnym opakovaním biopsie u pacientov s negatívnym nálezom po prvej biopsii, ktorí majú zvýšený celkový PSA (tPSA) [43].

Doposiaľ bolo zistené, že voľný PSA je nižší u pacientov s CaP, ako u pacientov s BHP. Vyššie hladiny sa nachádzajú u starších mužov alebo u mužov so zväčšenou prostatou. Špecifickosť celkového PSA zlepšuje stanovenie voľnej frakcie PSA pri hodnote celkového PSA v rozmedzí od 2,5-10,0 ng/ml. Akceptovanie percenta % fPSA v rozmedzí medzi 14-26 %, zabráni 20-40 % biopsií pri strate 5-10 % pacientov s CaP. Využitie pomeru voľného / celkového PSA je podriadené objemu prostaty. Príčina k vykonaniu vyšetrenia voľného PSA je výsledok celkového PSA, ktorý je hodnotách od 4-16 ng/ml. Riziko malignity so stúpajúcim % fPSA je uvedené v *tab. č. 3* [42, 43, 45].

Pomer je určovaný podľa vzorca:

$$\% fPSA = (fPSA/tPSA) \times 100$$

Tabuľka 3: Pravdepodobnosť malignity na základe %fPSA [20]

% fPSA	Pravdepodobnosť malignity
23	Nízka
23-16	Hraničná
16	Vysoká

Index zdravej prostaty

Prostate Health Index (PHI) je definovaný ako multivariačný index, slúžiaci k stanoveniu rizika prítomnosti CaP a rozlíšeniu CaP od benígnych prostatických stavov. Nepatrí k univerzálnym indexom, pretože je nutná koncentrácia PSA, fPSA a p2PSA, ktoré sú získané analýzou z rovnakého vzorku, na rovnakom systéme, za použitia rovnakej kalibrácie.

PHI je určovaný podľa rovnice:

$$PHI = (p2PSA/fPSA) * \sqrt{PSA}$$

Index vysoko koreluje s CaP. Výpočet sa aplikuje u pacientov s tPSA v hodnote 0 - 30 ng/ml. Čím nižšie hladiny PHI, tým riziko CaP je menšie. Ak hodnota PHI je negatívna, biopsia prostaty nemusí byť absolvovaná. PHI môže vylúčiť zbytočne prevedenú biopsiu prostaty pacienta, pričom rizika falošne negatívneho výsledku je nízka [45, 46].

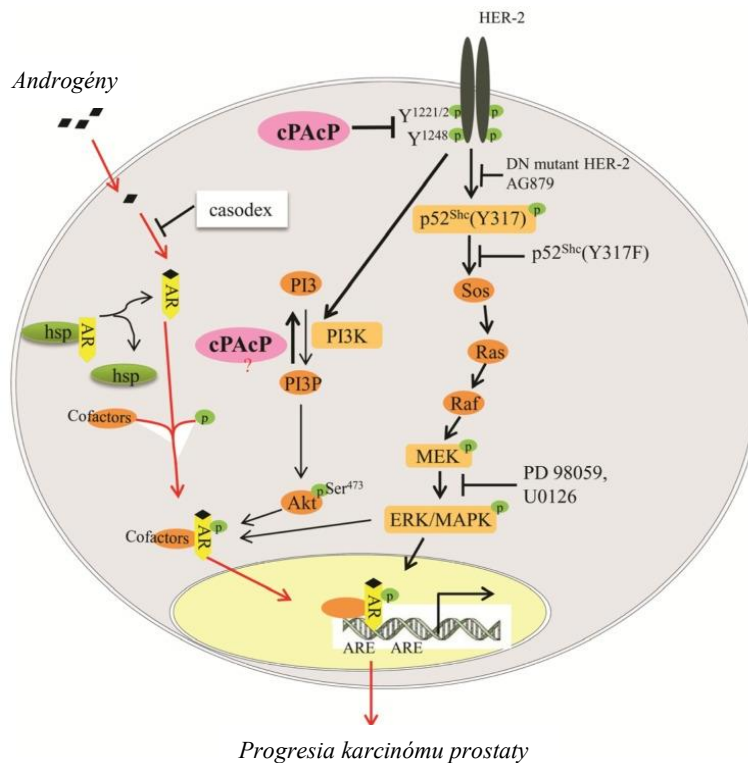
P2PSA je proenzýmová forma PSA, ktorá je frakciou v plazme cirkulujúceho fPSA. CaP produkuje okrem iných, aj túto látku p2PSA. Tá sa dostáva do krvného obehu a podľa jej množstva sa dá posúdiť ako prítomnosť nádoru alebo prípadné riziko vzniku nádoru. Keďže diagnostika na základe vyšetrenia PSA nie je jednoznačná, p2PSA teda výrazne zvyšuje klinický význam stanovenia, pretože jeho špecificita dosahuje až 33 % v porovnaní s fPSA (17 %) a PSA (13 %). PHI sa používa ako pomôcka pri rozlíšení karcinómu prostaty od BHP u mužov vo veku nad 40 rokov s celkovým PSA $\geq 2,0$ až ≤ 10 ng/ml, lebo zvýšená produkcia PSA existuje aj u nemalígneho ochorenia prostaty, predovšetkým benígnych hyperplézií [47].

1.3.2 Prostatická kyselá fosfatáza

Ľudská prostatická špecifická kyselá fosfatáza (PAP) je sekrenovaný glykoproteín s molekulovou hmotnosťou 100 kDa, syntetizovaný v lyzozómoch buniek epitelu prostaty. Existujú dve formy PAP a to bunková forma-cPAP, vysoko exprimovaná v bunkách prostaty a sekrečná forma-sPAP, exprimovaná iba v prostate a väčšinou sa uvoľňuje do semennej tekutiny. PAP bola pozorovaná vo vyšších hladinách v obehu pacientov s CaP, zatiaľ čo jeho expresia v prostate je znížená [48].

Bunková forma PAP má účinok na potlačenie rastu karcinómu a je to spôsobené jeho aktivitou bunkovej proteín tyrozín fosfatázy a hladiny PAP mRNA aj proteínu sú znížené, prípadne chýbajúce v tkanive CaP. cPAP je v tkanive CaP málo regulovaný a toto zníženie vedie k signálnej dráhe extracelulárnej signálom regulovanej kinázy (ERK) a mitogénom aktivovanej proteínkinázy (MAPK), čo vedie k strate ich androgénovej citlivosti a zvýšenie rýchlosti rastu a tumorigenicity. Ďalej sa uvádza, že PAP blokuje dráhu PI3K-AKT-AR, čo zvyšuje mieru prežitia buniek. Okrem toho má cPAP tendenciu regulovať rast kostných metastáz prostredníctvom zmeny systému RANKL/OPG (*obr.8*) [49].

U ľudí je PAP jedným z hlavných proteínov vylučovaných sekrečnými bunkami stĺpcového epitelu prostaty po puberte. Proteín PAP bol stanovený ako približne 0,5 mg/g vlhkej hmotnosti tkaniva prostaty a približne 1 mg/ml v semennej tekutine. Expresia PAP je spojená s testosterónom, ktorý určuje sekundárne sexuálne charakteristiky [50]. PAP sa môže nachádzať vo zvýšených množstvách u mužov, ktorí majú CaP. Robustná expresia PAP bola skutočne detegovaná pri CaP s vysokým Gleasonovým skóre. Expresia je však obohatená aj v zdravých bunkách prostaty, ako aj v tkanive CaP, ako bolo určené pomocou qPCR. V porovnaní s iným tkanivom je hladina PAP mRNA 50-5 000-krát vyššia v zdravom tkanive prostaty a 110-6000-krát vyššia v tkanive CaP. PAP možno detegovať aj v rôznych tkanivách iných ako je prostata, ako je mozog, obličky, pečeň, pľúca, placenta, slinná žľaza, slezina, štítna žľaza a bunky týmusu. PAP chýba v tkanive karcinómu prsníka na rozdiel od zdravého tkaniva prsníka, kde je možné detegovať PAP [51, 52, 53].



Obrázok 8: Schematické znázornenie signalizácie ErbB-2 a androgénovej citlivosti regulovanej cPacP v bunkách karcinómu prostaty[49]

(a) Plná červená šípka označuje klasickú ligandovo závislú aktiváciu dráhy AR. Neviazaný AR sa nachádza v cytosóle v spojení s proteínmi tepelného šoku (hsp). Androgén (DHT) vstupuje do cytoplazmy a viaže sa na AR vytesnením asociovaných hsp, čo umožňuje AR vstúpiť do jadra, kde sa dimerizuje, získava koregulačné proteíny a viaže sa na prvok odpovede na androgén (ARE), čo vedie k regulácii transkripcie cieľového génu.

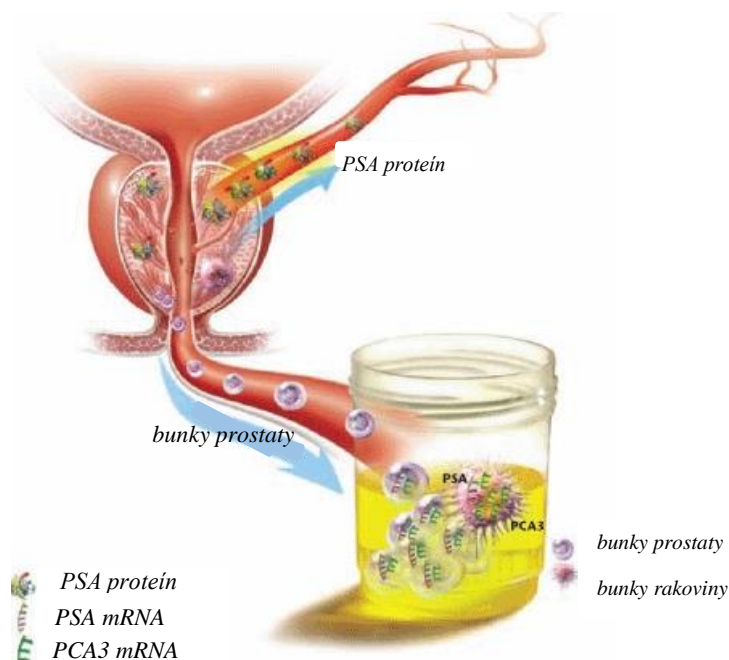
(b) Plné čierne šípky označujú cPacP-regulovanú dráhu v bunkách rakoviny prostaty s klinickým významom. Progresia buniek CaP citlivých na androgén smerom k nezávislosti od androgénu je sprevádzaná skorým poklesom/stratou expresie cPacP v bunkách CaP, čo vedie k hyperfosforylácii HER-2 na tyrozínových zvyškoch (1221/2 a/alebo 1248), čo vedie k nezávislosti androgénu od bunkovej proliferácie. Aktivovaný HER-2 môže prenášať svoje signály cez p52Shc (blokovaný dominantne negatívnu HER-2 cDNA transfekciou alebo HER-2 inhibítorom, AG879), aby aktivoval downstream ERK/MAPK dráhu (blokovanú p52Shc Y317F mutantnou cDNA transfekciou alebo inhibítorom MEK, PD 98059 a U0126) prostredníctvom sprostredkovania Ras/Raf. Tieto udalosti môžu tiež viesť k fosforylácii a aktivácii AR, čo vedie k zvýšeniu bunkovej proliferácie nezávislej od androgénov. Aktivovaný HER-2 prostredníctvom Akt môže tiež fosforylovať AR. Alternatívne vedie strata expresie cPacP k akumulácii PI3P.

1.3.3 PCA3 marker

Tento gén produkuje zostrihnutú, dlhú, nekódujúcu RNA, ktorá je nadmerne exprimovaná vo väčšine typov buniek CaP. Tento gén je uložený v intrónovej oblasti génu *prune2* na opačnom vlákne DNA. Transkript reguluje hladiny *prune2* prostredníctvom tvorby dvojvláknovej RNA, ktorá podlieha adenozyndeamináze. V bunkách odvodených od CaP nadmerná expresia PCA indukovala zníženú reguláciu *prune2*, čo viedlo k zníženej proliferácii buniek. Regulácia tohto génu je citlivá na aktiváciu AR (obr. č.9) [54].

Expresia PCA3 je 60 až 100-krát vyššia v malígnych ako v benígnych tkanivách prostaty a tým dáva génu rakovinovú špecifickosť, ktorá chýba pri PSA. Na bunkovej úrovni môže stanovenie PCA3 oddeliť benígne a malígne bunky prostaty s presnosťou blížiacou sa 100%. Okrem toho sa nezistili žiadne transkripty PCA3 v širokom spektre ľudských extraprostatických benígnych a rakovinových tkanív, a tým je PCA3 je najšpecifickejší doteraz identifikovaný gén CaP. Nadmerná expresia PCA3 malígnymi bunkami umožňuje diagnostické použitie hladín génov v tkanivách alebo tekutinách obsahujúcich bunkový materiál prostaty [55]. V doterajších klinických štúdiách sú hladiny PCA3 v moči konzistentne lepšie ako hladiny PSA v sére pri diagnostike CaP [56].

Diagnostika PCA3 má význam pre vhodný výber pacientov na absolvovanie biopsie, najmä v prípade hodnôt PSA 2,5-10 ng/ml, čo je tzv. šedá zóna, a pri podozrení na CaP aj keď bol prvý výsledok biopsie negatívny [57].



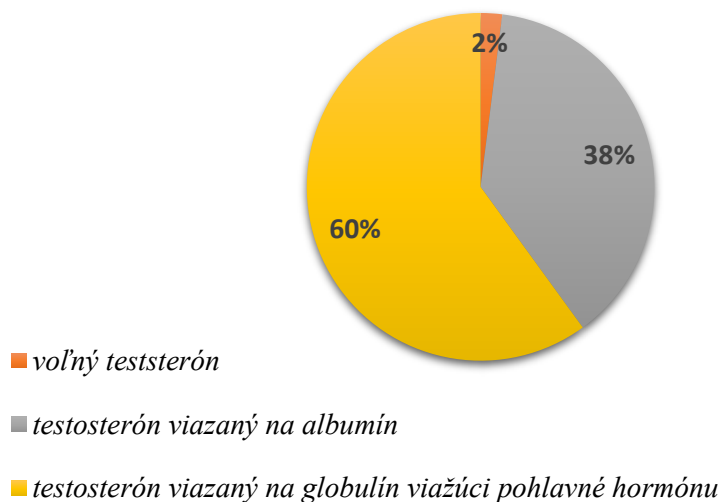
Obrázok 9: Vylučovanie PCA3 (dolná šípka) vs. PSA (horná šípka) [56]

1.3.4 Testosterón

Testosterón je pleiotropný hormón zodpovedný za reguláciu pohlavnej diferenciácie. Ovplyvňuje produkciu mužských pohlavných charakteristík, spermatogézu a plodnosť. Fetálne Leydigove bunky vo vyvíjajúcich sa povrazcoch semenníkov vylučujú androgény potrebné na vývoj mužského reprodukčného traktu. Tieto špecializované bunky majú pôvod v mezonefrose a ich prekursorové bunky zásobujú semenníky aj kôru nadobličiek počas skoršej embryogenézy [58].

Väčšina testosterónu sa produkuje v semenníkoch zo substrátov cholesterolu a acetátu. Zona reticularis kôry nadobličiek prispieva minimálne k zásobe prekursorov testosterónu vylučovaním dehydroepiandrosterónu (DHEA) a DHEA-sulfátu (DHEA-S). Sekrécii testosterónu reguluje hypotalamo-hypofýzo-gonadálna os. Hormón uvoľňujúci luteinizačný hormón (LHRH) stimuluje predný lalok hypofýzy, aby uvoľnil luteinizačný hormón (LH), ktorý stimuluje Leydigove bunky testes a tie vylučujú testosterón. V prostatickej epitelovej bunke sa testosterón konvertuje enzýmom 5-alfa-reduktáza na približne 10-násobne účinnejší 5-alfa-dihydrotestosterón (DHT). Ak prostatická bunka nemá dostatok androgénov, podstúpi apoptózu. Voľný testosterón alebo DHT sa potom viažu na intracelulárny androgénny receptor, čo umožňuje komplexu viazať oblasti DNA a prejavovať androgénne účinky [59].

Testosterón môže byť tiež premenený na estrogén prostredníctvom aromatázy, v cieľových oblastiach vrátane nervového tkaniva, tukového tkaniva, pečene a kostí. U mužov je estrogén z tejto reakcie dôležitý pre dozrievanie spermií a udržanie libida [58].



Graf 1: Distribúcia testosterónu v plazme zdravého muža [58]

Nedostatok androgénu alebo hypogonadizmus (LOH) je spojený s rôznymi symptómami vrátane zníženej energie, zníženého libida a erektilnej dysfunkcie, medzi inými. Hladiny mužských androgénov s vekom neustále klesajú a v podskupine symptomatických starších mužov môžu viesť k hypogonadizmu s neskorým nástupom LOH. Za posledné desaťročie viedlo zvýšené povedomie o hypogonadizme medzi pacientmi a poskytovateľmi k významnému nárastu používania testosterónovej substitučnej terapie (TRT) pri hypogonadizme, a najmä pri LOH. Nárast TRT sprevádzajú obavy z možných nepriaznivých účinkov vrátane kardiovaskulárnych rizík a podpory CaP. TRT zahŕňa podávanie exogénneho testosterónu a iných činidiel zameraných na zvýšenie hladín androgénov u hypogonadálnych mužov [60, 61].

Vplyv testosterónu na CaP potvrdzujú zistenia, že u eunuchov, mužov po kastrácii v predpubertálnom období a u mužov s kongenitálnymi abnormalitami androgénového metabolizmu nevznikajú malignity prostaty [61].

1.3.5 Neurón špecifická enoláza

Neurón špecifická enoláza (NSE), známa aj ako gama (γ) enoláza alebo enoláza-2 (Eno2), je formou izoenzýmu glykolytickej enolázy a považuje sa za multifunkčný proteín. NSE sa exprimuje hlavne v cytoplazme neurónov a neuroendokrinných buniek, najmä v tých, ktoré patria do línie vychytávania a dekarboxylácie amínových prekurzorov (APUD), ako je hypofýza, štítna žľaza, pankreas, črevo a pľúca. Okrem jeho dobre zavedenej funkcie glykolýzy v cytoplazme sú zmeny v bunkovej lokalizácii a diferenciálnej expresii NSE tiež spojené s niekoľkými patológiami, ako je infekcia, zápal, autoimunitné ochorenia a rakovina [62, 63].

Nádory prostaty siahajú od pomaly rastúcich lézií až po agresívne nádory, ktoré rýchlo metastázujú. Subtyp s neuroendokrinnými (NE) znakmi predstavuje vysoko agresívny variant CaP, ktorý je čoraz viac klinicky uznávaný. Hoci ide o vzácnu primárnu diagnózu, neuroendokrinný fenotyp sa často objavuje počas progresie ochorenia, najmä v štádiu rezistentnom na kastráciu [64]. NE bunky sú prirodzene prítomné v prostatickej žľaze. Ich funkčné úlohy sú nejasné, ale pravdepodobne sa podieľajú na regulácii, sekrécii a diferenciácii prostaty. V zdravej prostate sú NE bunky vzácné a rozptýlené po celom epiteli a poskytujú trofické signály okolitým bunkám prostaty [65]. Pôvod rakovinových NE buniek v CaP je kontroverzný. Bolo navrhnuté, že môžu pochádzať z kmeňových buniek ako zdravé NE bunky. Narastajúce množstvo dôkazov však naznačuje, že bunky adenokarcinómu môžu

prejsť procesom transdiferenciácie a získať NE znaky. Táto forma plasticity je spojená s nižšou signalizáciou AR [64, 66]. Nádorové bunky NE v skutočnosti neexprimujú AR: rastú v prostredí bez androgénu a môžu stimulovať proliferáciu buniek CaP prostredníctvom rôznych signalizačných modalít, vrátane diaľkových, endokrinných mechanizmov a krátkodobo sprostredkovanej signalizácie, parakrinného alebo priameho kontaktu bunka-bunka. Tiež zvyšujú agresivitu CaP prostredníctvom inhibície apoptózy a podpory neovaskularizácie [62, 67].

1.4 Metódy stanovenia onkomarkerov

1.4.1 Imunoanalytické metódy

Imunoanalýza v bioanalytike umožňuje stanoviť nízke koncentrácie antigénov alebo protilátok, ktoré sú ťažko stanoviteľne klasickými sérologickými metódami. Využívajú sa aj na stanovenie nádorových markerov, hormónov, cytokínov a iné.

Základom týchto metód je reakcia antigénu a protilátky, pri ktorých je jedna zo zložiek označená, aby došlo k následnej identifikácii voľnej a viazanej frakcie. Imunoglobulíny vykazujú špecifickú väzobnú aktivitu k antigénu, proti ktorému boli pripravené.

Imunoanalytické metódy rozdeľujeme na heterogénne a homogénne, podľa toho či pred meraním oddeľujeme viazanú a voľnú frakciu antigénu (heterogénne), alebo imunokomplex nemusíme separovať a reakcia prebehne v tzv. jednej skúmavke (homogénne). Ďalšie delenie metód je na kompetitívne, kde dochádza k súťaženiu o protilátku alebo antigén a nekompetitívne, ktoré majú protilátku alebo antigén v nadbytku väčšinou naviazaný na vhodný nosič [68].

1) Kompetitívne metódy

Kompetitívne metódy sú typické tým, že je špecifická protilátka proti stanovovanému antigénu v reakcii v obmedzenom množstve. O väzobné miesta, ktoré sa nachádzajú na protilátke súťaží značený a neznačený antigén. Oba tieto antigény sú rovnako schopné sa naviazať na protilátku a naviažu sa na ňu v pomere svojich koncentrácií. Reakciou vzniká značený a neznačený komplex a v reakčnej zmesi ostáva podiel voľných značených aj neznačených antigénov. Kvantifikácia je následne umožnená meraním koncentrácie označeného imunokomplexu, ktorý vznikol v rovnováhe medzi značeným a neznačeným

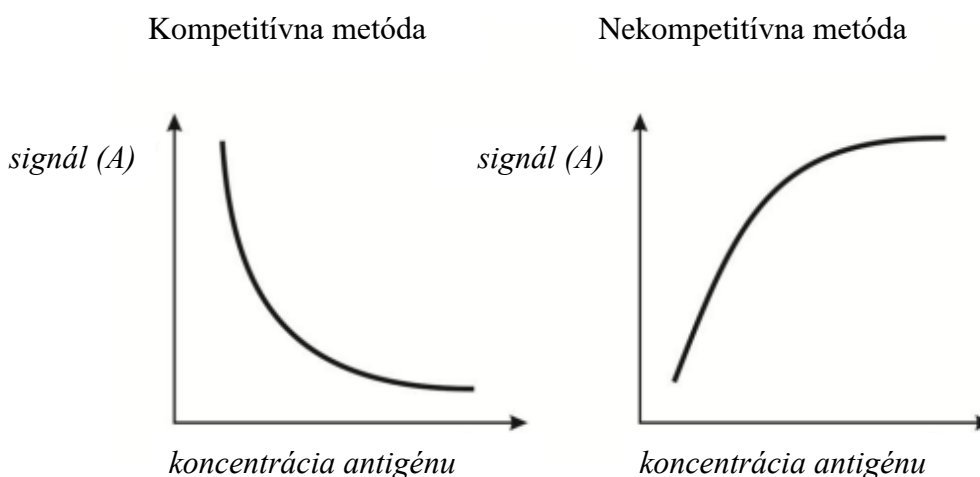
antigénom. Čím vyššia je koncentrácia neznačeného antigénu, tým nižší bude meraný signál v značenom imunokomplexe (*obr. č.10*).

Využitie kompetitívnych metód je najmä v stanovení malých molekúl s jednou antigénnou determinantou, ako sú napr. hormóny a lieky [68, 69, 70].

2) Nekompetitívne metódy

Pri nekompetitívnych metódach je v nadbytku prítomná špecifická protilátka k stanovovanému antigénu, kde sa účastní reakcie len stanovovaný antigén. V prvej imunochemickej reakcii je naviazanie všetkých molekúl antigénu na protilátku, ktorá sa nachádza v prebytku. Následne je v nadbytku pridaná druhá protilátka označená indikátorom. Táto protilátka je namierená proti inej antigénnej determinante stanovovaného antigénu. Výsledkom je sendvičový komplex, ktorý je zložený z protilátky naviazanej na antigéne a protilátky označenej indikátorom. Analýzou meriame množstvo vzniknutého značeného imunokomplexu, priamo úmerného množstvu stanovovanému antigénu (*obr. č.10*).

Využitie nekompetitívnych metód je vhodné pre stanovenie veľkých antigénov s niekoľkými antigénnymi determinantmi pre protilátku, ako sú napr. hormóny alebo bielkoviny [68, 69, 70].



Obrázok 10: Kalibračné závislosti u kompetitívnych a nekompetitívnych metód [95]

1.4.2 Rozdelenie imunoanalytických metód

Imunoanalytické metódy možno rozdeľovať podľa použitého indikátoru (*tab. č.4*). Za indikátor považujeme protilátku alebo antigén, ktoré sú vhodne označené, čím sa sleduje

priebeh imunoanalytickej reakcie. Značené látky produkujú priamo signál, alebo je inicializácia produkcie vyvolaná. Prvotne boli používané látky označené rádionuklidom. V súčasnosti sa namiesto rádionuklidu používajú luminofóry, enzýmy alebo enzýmy dopomáhajúce vzniku látok s luminiscenciou. Každý zo zdrojov, generujú signál, ktorý je detegovaný rôzne a spôsob detekcie bude prebratý v nasledovných kapitolách [68, 69, 70].

Tabuľka 4: Rozdelenie imunoanalytických metód [69]

Enzýmovo - fotometrické imunoanalytické metódy	
<i>EIA</i>	Enzýmová imunoanalýza (kompetitívna)
<i>ELISA</i>	Heterogénna enzýmová imunoanalýza (nekompetitívna)
<i>MEIA</i>	Enzýmová imunoanalýza na mikročasticiach (heterogénna)
<i>EMIT, IEMA</i>	Homogénna enzýmová imunoanalýza
Luminiscenčné imunoanalytické metódy	
<i>LIA</i>	Luminiscenční imunoanalýza
<i>ILMA</i>	Imunoluminometrická analýza (nekompetitívna)
<i>CMIA, CLIA</i>	Chemiluminiscenčná imunoanalýza na časticiach
<i>LOCI</i>	Chemiluminiscenčná imunoanalýza (homogénna)
<i>ECLIA</i>	Elektrochemiluminiscenčná imunoanalýza
Radiometrické imunoanalytické metódy	
<i>RIA</i>	Radiometrická imunoanalýza (kompetitívna heterogénna)
<i>IRMA</i>	Imunoradiometrická analýza (nekompetitívna heterogénna)
<i>REA</i>	Rádioenzymatická analýza
<i>RRA</i>	Rádiorceptorová analýza
Fluorescenčné imunoanalytické metódy	
<i>FIA</i>	Fluorescenčná imunoanalýza
<i>FPIA</i>	Fluorescenčná polarizačná imunoanalýza (homogénna)
<i>DELPIA</i>	Zosilnená predĺžená fluorescenční imunoanalýza (heterogénna)
<i>TRACE</i>	Časovo rozlíšená zosilnená fluorescenční imunoanalýza (homogénna)

1. Enzýmová imunoanalýza

Enzýmový imunotest (EIA) a enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) sú kvantitatívne analytické metódy, ktoré detegujú stanovovanú látku reakciou antigén-protilátka prostredníctvom zmeny farby získanej použitím konjugátu viazaného na enzým a enzýmového substrátu, slúžiace na identifikáciu prítomnosti a koncentrácie molekúl

v biologických tekutinách. Vysokú úroveň špecifickosti voči protilátkam alebo pre nich vyvinuté antigény vykazujú molekuly s veľmi nízkou koncentráciou, ako sú peptidy, hormóny, vitamíny a liečivá [71].

Metódy EIA rozdeľujeme na homogénne a heterogénne enzymatické metódy. Pri homogénnych imunoanalytických metódach sú enzýmy inaktivované, v momente keď sa naviažu na protilátku. V tomto type reakcie neexistuje premývanie, kde by sa antigén oddelil od média. Metóda sa využíva najmä na meranie látok malých množstiev, medzi ktoré patria napr. terapeutické liečivá. Výhodou je jednoduchosť použitia, avšak s nízkou citlivosťou a cenovo drahšia. Častejšie sa v praxi využívajú heterogénne imunoanalytické metódy a ich podtypy. Aby sa predišlo interferenciám akejkoľvek molekuly nachádzajúcej sa v médiu po naviazaní antigénu a protilátky, naviaže sa komplex antigén - protilátka na steny experimentálnych skúmaviek a zvyšok sa odstráni z média cez premývací krok. Heterogénna metóda je oproti homogénnej citlivejšia a je častejšie používaná [71, 72].

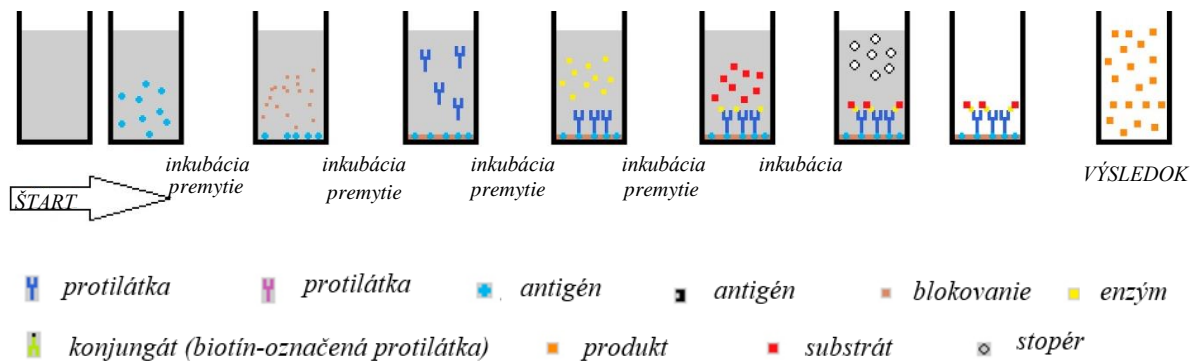
ELISA patrí medzi heterogénne imunoanalytické metódy, ktorá sa používaná na detegovanie špecifických protilátok a rozpustných antigénov. Antigén používaný v ELISE sa viaže na pevnú fázu, používajú sa skúmavky mikroplatničky vyrobeného z tuhého polyvinylu, polystyrénu, polypropylénu. Tieto mikroplatničky vhodne adsorbujú antigén a protilátku, ale nesmú adsorbovať zložky v iných fázach. Využívajú sa enzýmy, ako sú galaktozidáza, glukooxidáza, peroxidáza (POD) a alkalická fosfatáza. Alkalická fosfatáza a P- nitrofenylfosfát sa používajú ako substráty, sú dostupné v bezpečných tabletových formách a pri pozitívnych reakciách vytvárajú žltú farbu. Pre peroxidázový konjugát sa ako substráty používajú 5-aminokyselina salicylová a peroxid vodíku s ortofenyléndiamínom. Vznik hnedého sfarbenia sa považuje za pozitívnu reakciu. Ak sa použije beta galaktozidáza, vzorka sa odčíta na fluorometri [68, 71].

Katabolické účinky enzýmov určujú tak zrýchlenie, ako aj špecifickosť imunologickej reakcie počas reakcie enzým-substrát. Reakcia enzým-substrát je zvyčajne ukončená v priebehu 30-60 minút. Reakciu je možné zastaviť pomocou hydroxidu sodného (NaOH), kyseliny chlorovodíkovej (HCl) alebo kyseliny sírovej (H₂SO₄). Výsledky sa odčítajú na spektrofotometri a pri 400-600 nm v závislosti od charakteristík použitého konjugátu [71, 72].

a) **Priama ELISA**

Toto je najjednoduchšia z techník ELISA (*obr. č.11*). Vzorka sa najskôr pridá do jamky mikroplatničky a inkubuje sa. Vzorka bude obsahovať požadovaný antigén, ktorý sa

adsorbuje na povrch jamky. Jamky sa potom dôkladne premyjú, pričom zostane len absorbovaný antigén. Zvyšné väzbové miesta na jamke sú potom blokované. Protilátka, komplementárna k požadovanému antigénu, sa potom pridá do jamiek, kde sa naviaže na antigén. Jamky platničky sa opäť premyjú. Na povrchu jamky tak zostane naviazaný komplex antigén - protilátka. Naviazaná protilátka sa označí enzýmom. Pridá sa substrát, ktorý sa enzýmom premení na detekovateľný produkt. Detekcia môže byť založená na farbe, fluorescencii alebo luminiscencii [71, 73].

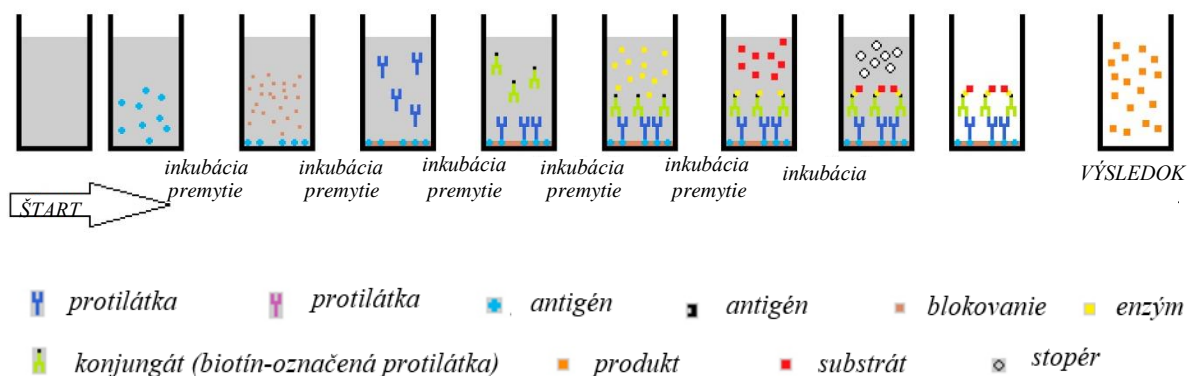


Obrázok 11: Princíp metódy - priama ELISA [71]

b) Nepriama ELISA

Vzorka obsahujúca požadovaný antigén sa adsorbuje na jamky mikroplošnice, po čom nasleduje blokovanie zostávajúcich miest na jamke. Po pridaní protilátky (primárna protilátka) sa naviaže na antigén a vytvorí komplex. Táto metóda sa líši od priamej metódy v tom, že protilátka viažuca sa na antigén nemá k nemu pripojený enzým alebo inú látku generujúcu signál. Namiesto toho je účelom tejto protilátky pôsobiť ako mostík medzi antigénom a sekundárnou (s enzýmom viazanou) protilátkou. Táto sekundárna protilátka bola vypestovaná vo zvierati odlišnom od zvieratá, z ktorého pochádza primárna protilátka a bude sa zameriavať na Fc oblasť primárnej protilátky (*obr. č.12*) [73].

Sekundárna protilátka je často polyklonálna (pochádza z rôznych B lymfocytov) a ako taká bude reagovať na rôzne epitopy na primárnej protilátke, čo umožňuje viacerým sekundárnym protilátkam naviazať sa na rovnakú primárnu protilátku, čím sa zosilní signál a zvýši sa citlivosť testu [73, 74].

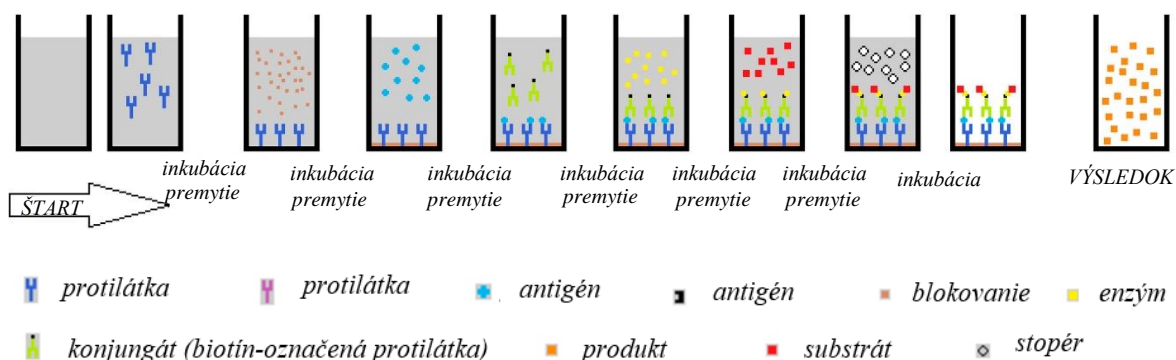


Obrázok 12: Princíp metódy- nepriama ELISA [71]

c) Sendvičová ELISA

Pri tomto druhu metódy sú jamky potiahnuté zachytávacou protilátkou a blokované. Vzorka sa pridá do jamiek mikrodostičky potiahnutých protilátkou, prebehne inkubácia a premytie, pri ktorom sa odstránia nenaštiepené antigény. Keď sa nájde antigén špecifický pre naviazanú protilátku, tieto antigény sa nedajú odstrániť. Po premytí sa pridajú protilátky, ktoré sú označené enzýmom špecifickým pre antigén a nechajú sa inkubovať (obr. č.13).

Po pridaní enzýmového substrátu do média vzniká zafarbenie, ktorého intenzita je priamo úmerná aktivite enzýmu a tým aj koncentrácii antigénu vo vzorke. Naopak slabé zafarbenie indikuje nedostatok enzýmov alebo negatívny výsledok. Keďže príslušný proteín je zaseknutý medzi dvoma molekulami protilátky, táto metóda sa nazýva sendvičová ELISA. Uvádza sa, že sendvičové testy ELISA sú 2-5x citlivejšie ako všetky ostatné ELISA testy [71].

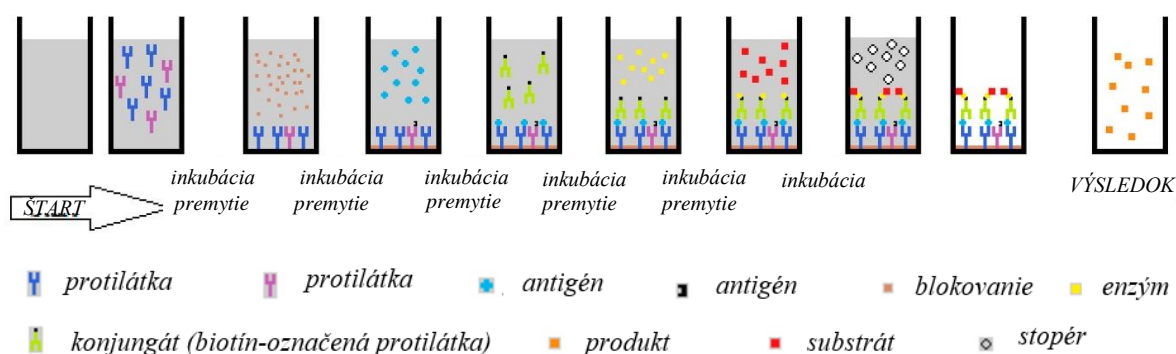


Obrázok 13: Princíp metódy - sendvičová ELISA [71]

d) Kompetitívna ELISA

Tento spôsob stanovenia je charakterizovaný tým, že dva ligandy navzájom súťažia o obmedzený počet protilátkových miest. Jeden ligand je stanovovaný antigén a jeden je podobná molekula, ktorá je schopná viazať sa na protilátku, ale má variáciu, ktorá umožňuje ďalšej molekule viazať sa výlučne na ňu. To sa dosahuje pridaním biotínu k stanovovanému antigénu. Antigén a biotinylovaný antigén budú súťažiť o rovnaké miesto na protilátke (obr. č.14). Signál generovaný týmto testom je nepriamo úmerný množstvu antigénu vo vzorke. Čím je množstvo analyzovaného antigénu alebo protilátky v sére nižšie, tým sa získa vysoká absorbanca, zatiaľ čo väčšie množstvá spôsobujú nízku absorbanciu [71].

Ako bolo uvedené, biotín sa často pridáva ku konkurenčnému antigénu. Je to užitočná molekula, pretože je malá a teda výrazne neznižuje afinitu antigénu k protilátke. Ľahko a špecificky sa tiež viaže na streptavidín. Streptavidín je proteín, ktorý sa ľahko konjuguje s rôznymi molekulami, čo umožňuje generovanie signálu z rôznych zdrojov, ako sú farebné zmeny, chemiluminiscencia (imunoluminometrický test) a fluorescencia (imunofluorometrický test). Komplex biotín-streptavidín možno použiť aj ako zosilňovač signálu [71, 73, 74].



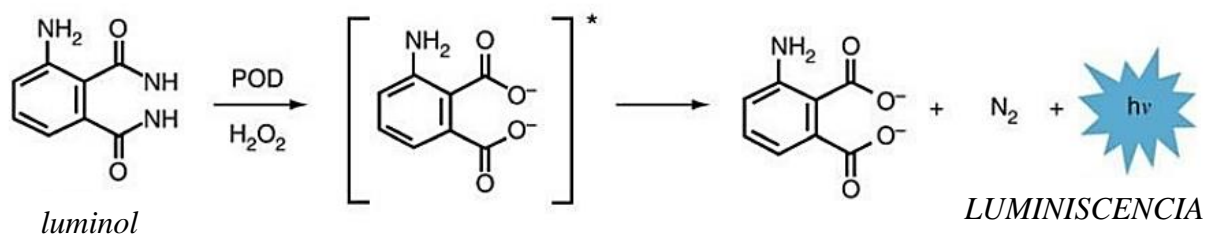
Obrázok 14: Princíp metódy- kompetitívna ELISA [71]

2. Luminiscenčná imunoanalýza

Luminiscenčná imunoanalýza je metóda na stanovenie koncentrácií mnohých organických zlúčenín v komplexných telesných tekutinách. Jeho výhody oproti konvenčným testom sú extrémna citlivosť, široký rozsah lineárnej odozvy, rýchlosť analýzy a stabilita činidiel [75].

Ako indikátory imunochemickej reakcie sa používajú luminiskujúce látky, ktoré obsahujú luminofóry. Luminofóry sú štruktúry v molekule, schopné absorbovať žiarenie vo viditeľnej alebo ultrafialovej oblasti spektra. Takéto vlastnosti majú najmä organické látky

aromatického charakteru. Medzi najpoužívanejší luminofór patrí luminol (3-aminofthalhydrazid), ktorý sa využíva pre stanovenie peroxidu vodíka za katalýzy POD (obr. č.15). Intenzita žiarenia má maximum pri 425 nm, je následne úmerná stanovovanej koncentrácii peroxidu vodíka. Avšak luminol nie je veľmi vhodný pre značenie v imunoanalýze preto sa v praxi nahrádza derivátmi ako napr. N-alkylderiváty isoluminolu, kvôli lepšiemu kvantovému výťažku [76].



Obrázok 15: Reakcia luminolu s peroxidom vodíka za katalýzy POD [76]

Kompetitívne metódy sú označované ako luminoimunoanalýzy (LIA), nekompetitívne ako imunoluminometrické analýzy (ILMA). Medzi tieto metódy radíme aj chemiluminiscenčnú imunoanalýzu (CLIA), homogénna chemiluminiscenčná imunoanalýza (LOCI) a elektrochemiluminiscenčná imunoanalýza (ECLIA) [68].

Luminiscencia nastáva po absorpcii žiarenia, energie z chemickej reakcie alebo iného druhu energie molekulou obsahujúci luminofór, pri emisii tejto energie vo forme fotónov. Molekuly po absorpcii žiarenia excitujú do vyššieho energetického stavu, prejaví sa to prechodom valenčných elektrónov do vyšších energetických hladín a vibračnou excitáciou väzieb v molekule. Štruktúry absorbujúce elektromagnetické žiarenie za následného vyžiarovania svetla, luminiscencie, nazývame luminofóry. Taktiež lumiscenciu charakterizujeme ako prebytok žiarenia nad tepelným vyžarovaním telesa, toto žiarenie ma konečnú dobu trvania.

Imunoanalytické metódy s detekciou luminiscenčného žiarenia rozdeľujeme na dve skupiny, prvá skupina metód využíva ako indikátor priamo luminofór na antigéne alebo protilátke, druhá skupina metód využíva luminofór ako substrát, reagujúci za katalýzy enzýmu, ktorý produkuje luminiscenčné žiarenie [68, 76, 77].

a) Chemiluminiscencia

Chemiluminiscencia je emisia elektromagnetického žiarenia v priebehu chemických reakcií. Luminiscencia vzniká nepriamou premenou chemickej energie na svetelnú energiu cez excitovaný stav. Energia, ktorá sa uvoľní z chemickej reakcie prevedie molekuly do

excitovaného stavu a následne prechádzajú tieto molekuly do základného stavu, pri ktorom sa vyžiaria fotóny. Vlnová dĺžka vyžiarených fotónov je úmerná rozdielu energie excitovaného a základného stavu molekuly. Excitovaná molekula ne stráca svoju energiu len vyžiarením fotónu ale tiež nežiarivými procesmi, ako je napr. kolízna deaktivácia, vnútorná konverzia, alebo môže dochádzať k iným chemickým reakciám. Pri reakciách nevzniká takmer žiadne teplo, preto toto svetlo, ktoré vzniká pri chemických reakciách nazývame studené svetlo. Chemiluminiscenčné reakcie sú na báze redoxného charakteru [78, 79].

Homogénna chemiluminiscencia

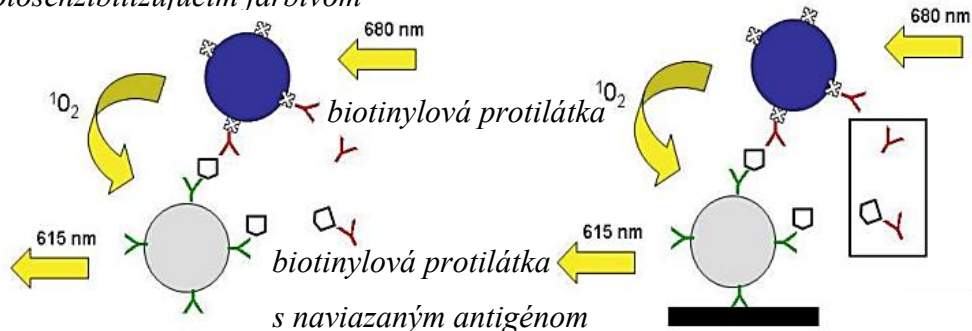
Homogénna chemiluminiscencia založená na prenosu kyslíka (LOCI) je emisia elektromagnetického žiarenia počas chemickej reakcie. Používa sa hlavne na stanovenie markerov je malignity najmä v sendvičovom usporiadaní (*obr. č.16*) [80].

Pri použití tejto metódy sa používajú dve latexové guľičky, kde prvá nazývaná chemibeads je potiahnutá monoklonálnou špecifickou protilátkou proti stanovovanému antigénu, obsahujúca chemiluminiscenčné farbivo. Druhá latexová guľička, nazývaná sensibeads, pokrytá streptavidínom a obsahuje fotosenzibilizačné farbivo, generujúce singletový kyslík. Neskôr do reakcie vstupuje biotinylová protilátka, ktorá je špecifická proti stanovovanému antigénu. Analyt je inkubovaný s touto protilátkou a chemibeads, pri čom dôjde k vytvoreniu sendvičového komplexu. Tento komplex je zložený z monoklonálnej protilátky naviazanej na latexovej guľičke, analytu a biotinilovej protilátky. Pridá sa sensibeads so streptavidínom a naviaže sa na biotín, čím sa vytvorí imunokomplex s oboma latexovými guľičkami [81].

Komplex sa ožiari svetlom o vlnovej 680 nm a z fotosenzibilizačného farbiva na latexovej guľičke sensibeads sa uvoľní singletový kyslík a ten reaguje s chemiluminiscenčným farbivom, ktoré obsahuje latexová guľička chemibeads za vzniku chemiluminiscenčnej reakcie. Pri vlnovej dĺžke 612 nm je meraná luminiscencia priamo úmerne koncentrácií nádorového markeru vo vzorku [81, 82, 83].

latexová guľička so streptavidínom

a fotosenzibilizujúcim farbivom



latexová guľička s protilátkou

a chemiluminiscenčným farbivom

VZNIK KOMPLEXU

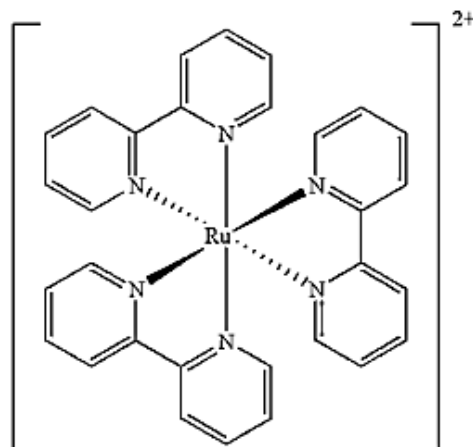
PREMÝVACÍ PROCES LOCI

Obrázok 16: Princíp metódy LOCI [81]

Elektrochemiluminiscencia

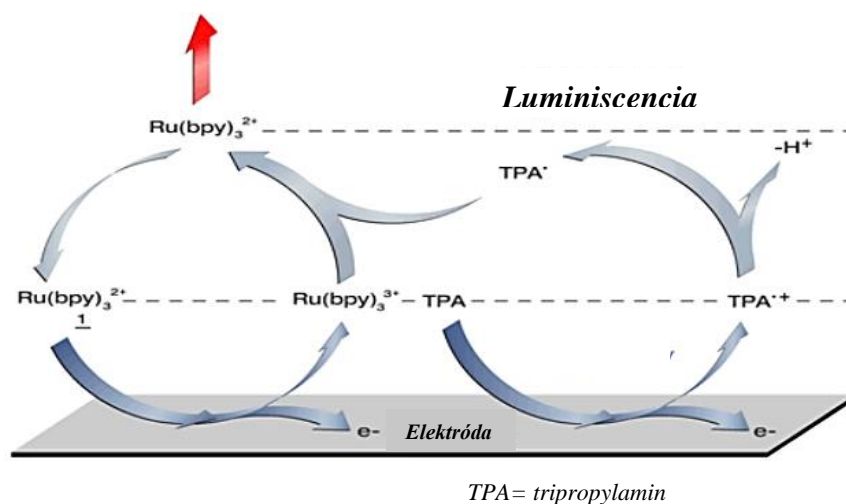
Elektrochemiluminiscenčná reakcia (ECLIA) je modifikáciou chemiluminiscencie, kedy je luminescenčné žiarenie generované chemickými reakciami, iniciované elektrochemicky. Najčastejšie sa ako elektrochemiluminofóry používajú cheláty ruthénia, prípadne rhodia či osmia. Elektroluminofór je oxidovaný na povrchu anódy, ktorá je zo zlata alebo platiny [84].

V dnešnej dobe patrí medzi najvýznamnejší tris(2,2-bipyridyl)ruthenium $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (obr. č.17), používaný ako luminescenčná značka. Komplex vykazuje vysoké kvantové výťažky a je možné ho ľahko naviazať na mnoho bielkovín, nukleových kyselín atď. Taktiež je veľmi dobre rozpustný vo vode a aj v iných roztokoch [85].



Obrázok 17: Štruktúra tris(2,2-bipyridyl)ruthenia [86]

Reakcia prebieha na pevnej fázy, zloženej z magnetických častíc, na ktorých je naviazaný streptavidín. Keď reakcia prebehne, magnetické častice sa prichytia na permanentný magnet. Na elektródy je privádzaný elektroimpulz a následne je zahájená elektrochemická reakcia. Počas reakcie je oxidovaný komplex Ru^{2+} na Ru^{3+} . Cyklickosť reakcie udržiava triptomylamin, ktorý je tiež oxidovaný a následne redukovaný (obr. č.18) [70, 86].



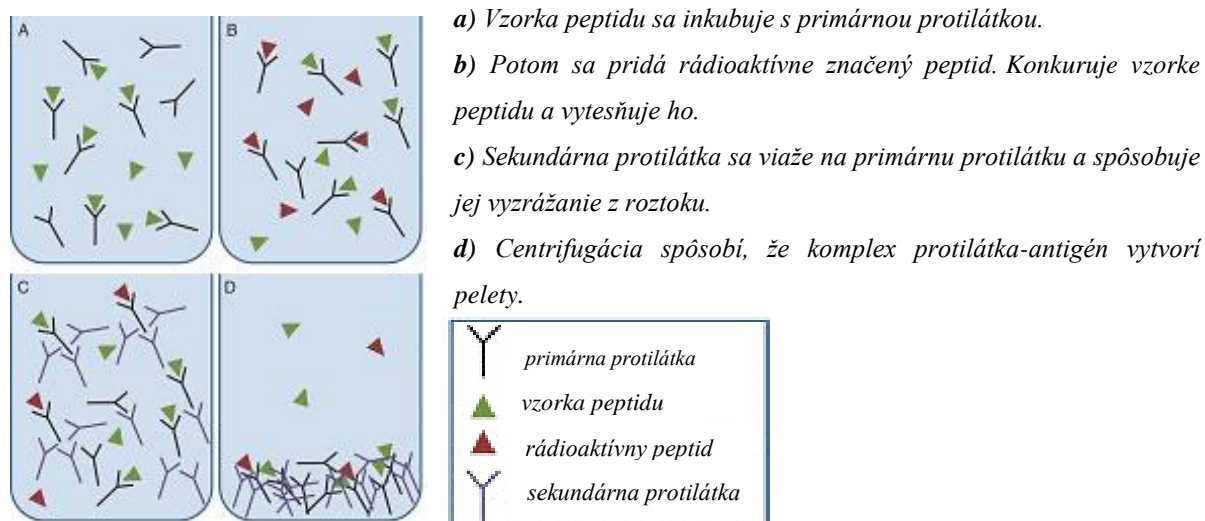
Obrázok 18: Princíp reakcie ECLIA [96]

3. Rádioimunoanalýza

Radioimunoanalýza (RIA) je technika, používaná na stanovenie koncentrácie peptidových, nepeptidových hormónov, liekov, enzýmov, vírusov, bakteriálnych antigénov a iných organických biologických látok v krvi. Patrí medzi prvé metódy, ktoré využívala značenie imunoreaktantov, ktoré sú kotvené na pevnej fázy. Zahrňuje radioizotopovú mikroanalýzu, ktorej základom je reakcia antigénu so špecifickou protilátkou. Za RIA označujeme kompetitívne heterogénne metódy, ktoré prebiehajú v prítomnosti vhodného rádionuklidu. Pôvodne sa využíval rádionuklid ^{131}I , avšak mal krátky polčas rozpadu a bol nahradený stálejšou formou ^{125}I , čím sa označovali bielkoviny alebo thyroidné hormóny. Medzi ďalšie rádioizotopy využívané v radioimunoanalýze patria ^{14}C , ^{75}Se , ^3H [69, 70].

Pri kompetitívnej reakcii analyt obsahuje požadovaný antigén, komplementárnu protilátku a rádioaktívne označenú verziu antigénu a prebieha in vitro. Vzorka antigénu a protilátky sa inkubujú spolu, čo umožní antigénu vzorky naviazať sa na protilátku. Potom sa pridá rádioaktívne značený antigén. Rádioaktívne označený antigén súťaží s antigénom vzorky a vytesňuje ho z protilátky. Čím viac antigénu vo vzorke je prítomné, tým menej je

rádioaktívne označený antigén schopný viazať sa na protilátku. Keďže roztok obsahujúci komplex antigén-protilátka je hustejší ako roztok obsahujúci voľný antigén, centrifugácia tejto zmesi umožňuje separáciu, výsledkom čoho je peleta obsahujúca naviazanú vzorku antigén - rádioaktívne značený antigén. Meraním rádioaktivity pelety je možné určiť množstvo rádioaktívne značeného antigénu, ktorý sa naviazal na protilátku, a teda aj koncentráciu antigénu vo vzorke (obr. č.19). Nekompetitívnu imunoradiometrickú analýzu označujeme IRMA [87].



Obrázok 19: Princíp metódy-RIA [87]

RIA sa vyznačuje vysokou citlivosťou v rozmedzí nanogramov až pikogramov a presnosťou, čo umožňuje používať len malé objemy analytu 10-100 μ l. Nevýhody RIA sa týkajú použitia rádioaktívneho značenia, zvyčajne ^{125}I a teda krátkej skladovateľnosti. Tieto testy nepoužívajú enzýmy a tým sa znižuje riziko interferencie zo samotnej vzorky [88].

a) Imunoradiometrická analýza

Imunoradiometrická analytická metóda (IRMA) je podobná rádioimunoanalýze, ale využíva dvoch protilátok, jednej neznačenej protilátky a druhej značenej protilátky rádioaktívnym izotopom ^{125}I . Analyt sa pridá do skúmavky, ktorá obsahuje neznačené protilátky. Stanovovaná látka sa imobilizuje naviazaním na protilátky, nachádzajúcej sa na stene skúmavky. Vzniká komplex stanovovaná látka a protilátka, neskôr sa po odsatí zvyškového roztoku pridá roztok so značenými protilátkami, reagujúcimi s so vzniknutým komplexom. Na každý vzniknutý komplex je naviazaná práve jedna značná protilátka, čím je možné pomocou rádioaktivity určiť koncentráciu stanovovanej látky [88].

b) Fluorescenčná imunoanalýza

Fluorescenčná imunoanalýza (FIA) patrí do metód využívajúcich ako indikátory reakcie fluoreskujúce látky, ktoré obsahujú fluorofóry. Imunoanalýzu je možné rozdeliť medzi kompetitívne a nekompetitívne usporiadania. Medzi kompetitívne metódy patrí fluorescenčná polarizačná imunoanalýza (FPIA), ktorá využíva meranie vertikálne polarizovaného fluorescenčného žiarenia. Modifikácia FIA je napr. aj zosilnená homogénna fluorescenčná imunoanalýza (TRACE) či zosilnená predĺžená fluorescenčná heterogénna imunoanalýza (DELFI) [89].

Homogénna fluorescenčná imunoanalýza sa využíva na analýzu malých molekúl. Heterogénna fluorescenčná imunoanalýza oddeľuje nepotrebné sérové analyty z reakcie pred meraním intenzity fluorescence. Metóda sa aplikuje aj v kompetitívnej aj nekompetitívnej podobe. Polyakrylamínové guľičky s kovalentnou viazanou protilátkou alebo antigénom sa používajú ako pevná fáza. Najskôr sa zmieša stanovované sérum s označeným antigénom fluoresceinom a následne sa zmes oboch antigénov pridá ku guľičke s naviazanou protilátkou. Po prebehnutí reakcie sa voľná frakcia oddelí a meria sa fluorescencia [90].

Fotoluminiscencia je dej, ktorý vzniká po absorpcii energie vo forme excitačného žiarenia molekulou, ktorá obsahuje fluorofór s následným vyžiarení fotónov s dlhšou vlnovou dĺžkou. Rozdeľujú sa na fluorescenciu, oneskorenú fluorescenciu a fosforescenciu. Deexcitácia molekuly vzniká žiarivými prechodmi ako je fotoluminiscencia alebo nežiarivými prechodmi, kam zaraďujeme vnútornú konverziu, vibračnú relaxáciu a medzi systémové prechody [91].

Aby látka mala schopnosť fotoluminiscencie je potrebné aby štruktúra absorbovala ultrafialové alebo viditeľné žiarenie. Látky absorbujúce elektromagnetické žiarenie vo viditeľnej a ultrafialovej oblasti nazývame flurofóry alebo fosforofóry. Čím viac má látka schopnosť absorpcie žiarenia, tým väčšia bude následná intenzita fotoluminiscencie [69, 91]

Medzi najpoužívanejšiu fluoreskujúcu látku patrí fluorescein a jeho deriváty ako je napr. fluorescein-5-isothiokyanát (FITC) a tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát, tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát (TRITC) [69].

FITC má vlnovú dĺžku excitačného žiarenia 492 nm a emisné maximum 520 nm. Pri týchto vlnových dĺžkach interferujú niektoré analyty, čo sa pri analýze krvného séra prejaví zhasením. V bioanalýze krvného séra sa vyskytuje fluorescencia aj z iných prirodzených zdrojov v sére, čo vedie pri podobných vlnových dĺžkach maxim k horšiemu rozoznaniu značených fluorofórov [92].

2 CIEĽ PRÁCE

- 1) *Spracovanie patientskych vzorkov.*
- 2) *Analýza vybraných markerov ako ukazovateľov rozlíšenia CaP a BHP.*
- 3) *Rozlíšenie malígneho a benígneho ochorenia prostaty na základe PSA, fPSA a PHI ako indikátorov v diagnostickom procese pri výkone biopsie.*
- 4) *Poukázanie na možnú súvislosť NSE ako prognostického markera karcinómu prostaty.*
- 5) *Štatistické spracovanie nameraných dát.*

Hypotézy

- 1) *Rast hodnôt PSA s vekom, bez ohľadu prítomnosti CaP.*
- 2) *Korelácia rastu hodnôt NSE a PSA, keďže neuroendokrinné bunky neexprimujú androgénne receptory, čím dochádza k stimulácií proliferácií buniek CaP.*

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Prístroje a vybavenie

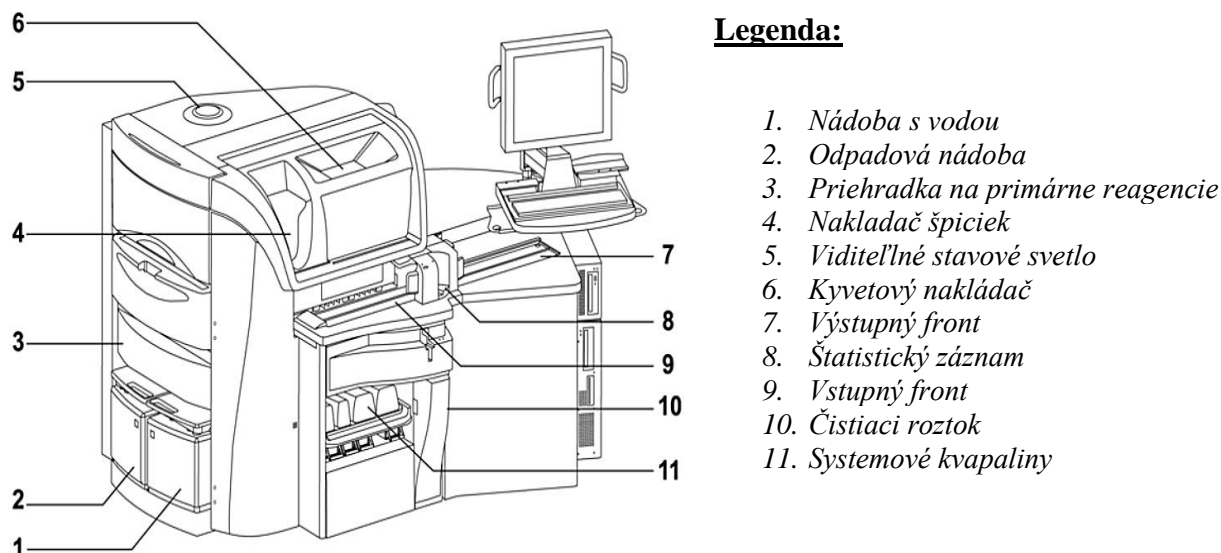
- Analyzátor Advia Centaur XPT (Siemens, Japonsko)
- Analyzátor Acces 2 Immunoassay system (Beckman Coulter, Kalifornia)
- Analyzátor Cobas e 411 (Roche, Švajčiarsko)
- Centrifúga Eppendorf 5720 (Nemecko)
- Centrifúga Ohaus frontier 5714 (USA)
- Bežné vybavenie laboratória (uzávery na skúmavky, reakčné skúmavky, skúmavky, pipety, kadičky, odmerné valce, špičky)

3.1.1 Advia Centaur XPT

Analyzátor (*obr. č.20*) pracuje na princípe heterogénnej imunoanalýzy s chemiluminiscenčnou detekciou (značkovacia látka - Acridinium ester), určený na diagnostiku v oblasti tumorových markerov - PSA, cPSA, CEA, AFP, BR (27.29), CA 15-3, CA 19-9, CA 125 II, HER-2/neu, kongenitálnej diagnostiky, reprodukčnej endokrinológie, tyreoidálnej diagnostiky, kardiomarkerov, anémií, hepatitíd a HIV, diabetológie, špecifických IgE a na monitorovanie hladín liečiv v telových tekutinách. Vhodné typy vzoriek pre systém sú sérum, plazma a moč v závislosti od druhu testu. Analyzátor je vhodný pre každý typ skúmavky. Kontrola integrity reagentie zahŕňa identifikáciu cez čiarový kód, kontrolu a hlásenie dostupnosti reagentie a stability na board, kontrolu zostávajúceho počtu testov, sledovanie a následne hlásenie kalibračného intervalu, hlásenie doby expirácie [97].



Obrázok 20: Analyzátor Advia Centaur XPT [97]



Legenda:

1. Nádoba s vodou
2. Odpadová nádoba
3. Priehradka na primárne reagentie
4. Nakladač špiciek
5. Viditeľné stavové svetlo
6. Kyvetový nakladač
7. Výstupný front
8. Štatistický záznam
9. Vstupný front
10. Čistiaci roztok
11. Systemové kvapaliny

Obrázok 21: Schéma analyzátoru Advia Centaur XPT [96]

3.1.2 Kalibrácia Advia Centaur XPT

Analýza ADVIA Centaur PSA a fPSA si vyžaduje kalibráciu teoretickej krivky pri použití nového čísla šarže reagentie a pevne fázy. Pred podaním nového setu reagentií do prístroja sa odčítava QR kód testu, na ktorom sú spísané všetky informácie o teste, šarži, trvanlivosti a je tam uvedená teoretická krivka (Master curve definition). Kalibračný set musí byť kompatibilný s daným reagenčným testom. Tento set má v prílohe čiarový kód, ktorý sa načíta pred kalibráciou a sú na ňom zaznačené koncentrácie kalibrátora. Kalibračné séra pred kalibráciou vytemperujeme na teplotu 20 °C a sú stabilné do dátumu expirácie.

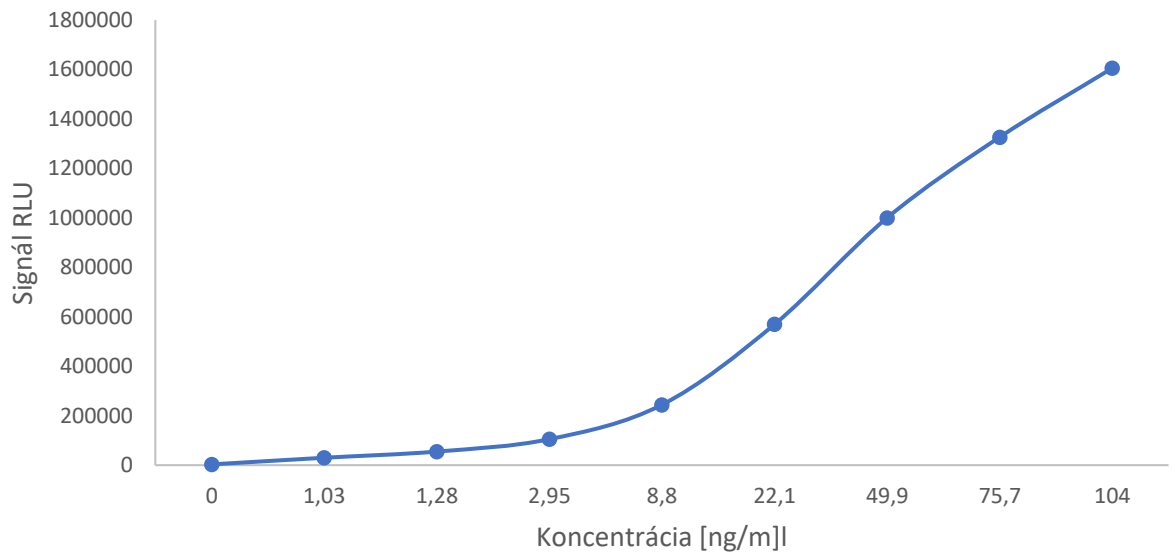
Stanovenie kalibrácie sa vykonáva pomocou dvoch kalibrátorov nízkym (low) a vysokým (high). Kalibrácia sa potvrdí teoretickou krivkou.

1) Kalibrácia PSA

Kalibračná krivka pre chemiluminiscenčnú metódu je deväťbodová nelineárna funkcia zobrazená na grafe č.2. Závislosť signálu relatívnej jednotky svetla (RLU) na koncentrácií PSA je v tabuľke č.5.

Tabuľka 5: Kalibračné hodnoty stanovenia PSA

Koncentrácia [ng/ml]	0,0	1,030	1,280	2,950	8,800	22,10	49,90	75,70	104,0
RLU	3056	29910	55023	105060	244282	569581	100288	1326764	1605679



Graf 2: Kalibračná krivka PSA

- **Kontrola kvality**

Na monitorovanie výkonu systému je potrebné analyzovať dve koncentrácie materiálu na kontrolu kvality každý deň. Spoločnosť Siemens Healthcare Diagnostic odporúča používať komerčne dostupné materiály s nízkou a vysokou koncentráciou. Na túto kalibráciu PSA sa využil kalibrátor ADVIA Centaur Calibrator Q (tab. č.6). Uspokojujúca úroveň výkonu sa dosiahne vtedy, keď získané hodnoty analytu sú v rámci prijateľného kontrolného rozsahu [98].

Tabuľka 6: Hodnoty kalibrátorov pre stanovenie PSA

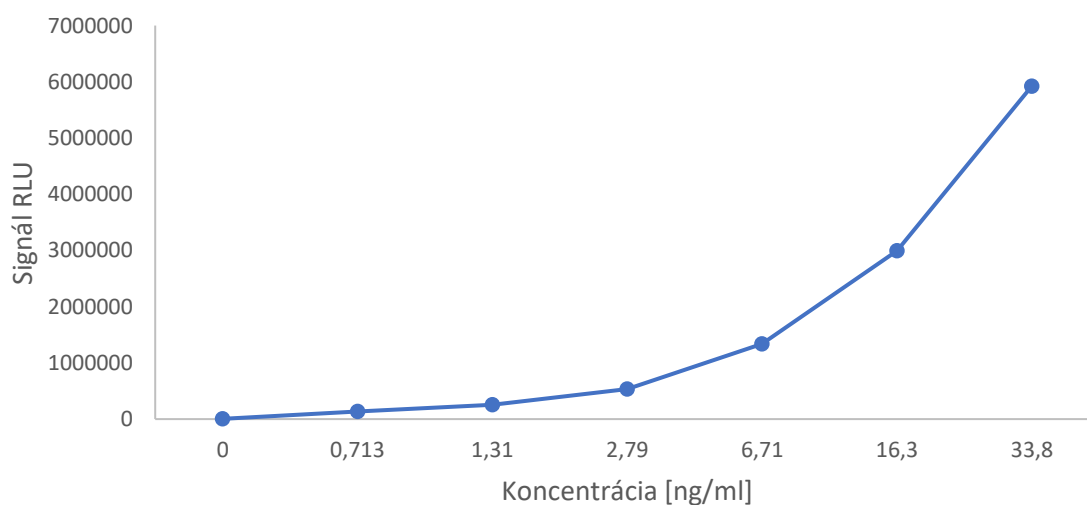
Kalibrátory		
	HIGH	LOW
Koncentrácia [ng/ml]	63,10	0,00
CV [%]	3,391	6,775
Akceptované CV [%]	7	10,8
Hodnota kalibrácie	111,777	1,298
Definované rozmedzie hodnoty kalibrácie	5,539 – 1102,261	0,330 – 4,070
Kalibračná odchýlka	0,384	-0,177
Definované rozmedzie kalibračnej odchýlky	-1,170 – 0,570	-1,170 – 0,570

2) Kalibrácia fPSA

Krivka kalibrácie je zobrazená na grafe č.3 pomocou siedmych bodov. Závislosť koncentrácie fPSA a RLU je v tabuľke č.7.

Tabuľka 7: Kalibračné hodnoty pre stanovenie fPSA

Koncentrácia [ng/ml]	0,0	0,7130	1,31	2,790	6,710	16,30	33,80
RLU	4808	137040	256027	535458	1337986	2991745	5922009



Graf 3: Kalibračná krivka fPSA

- **Kontrola kvality**

Tak ako aj pri PSA tak aj pri fPSA sa na monitorovanie výkonu systému využívajú dve koncentrácie. Na túto kalibráciu fPSA sa využil kalibrátor ADVIA Centaur Calibrator fPSA (tab. č.8), pri ktorom sa dostatočná úroveň výkonu sa dosiahne vtedy, keď získané hodnoty analytu sú v rámci vyhovujúceho kontrolného rozsahu.

Tabuľka 8: Kalibrátory pre stanovenie fPSA

Kalibrátory		
	HIGH	LOW
Koncentrácia [ng/ml]	14,6	0,0
CV [%]	0,090	0,545
Akceptované CV [%]	3,4	12
Hodnota kalibrácie	743,905	1,191
Definované rozmedzie hodnoty kalibrácie	408,695 – 1926,705	0,330 – 4,070
Kalibračná odchýlka	- 0,123	-0,350
Definované rozmedzie kalibračnej odchýlky	-1,170 – 0,570	-1,170 – 0,570

3.1.3 Analýza prostatického voľného antigénu a jeho voľnej frakcie

1) Stanovenie PSA

Tabuľka 9: Analytické parametre stanvenia PSA [98]

Typ vzorky	Sérum	
Analytický rozsah merania	0,01-100 ng/ml (µg/l)	
Stabilita reagentie	28 dní	
Interferencia vykazujúca < 5% zmenu vo výsledkov do	<i>Hemolyzované</i>	500 mg/dl hemoglobínu
	<i>Lipemické</i>	1000 mg/dl triglyceridov
	<i>Ikterické</i>	40 mg/dl bilirubínu

- **Reagencie**

Tabuľka 10: Reagencie analýzy PSA [98]

	Reagencia	Objem	Opis	Skladovanie
<i>Primárne reagencie</i>	ADVIA Centaur PSA ReadyPack, reagencia Lite	10 ml/balenie reagencií	Polyklonálna kozia protilátka proti PSA (77ng/ml) označená esterom akridínu v pufovanom fyziologickom roztoku s konzervačnými látkami	2-8 °C
	ADVIA Centaur PSA ReadyPack, reagencia pevnej fázy	25 ml/ balenie reagencií	Monoklonálna myšia protilátka proti PSA (25µg/ml) kovalentne spojená s paramagnetickými časticami v pufovanom fyziologickom roztoku s konzervačnými látkami	2-8 °C
<i>Prídavné reagencie</i>	ADVIA Centaur ReadyPack, viacúčelový Multi-Diulent 2, viacúčelový riediaci roztok 2	10 ml/balenie reagencií	Kozie sérum s azidom sodným (<0,1%) a konzervačnými látkami	2-8 °C
	ADVIA Centaur Multi-Diulent 2, viacúčelový riediaci roztok 2	50 ml/flaštička	Kozie sérum s azidom sodným (< 0,1%) a konzervačnými látkami	2-8 °C

- **Princíp stanovenia**

Analýza ADVIA Centaur PSA je dvojmiestna sendvičová imunoanalýza s použitím chemiluminometrickej technológie, ktorá využíva konštantné množstvá dvoch protilátok. Prvá protilátka, ktorá sa nachádza v reagencií Lite, je polyklonálna kozia protilátka proti PSA označená esterom akridínu. Druhá protilátka nachádzajúca sa v pevnej fázy je monoklonálna myšia protilátka proti PSA kovalentne spojená s paramagnetickými časticami [98].

- **Príprava vzoriek**

Analýza vyžaduje na jedno stanovenie 35 µl vzorky. Pred vložením do systému je nutné sa presvedčiť či vzorka neobsahuje fibrín a ani iné častice, ktoré sa odstránia centrifugáciou pri 1000 g počas 15-20 minút. Vzorky, ktoré sa skladovali pri laboratórnej teplote dlhšie ako 8 hodín by sa nemali používať. Pri nedokončenej analýze v priebehu 8 hodín, sa vzorky pevne uzatvoria a vložia do chladničky s teplotou 2-8 °C. Neanalyzovaná vzorka v priebehu 48 hod., sa musí uchovávať pri teplote -20 °C [98].

- **Riedenie**

Objem vzorky potrebný na vykonanie riedenia v prístroji sa líši od objemu vzorky potrebného na vykonanie jedného stanovenia. Riedia sa najmä vzorky séra s hladinou celkového PSA vyššou ako 100 ng/ml (100 µg/l) a opätovne analyzujú. Na riedenie vzoriek pacientov sa využíva Multi-Diulent 2 [98].

Tabuľka 11: Riedenie pri analýze PSA [98]

Riedenie	Objem vzorky (µl)
1 : 2	75
1 : 5	30
1 : 10, 1 : 50, 1 : 100	40

2) Stanovenie fPSA

Tabuľka 12: Analytické parametre stanovenia fPSA [99]

Typ vzorky	Sérum	
Analytický rozsah merania	0,01-25 µg/l	
Stabilita reagensie	28 dní	
Interferencia vykazujúca < 5% zmenu vo výsledkoch do	<i>Hemolyzované</i>	1000 mg/dl hemoglobínu
	<i>Lipemické</i>	1000 mg/dl triglyceridov
	<i>Ikterické</i>	25 mg/dl konjugovaného bilirubínu
		25 mg/dl nekonjugovaného bilirubínu

- **Reagencie**

Tabuľka 13: Reagencie analýzy fPSA [99]

	Reagencie	Objem	Opis	Skladovanie
<i>Primárne reagencie</i>	ADVIA Centaur fPSA ReadyPack, reagencia Lite	58 ml/ balenie reagencií	Monoklonálna myšacia protilátka anti-PSA (200 ng/ml) označená akridinium esterom v pufrovanom fyziologickom roztoku s konzervačnými látkami	2-8 °C
	ADVIA Centaur fPSA ReadyPack, reagencia pevnej fázy	11,4 ml/ balenie reagencií	Monoklonálna myšacia protilátka anti-fPSA (2,5 µg/ml) naviazanú na paramagnetické častice v pufrovanom fyziologickom roztoku s konzervačnými látkami	2-8 °C
<i>Prídavné reagencie</i>	ADVIA Centaur ReadyPack, Multi-Diulent 2	10 ml/ balenie reagencií	Kozie sérum s azidom sodným (<0,1%) a konzervačnými látkami	2-8 °C

- **Princíp stanovenia**

Analýza ADVIA Centaur fPSA je analýza kvantitatívneho merania *in vitro* fPSA v ľudskom sére. Na princípe dvojmiestnej sendvičovej imunoanalýzy s použitím priamej chmiluminometrickej technológie, ktorá používa konštantné množstvo dvoch monoklonálnych myšacích protilátok. Prvá protilátka v reagencií Lite, je protilátka anti-PSA značená akridinium esterom. Druhá protilátka sa nachádza v pevnej fáze, ktorá je proti voľnému PSA označená biotínom a naviazaná na streptavidínové paramagnetické častice [99].

- **Príprava vzoriek**

Na jedno stanovenie si analýza vyžaduje 30 µl. Vhodným materiálom pre analýzu je sérum, stanovenie v plazme sa nedoporučuje. Vzorky sú stabilné 8 hodín pri laboratórnej teplote a 2 dni pri teplote 2-8 °C. Pri prípadnom dlhšom skladovaní je nutné vzorky zamraziť na teplotu -20 °C. Výsledky s hodnotami vyššími ako 25 µg/l je potrebné nariediť ručne a zopakovať analýzu [99].

3.1.4 Access 2 Immunoassay system

Access 2 Immunoassay system (*obr. č.22*) je automatizovaný analyzátor, ktorý využíva chemiluminiscenciu na analýzu telesných tekutín. Stanovenie prebieha kvantitatívne aj kvalitatívne in vitro testmi. Luminometer zabudovaný v systéme meria výsledne relatívne svetelné jednotky (RLU) a systém to prevedie na výsledok [100].



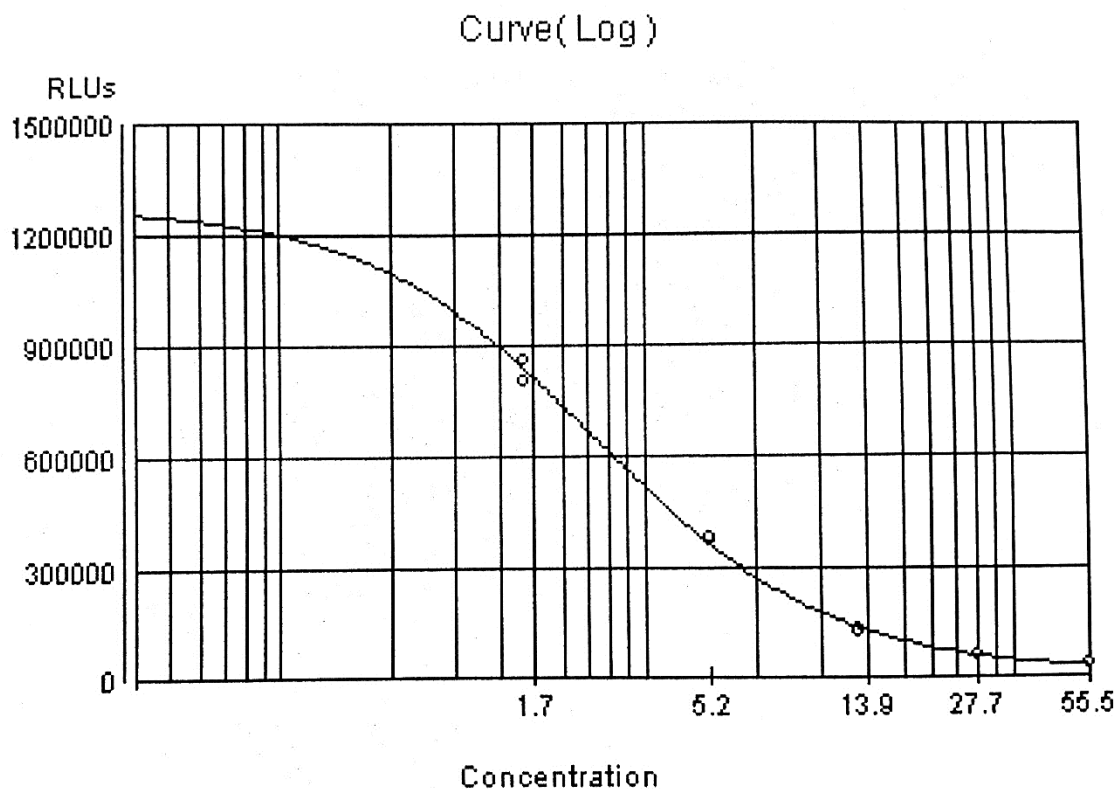
Obrázok 22: Analyzátor Access 2 Immunoassay system [101]

3.1.5 Kalibrácia Acces 2 Immunoassay system

Kalibračná krivka súpravy Acces testosterone calibrators je nelineárna šesťbodová závislosť signálu RLU na koncentrácií (ng/ml) (*tab. č.14, graf č.4*). Použitá kalibračná súprava musí byť pred analýzou vytemperovaná na 20-25 °C. Pri stanovení Access testosterone a vyžaduje kalibráciu každých 14 dní.

Tabuľka 14: Kalibračná tabuľka pre stanovenie testosterónu

	Stanovená koncentrácia [nmol/l]	RLU	SD	CV %	Vypočítaná koncentrácia [nmol/l]
S0	0,0	1296080			-
S0	0,0	1250150			0,13
Priemer		1273115,00	32477,41	2,55	0,13
S1	1,63	851367			1,53
S1	1,63	794565			1,77
Priemer		822966,00	40165,08	4,88	1,65
S2	5,20	360949			5,09
S2	5,20	369601			4,97
Priemer		365275,00	6117,89	1,67	5,03
S3	13,18	123081			13,61
S3	13,18	118155			14,09
Priemer		120618,00	3483,21	2,89	13,85
S4	27,39	53267			27,82
S4	27,39	52997			27,95
Priemer		53131,50	190,92	0,36	27,88
S5	55,48	25895			54,48
S5	55,48	25513			55,32
Priemer		25703,95	270,33	1,05	54,90



Graf 4: Kalibračný graf testosterónu

- **Kontrola kvality**

Materiály kontroly kvality stimulujú charakteristické vlastnosti patientskych vzorkov a sú potrebné pre sledovanie funkčných charakteristík imunochemických stanovení. Vzorky môžu byť spracované skôr v režime „random access“ než v režime po metódach „batch“, preto sa zaraďujú kontroly kvality každých 24 hodín. Používajú komerčné materiály kontroly [102].

Nepresnosť

Stanovenie vykazuje celkovú nepresnosť $\leq 20\%$ pri koncentráciách testosterónu 0,5 ng/ml a $< 10\%$ pri koncentráciách 2-10 ng/ml (*tab. č.15*) [102].

Tabuľka 15: Nepresnosť stanovenia Access immunoassay [102]

Vzorka	Celkový priemer N=40 [ng/ml]	V rámci stanovenia (Within Run) CV %	Medze stanovenia (Between run) CV%	Celková nepresnosť
1	0,35	3,93	7,08	8,10
2	0,83	2,98	4,51	5,36
3	2,25	1,67	4,78	5,07
4	5,38	1,99	4,22	4,67
5	8,31	2,14	4,91	5,36
6	12,88	2,71	5,65	6,26

3.1.6 Analýza testosterónu

1) Stanovenie testosterónu

Tabuľka 16: Analytické parametre stanovenia testosterónu [102]

Typ vzorky	Sérum	
Analytický rozsah merania	0,1-16 ng/ml	
Stabilita reagensie	28 dní	
Interferencia vykazujúca < 5% zmenu vo výsledkoch do	<i>Hemolyzované</i>	1000 mg/dl hemoglobínu
	<i>Lipemické</i>	1800 mg/dl triglyceridov
	<i>Ikterické</i>	10 mg/dl konjugovaného bilirubínu
		10 mg/dl nekonjugovaného bilirubínu

- **Reagencie**

Tabuľka 17: Reagencie analýzy testosterónu [102]

Reagencie	Opis	Skladovanie
R1a	Paramagnetické častice potiahnuté kozou protilátkou proti myšiemu IgG, konjugát testosterónu s alkalickou fosfatázou, hovädzí sérový albumín (BSA), azid sodný < 0,1% a ProClin** 300 0,1%.	2-10 °C
R1b	Roztok Sample Treatment Solution, azid sodný < 0,1%.	2-10 °C
R1c	Monoklonálna myšia protilátka proti testosterónu, proteín (BSA, myši, kozí), azid sodný < 0,1%, ProClin 300 0,1%.	2-10 °C

- **Princíp stanovenia**

Access Testosteron je kompetitívne väzobné imunoenzymatické stanovenie. Vzork sa pridá do reakčnej kyvety spolu s roztokom Sample Treatment Solution, konjugátom, myšou monoklonálnou protilátkou proti testosterónu s alkalickou fosfatázou a paramagnetickými časticami potiahnutými kozou polyklonálnou protilátkou proti myšiemu IgG. Účinkom roztoku sa viazaný testosterón vo vzorku uvoľňuje z väzobných proteínov a súťaží s konjugátom testosterónu s alkalickou fosfatázou o väzobná miesta na obmedzenom množstve špecifickej monoklonálnej protilátky proti testosterónu. Výsledný komplex antigén-protilátka sa naviaže na záchytnú protilátku na pevnej fáze. Po inkubácii v reakčnej kyvete sa látky nenaviazané na pevnú fázu odstránia separáciou v magnetickom poli a premytím. Do reakčnej kyvety sa pridá chemiluminiscenčný substrát Lumi-Phos* 530 a svetlo generované pri reakcii sa meria luminometrom. Produkcia svetla je nepriamo úmerná koncentrácií testosterónu vo vzorku. Množstvo analytu vo vzorku sa stanoví z uloženej viacbodovej kalibračnej krivky [102].

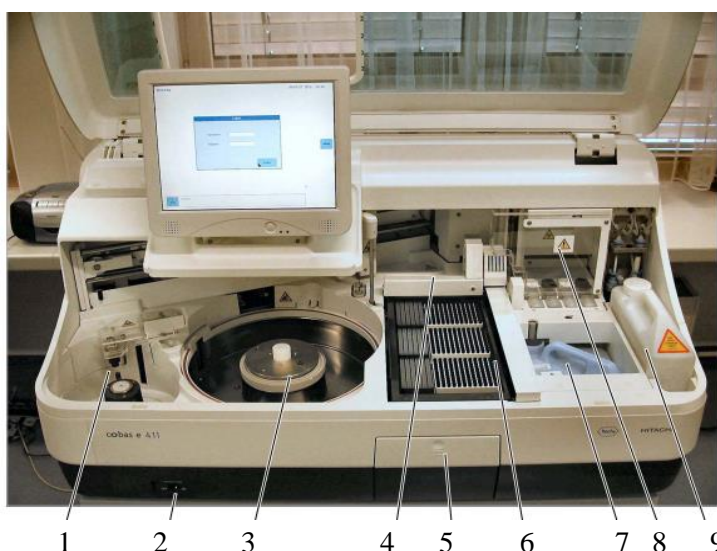
- **Príprava vzoriek**

Doporučenými typmi vzorkov sú sérum a plazma (heparín). Hladiny testosterónu počas dňa kolíše, preto je odporúčané urobiť 3 odbery za hodinu v intervale od 8-10 hodiny. Vzorky séra sa po odstredení nechávajú zraziť a do 2 hodín po odstredení sa prenesie 500 µl vzorky do zásobnej skúmavky. Pri odstredení musia byť odstránené zvyšky fibrínu a bunkové častice. Pri nedokončenej analýze v priebehu 8 hodín, sa vzorky pevne uzatvoria a vložia do

chladničky s teplotou 2-8 °C. Neanalyzovaná vzorka v priebehu 48 hodín je zamrazená na teplote -20 °C. Vzorku sa môže 2x rozmraziť a zmraziť [102].

3.1.7 Cobas e 411

Cobas e 411 (*obr. č.23*) je plne automatizovaný analyzátor, ktorý využíva elektrochemiluminiscenčnú technológiu na imunoanalýzu. Slúži na kvantitatívne aj kvalitatívne stanovenia in vitro testmi, vrátane anémie, kostných, srdcových a nádorových markerov atď. Vyznačuje sa vysokou citlivosťou, spoľahlivosťou a reprodukovateľnosťou. Pipetovanie vzoriek je bez prenosu, na zabránenie krížovej kontaminácií [103, 104].



Legenda:

1. Oblasť vzorku
2. Prevádzkový spínač
3. Oblasť čidla
4. Inkubačná oblasť
5. Oblasť pevného odpadu
6. Oblasť spotrebného materiálu
7. Nádoba na tekutý odpad
8. Oblasť merania
9. Nádoba na vodu systé

Obrázok 23: Analyzátor Cobas e 411 [104]

3.1.8 Kalibrácia Cobas e 411

Dvojbodová kalibrácia (*tab. č.18, graf č.5*) sa vykonáva vždy pre novú šaržu reagenčnej súpravy. Využitý bol kalibrátor CalSet NSE, ktorý bol pred meraním vytemperovaný na teplotu 20-25 °C.

Rekalibrácia sa odporúča

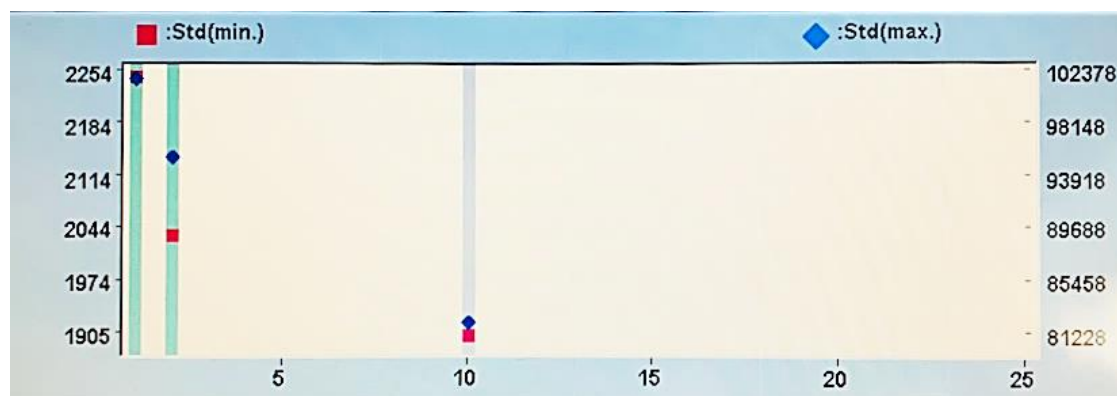
- po 12 týždňoch pri používaní rovnakej šarže
- po 7 dňoch pri používaní rovnakej reagenčnej súpravy v analyzátore
- pri výsledkoch kontroly kvality mimo definovaný rozsah

Tabuľka 18: Kalibračná tabuľka pre stanovenie NSE

Kalibrácia	Signál 1	Signál 2	Target value
1	1906	81229	0,310
2	1909	83795	47,90

Tabuľka 19: Kalibrátor pre stanovenie NSE

Kalibrácia	Signál
Minimum	1907
Maximum	82512



Graf 5: Dvojbodová kalibrácia NSE

- **Kontrola kvality**

Na kontrolu kvality výrobca odporúča PreciControl Tumor Marker (tab. č.20). Kontroly pre rôzne koncentračné rozsahy by mali byť merané v singletoch aspoň raz za 24 hodín, pri stálom používaní súpravy, po zmene súpravy a po každej kalibrácii. Získane hodnoty by sa mali pohybovať v definovaných rozmedziach [105].

Tabuľka 20: Tabuľka presnosti analyzátora Cobas e 411 [105]

Analyzátor Cobas e 411					
		Reprodukovateľnosť		Medziľahlá presnosť	
Vzorka	Priemer [ng/ml]	SD [ng/ml]	CV %	SD [ng/ml]	CV %
Eudské sérum1	2,58	0,08	3,1	0,11	4,4
Eudské sérum2	9,32	0,20	2,1	0,36	3,9
Eudské sérum 3	88,0	2,0	2,3	3,87	4,4
PreciControl TM 1	8,42	0,18	2,1	0,25	3,0
PreciControl TM2	54,6	1,51	2,8	2,05	3,8

3.1.9 Analýza neurón špecifickej enolázy

2) Stanovenie NSE

Tabuľka 21: Analytické parametre stanovenia NSE [105]

Typ vzorky	Sérum	
Analytický rozsah merania	0,050-370 ng/ml	
Stabilita reagensie	12 týždňov	
Interferencia vykazujúca < 5% zmenu vo výsledkoch do	<i>Hemolyzované</i>	Interferencia - erytrocyt obsahuje NSE
	<i>Lipemické</i>	2000 mg/dl triglyceridov
	<i>Ikterické</i>	72 mg/dl konjugovaného bilirubínu

- **Reagensie**

Tabuľka 22: Reagensie analýzy NSE [105]

Reagensie	Objem	Opis	Skladovanie
Streptavidínom potiahnuté mikročastice	6,5 ml/fľaštička	streptavidínom potiahnuté mikročastice, 0.72 mg/ml	2-8 °C
anti-NSE-ab~biotín	10 ml/fľaštička	biotinylované monoklonálne anti-NSE protilátky 18E5 (myšacie) 1.0 mg/l, fosfátový tlmivý roztok 50 mmol/l, pH 7.2	2-8 °C
anti-NSE-ab~Ru(bpy)	10ml/fľaštička	monoklonálne anti-NSE protilátky 84B10 (myšacie) značené ruténiovým komplexom 1.0 mg/l; fosfátový tlmivý roztok 50 mmol/l, pH 7.2	2-8 °C

- **Princíp stanovenia**

Analýza Cobas e 411 NSE je imunochemické *in vitro* kvantitatívne stanovenie v sendvičovom usporiadaní v ľudskom sére. Stanovenie NSE sa využíva na monitorovanie terapie a progresie pacientov s nádorovými ochoreniami, hlavne pri malobunkovom bronchiálnom karcinóme a neuroblastóme. Využíva sa protilátka, ktorá je označená

rutheniovým chelátom, zodpovedajúci za svetelnú emisiu. Chemiluminiscencia je spôsobená tripropylamínom ktorý prenáša elektróny na rutheniový chelát. Prenos sa realizuje po vložení napätia na elektródu a oxidáciou tripropylamínu a rutheniového chelátu. Dochádza tým k redukcií rutheniového chelátu na oxidovanú formu a pri návrate do stabilného stavu sa vyžiaria fotóny. Pomocou konvertoru sa kvantifikujú vyžiarené fotóny, ktoré sú priamo úmerne koncentrácií analytu vo vzorke [105].

- ***Príprava vzoriek***

20 µl séra je odoberané do štandardných odberových skúmaviek alebo do skúmaviek so separačným gélom. Pri tejto analýze nie je vhodné používať na vyšetrenie plazmu. NSE, ktorá je uvoľnená z erytrocytov a trombocytov spôsobuje, že sú namerané zvýšené hodnoty v hemolyzovaných alebo nesprávne scentrifugovaných vzorkách. Vzorky, ktoré obsahujú precipitát sú pred meraním scentrifugované. Nepoužívajú sa tepelne inaktivované vzorky a vzorky s kontrolami stabilizované s azidom [105].

- ***Riedenie***

Tabuľka 23: Riedenie pri analýze NSE [105]

Riedenie	Koncentrácia analytu v zriedenej vzorke (ng/ml)
1 : 2	> 50

4 VÝSLEDKY

4.1 Metodika práce

Táto práca prebiehala od októbra 2021 do apríla 2022, v spolupráci s laboratóriom klinickej biochémie v Kysuckej nemocnici s poliklinikou v Čadci. Do štúdie boli zaradení náhodní pacienti z urologického a onkologického oddelenia nemocnice.

Pacientom bola odobratá krv pre účely stanovenia PSA. Na základe zvýšených hodnôt PSA > 4 ng/ml. Pacientom po biopsií boli vyšetrované hodnoty derivátov PSA ako je fPSA a p2PSA. % fPSA bol vypočítaný pomocou vzorca $\% \text{ fPSA} = (\text{fPSA} / \text{tPSA}) * 100$.

PHI sa vypočítal podľa vzorca $\text{PHI} = (\text{p2PSA} / \text{fPSA}) * \sqrt{\text{PSA}}$. Pacient si vyšetrenie PHI musel hradiť samostatne, pretože poisťovne v Slovenskej republike toto vyšetrenie nepreplácajú. Tieto markery boli zhodnotené vo vzťahu k prítomnosti CaP. Pacientom bola odobratá žilná krv v Kysuckej nemocnici s poliklinikou v Čadci, na základe odporúčania urológa alebo pacientov, ktorí sú už registrovaní v onkologickej ambulancii v nemocnici. Žilná krv bola následne centrifugovaná. Sérum, ktoré sa takto získalo bolo prepipetované do sekundárnych skúmaviek, ktoré sa vložili do analyzátorov. Na analýzu PSA a fPSA boli vzorky odobraté do kyvety analyzátora ADVIA. Navyše bolo potrebné počítať aj s mŕtvym objemom vzorky. Centaur XPT pracuje na princípe heterogénne imunoanalýzy s chemiluminiscenčnou detekciou. Acridinium ester sa využíval ako značkovacia látka pre PSA.

Pacientske vzorky na spracovanie testosterónu sa vyšetrovali na analyzátore Access 2 Immunoassay system pracuje na princípe chemiluminiscencie. Analýza sa vykonávala zo vzorky séra alebo heparinizovanej plazmy, pri čom sa musel pripočítať aj mŕtvy objem vzorky.

Sérum na analýzu NSE, nesmela byť hemolyzovaná, pretože by spôsobovalo zvýšenie hodnôt. Odoberalo sa sérum, ktoré bolo inkubované s biotinylovou monoklonálnou protilátkou a s monoklonálnou protilátkou označenou rutheniovým komplexom, za vzniku sendvičového komplexu. Vzorka bola analyzovaná na analyzátore Cobas e 411, ktorý pracuje na princípe elektrochemiluminiscenčnej imunoanalýzy

Na zhodnotenie výsledkov študovaného súboru (*prílohy 1-3*) bola použitá základná štatistika (aritmetický priemer, medián, minimum, maximum, smerodajná odchýlka a variačný koeficient. Pre lepšiu orientáciu vo výsledkoch je práca doplnená o grafy. Popisná štatistika bola spracovaná v aplikácii Microsoft Excel s využitím funkcií pre základnú

štatistiku, v tomto programe boli spracované aj grafy analýzy PSA a % fPSA. Pre vytvorenie grafov NSE bola použitá štatistická analýza v programe MedCalc verzia 20.104. V tomto programe bola spracovaná aj ROC analýza hodnôt tPSA, % fPSA a PHI. Analýza spočívala v spracovaní senzitivity a špecificity testu, vyhodnotenia plochy pod krivkou (AUC), intervalu spoľahlivosti a smerodajnej odchýlky. Hodnoty boli spracované samostatne a následne porovnané navzájom s použitím metódy DeLonga et al. a výsledky boli zhrnuté do tabuliek a grafov. Diagnostická metóda je tým prospešnejšia pre stanovenie v klinickej praxi, čím je jeho senzitivita a špecificita vyššia. Najkvalitnejší diagnostický test na ROC grafe sa charakterizuje najväčšou AUC.

4.2 Charakteristika súboru pacientov

Celkovej štúdie sa zúčastnilo 90 pacientov z oddelení Kysuckej nemocnice s poliklinikou v Čadci, z toho vzorky od 76 pacientov boli využité na analýzu PSA. Hodnoty z týchto vzoriek boli porovnané na základe veku. U týchto pacientov bola vykonaná biopsia prostaty pri hodnote PSA > 4 ng/ml 28 pacientom. Pri pacientoch s biopsiou boli analyzované vzorky na základe PHI a fPSA s možnosťou vylúčenia nutnosti biopsie. Ďalších 12 vzoriek od pacientov boli využité na zhodnotenie spojitosti PSA s NSE a možnosťou predikcie CaP. Dvaja pacienti boli monitorovaní na základe hormonálnej liečby CaP (*prílohy 4-5*).

4.3 Stanovenie hodnôt PSA na základe vekových skupín pacientov

Vek pacienta patrí pravdepodobne medzi hlavný rizikový faktor CaP. Incidencia tohto ochorenia sa zvyšuje s pribúdajúcim vekom pacienta. Klinický konsenzus prijal hodnoty celkového PSA v sére od < 2,5-3 ng/ml za fyziologickú hranicu pri pacientoch vo veku mladších ako 55 rokov do 60-tého roka muža. Hodnoty PSA rastú priamo úmerne s vekom.

Tabuľka 24: Vek náhodne vybratých pacientov

Vek mužov	Počet	Relatívna početnosť %
	N=76	N=100
>70	38	50
60-69	23	30,263
50-59	11	14,474
40-49	4	5,263
<i>Priemerný vek mužov</i>	70	-
<i>Minimálny vek</i>	46	-
<i>Maximálny vek</i>	90	-
<i>Medián</i>	60,5	-
<i>SD</i>	11,0334	-

Tabuľka 25: Hodnoty PSA náhodne vybratých pacientov

Vek	PSA [ng/ml]					Priemer <i>tPSA</i>	Medián <i>tPSA</i>	SD	CV [%]
	0-2,5	2,6-3,5	3,6-4,5	4,6-6,5	>6,6				
	N=38	N=8	N=7	N=13	N=10				
>70	14	8	3	10	3	3,69	2,805	2,63	71,27
60-69	13	0	3	2	5	3,44	1,89	2,849	82,8
50-59	8	0	1	1	1	2,271	1,06	2,085	91,8
40-49	3	0	0	0	1	2,184	0,845	2,893	132,5
<i>Relatívne zastúpenie</i>	50 %	10,53 %	9,21 %	17,10%	13,16 %	3,36	2,62	2,70	80,36

* hrubšia čiara znázorňuje vekovo špecifické hodnoty PSA

* červené hodnoty označujú možnosť neoplázie, vykonanie biopsie pri hodnotách nad 4 ng/ml

* hrubo označené hodnoty zobrazujú celkové hodnoty priemeru, mediánu, smerodajnej odchýlky a variačného koeficientu hodnôt PSA

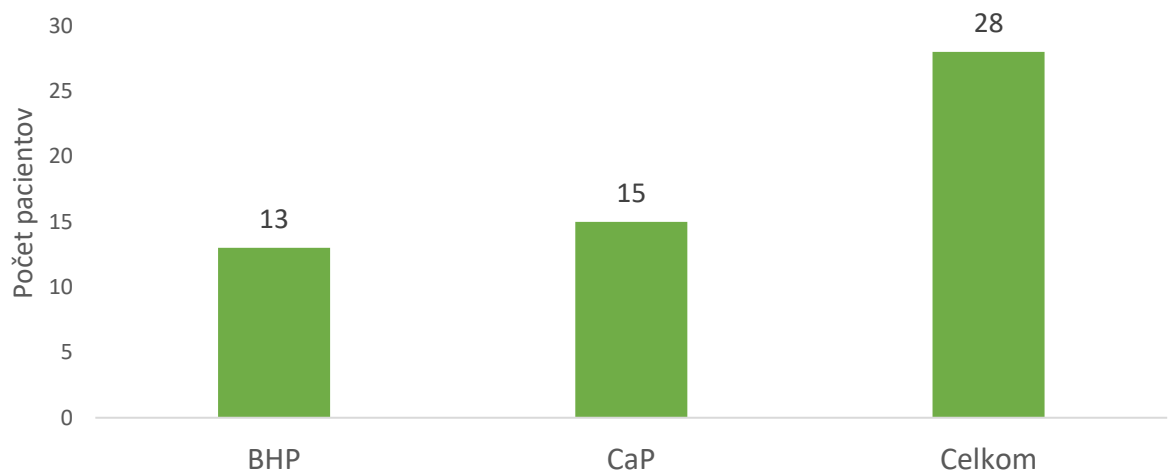
Súbor prieskumu náhodne vybratých pacientov (tab. č.24) bol zastúpený v počte 76 pacientov. Najviac zastúpenou vekovou skupinou pacientov bola veková kategória > 70 rokov v počte 38 pacientov. Druhou početnejšou skupinou bola veková skupina v rozhraní 60-69 rokov zastúpených 23 pacientmi. Veková skupina 50-59 rokov bola zastúpená v počte 11 pacientov a v neposlednom rade bola najmenej zastúpená veková skupina 40-49 rokov v počte 4 pacientov.

Pri poškodení prostatickej bunky sa uvoľňuje PSA vo zväčšenej miere. Hladina však býva zvýšená aj pri nemalígných ochoreniach ako sú zápaly prostaty alebo BHP. Za ešte fyziologickú hladinu PSA sa považuje hodnota do 3,0 ng/ml, avšak treba aj zohľadniť zvyšovanie hladiny PSA s rastúcim vekom. Pri pacientoch > 70 rokov je za fyziologickú hladinu považovaná hodnota 6,5 ng/ml, kdežto u pacientov vo vekovom rozhraní 40-49 rokov je fyziologická hladina definovaná len do 2,5 ng/ml. Vo všeobecnosti hodnoty nad 4 ng/ml poukazujú na možnú patológiu a teda možnosť výskytu neoplázie. Na zistenie konkrétneho rozlíšenia CaP a BHP je navrhnuté vykonať biopsiu pri hodnotách nad 4 ng/ml.

Na základe tabuľky č.25 je viditeľné, že s pribúdajúcim vekom pacienta rastú priamo úmerne aj hodnoty PSA. Hodnoty tPSA sa pohybovali v rozmedzí od 0,28-13,32 ng/ml. Pacienti vo vekovej kategórii > 70 rokov mali priemernú hodnotu PSA $3,69 \pm 2,63$ ng/ml, pričom celkový priemer vekových skupín bol $3,36 \pm 2,70$ ng/ml PSA. Najmenšie hodnoty PSA boli analyzované vo vekovej skupine mužov od 49-40 rokov, kde hodnoty dosahovali $2,184 \pm 2,893$ ng/ml. Variačný koeficient (CV) zobrazuje, že najväčší rozptyl hodnôt PSA bol vo vekovej skupine od 40-49 rokov. Celkový rozptyl medzi hodnotami bol 80,36 %

4.4 Vylúčenie nutnosti biopsie

Takmer 75 % vykonaných biopsií prostaty sa vykonáva zbytočne. PHI test s vysokou špecificitou dopomáha k lepšej diagnostike CaP pred výkonom biopsie. Čím vyššie hodnoty PSA, tým väčšie je riziko CaP u pacienta. PHI sa využíva najmä pri pacientoch vo veku nad 40 rokov s celkovým PSA > 2,0 až <10 ng/ml. PHI koreluje s hodnotou fPSA, pri nižších hodnotách fPSA sa PHI zvyšuje.



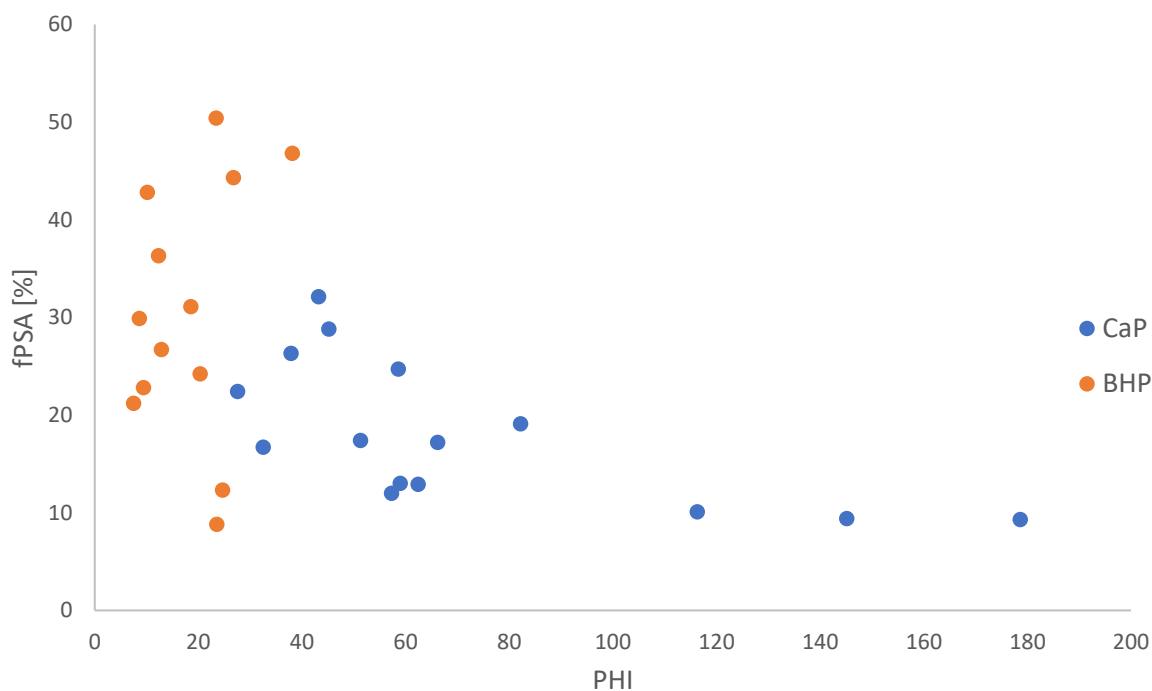
Graf 6: Rozdelenie pacientov podľa ochorenia na základe biopsie

Pacientom s hladinou PSA nad 4 ng/ml bola navrhnutá a vykonaná biopsia. Na základe výsledkov z biopsie 13 pacientom bola diagnostikovaná BHP a 15 pacientom CaP, na čo poukazuje graf č.6.

Tabuľka 26: Namerané hodnoty markerov na základe diagnózy

		CaP	BHP	Celkom
		N=15	N=13	N=28
<i>Priemerný vek</i>		73,5	70,23	72
	<i>Medián</i>	7,45	4,95	5,31
tPSA	<i>Priemer ± SD</i>	7,279 ± 2,315	5,143 ± 0,898	5,726 ± 1,359
	<i>Rozmedzie</i>	4,59 – 13,32	4,11 – 6,77	4,11 – 8,92
	<i>Medián</i>	1,28	1,23	1,255
fPSA	<i>Priemer ± SD</i>	1,4397 ± 0,865	1,998 ± 2,407	1,6988 ± 1,78
	<i>Rozmedzie</i>	0,68 – 4,2	0,48 – 10,13	0,48 – 10,13
	<i>Medián</i>	17,2	29,9	23,89
% fPSA	<i>Priemer ± SD</i>	18,093 ± 7,078	30,585 ± 12,526	22,6 ± 11,768
	<i>Rozmedzie</i>	9,3 – 32,1	8,8 – 50,4	8,8 – 50,4
	<i>Medián</i>	58,54	18,51	35,17
PHI	<i>Priemer ± SD</i>	70,86 ± 41,74	18,15 ± 8,71	46,39 ± 40,74
	<i>Rozmedzie</i>	27,53 – 178,62	7,44 – 38,13	7,44 – 178,62

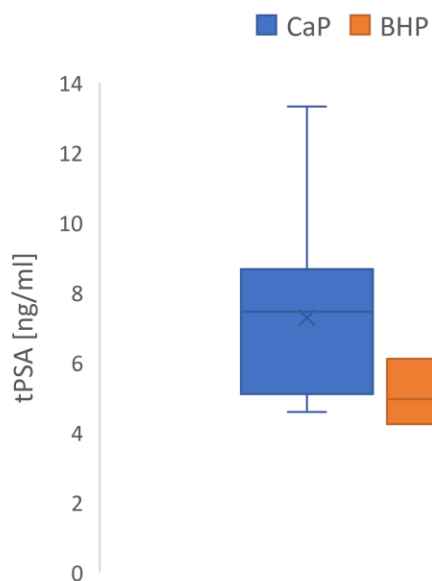
Tabuľka č.26 demonštruje, že diagnóza, ktorá pozostáva len z výsledkov hodnôt tPSA a fPSA, nemôže byť braná do úvahy, pretože % fPSA by problém s rozlíšením pacientov na „chorých“ a „zdravých“ nevyriešil. Pri % fPSA s cut off hodnotou 23 %, kedy boli pacienti s nižšou hodnotou ako 23 % považovaných za trpiacich s CaP, sa nachádzali aj pacienti v rozmedzí od 8,8 % fPSA, túto skutočnosť zobrazuje aj graf č.7. Z tohto dôvodu nejde presne rozlíšiť BHP a CaP, na základe toho bol vypočítaný PHI, ktorý sa pohyboval v intervale od 7,44-178,62, kedy pacienti s hodnotou > 40 sú považovaní ako pacienti s vysokým rizikom prítomnosti CaP.



Graf 7: Distribúcia ochorení po vykonanej biopsii na základe PHI

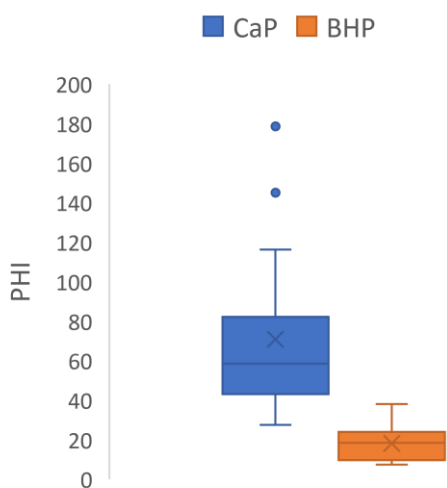
Bodový graf č.7 zobrazuje v kartézskych súradniciach rozmiestnenie hodnôt PHI a % fPSA jednotlivých pacientov. Dáta sú znázornené ako množina bodov, kde na vodorovnej osi je udaná hodnota PHI a na zvislej hodnota % fPSA. Teoreticky by sa pod hodnotou 23 % fPSA a PHI nad 40, mali nachádzať len pacienti s CaP a naopak pacienti s BHP. Avšak v skutočnosti sa takmer polovica pacientoch nachádzalo v hraničnej zóne hodnôt % fPSA od 16-23 %. Poukazuje aj na koreláciu hodnôt PHI a % fPSA, čím nižšie hladiny % fPSA tým väčšie PHI a možnosť vzniku CaP.

Z klinického hľadiska na určenie diagnózy boli zostrojené krabicové grafy č. 8, 9, 10, vhodné pre vyjadrenie variability nameraných dát. V tomto grafe dolná hrana zobrazuje spodný kvartál a horná hrana horný kvartál. Rozdiel medzi kvartálmi je interkvartálové rozhranie, ktoré je definované čiarami vychádzajúce z grafu ako jeho 1,5x násobok. Na konci čiar sa nachádza maximum a minimum hodnôt. Body mimo čiaru označujú extrémne intervaly mimo dosah čiar. Čiara, ktorá je zobrazená v krabicovom grafe znázorňuje hodnotu mediánu.

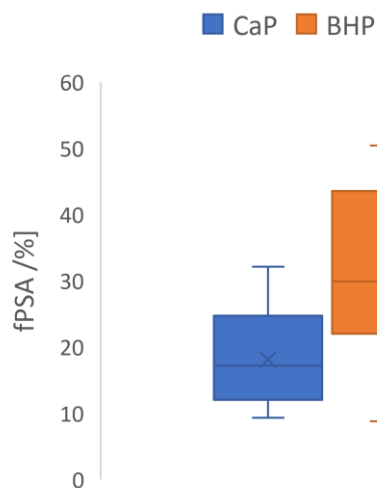


Graf 8: Krabicový graf pre tPSA

Z grafu č.8 vyjadrujúci hodnoty PSA nevyplývajú markantné rozdiely medzi pacientmi s ochorením BHP a CaP, keďže medián u BHP bol 4,95 ng/ml a u CaP 7,45 ng/ml. Rozdiely boli pozorovateľné u hodnôt mediánu % fPSA a PHI, CaP vykazoval hodnotu mediánu % fPSA 17,2 % pričom u BHP 29,9 %. Medián hodnôt PHI u CaP dosahoval 58,54 , kdežto pri BHP len 18,51.



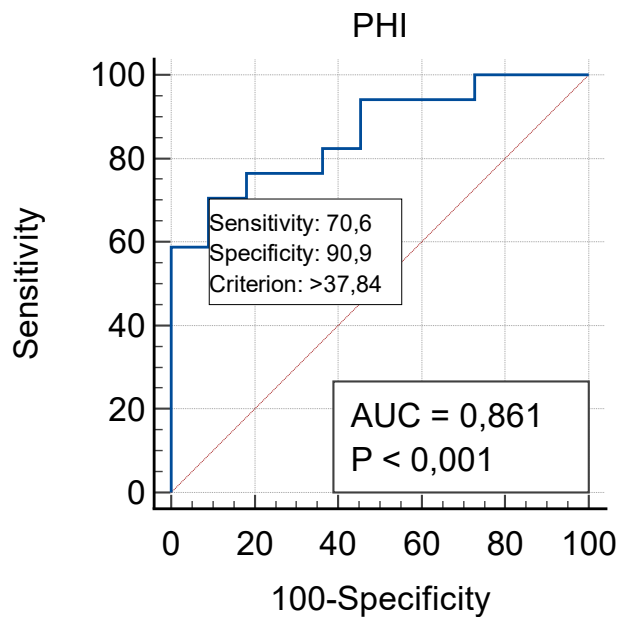
Graf 9: Krabicový graf pre PHI



Graf 10: Krabicový graf pre % fPSA

4.5 Receiver operating characteristic

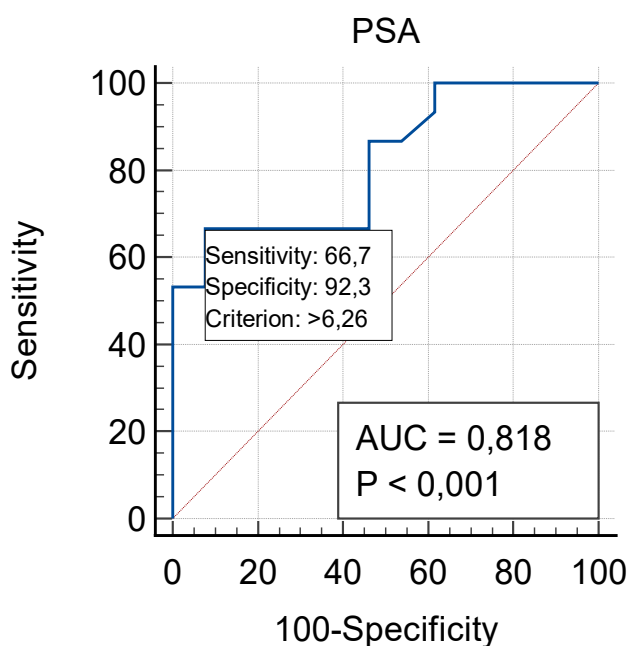
Receiver operating characteristic (ROC) štatistická analýza vyhodnocuje signály správnej a falošnej pozitivity, správnej a falošnej negativity. ROC krivka znázorňuje závislosť medzi špecificitou a senzitivitou (správnou a falošnou pozitivitou). Plocha pod krivkou AUC charakterizuje účinnosť testu. S rastúcim AUC rastie aj diagnostická účinnosť testu. Efektivita jednotlivých parametrov pri diagnostike CaP sú zobrazené v grafoch č. 11, 12, 13.



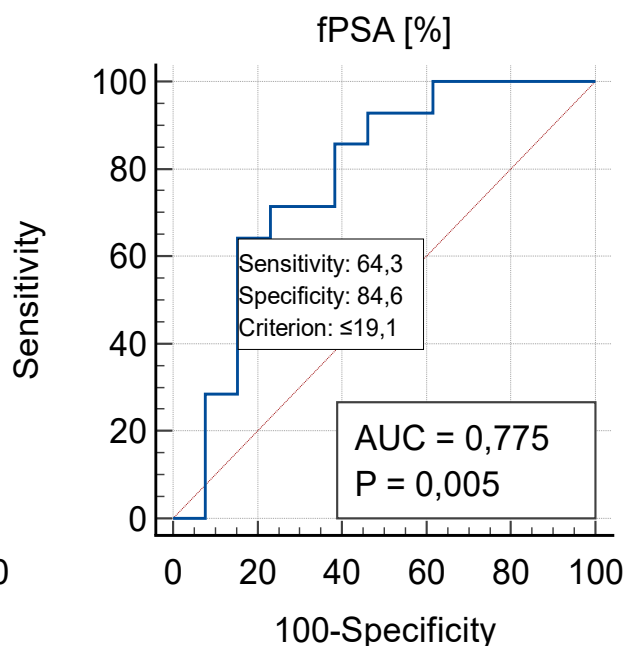
Graf 11: ROC analýza PHI

Analýza ROC potvrdila, že ako najlepší marker s najvyššou špecificitou pre diagnostiku CaP sa javí PHI, ktorý mal 70,6 % senzitivitu a s vysokou špecificitou až 90,9 % pri štatisticky stanovenej hodnote cut off PHI > 37,84. AUC pod krivkou je 0,861, čím môžeme konštatovať, že ideže ide o účinný test.

Za PHI testom sa umiestnil testy tPSA (senzitivita 66,7 %, špecificita 92,3 % pri cutt of hodnote > 6,26) a % fPSA (senztivita 64,3 %, špecificita 84,6 % pri cut off hodnote ≤ 19,1). AUC pod krivkou tPSA dosahovalo hodnotu 0,818 a u % fPSA 0,775, ktoré sú podľa diagnostickej efektivity testov ROC analýz dobrými ukazateľmi ochorenia. Za dobré testy sa považujú hodnoty AUC v rozmedzí 0,75-0,92 (tab. č.27).



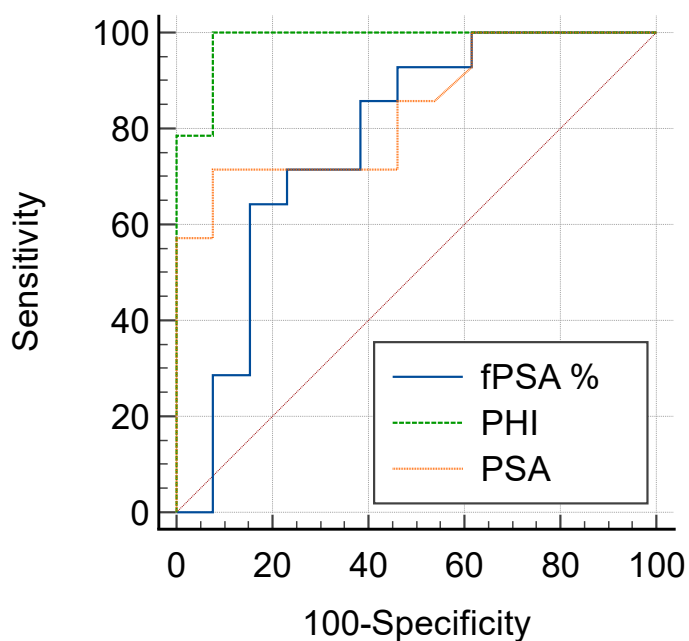
Graf 12: ROC analýza PSA



Graf 13: ROC analýza %fPSA

Tabuľka 27: Súhrn ROC analýz

	AUC	SD	95 % interval spoľahlivosti	Hladina významnosti P	Deľiace kritérium	Senzitivita	Špecificita
<i>t</i> PSA	0,818	0,0806	0,627 – 0,937	0,001	6,26	66,7	92,3
%fPSA	0,775	0,0943	0,574 – 0,912	0,005	19,1	64,29	84,6
PHI	0,861	0,0686	0,678 – 0,962	0,0001	37,84	70,59	90,91



Graf 14: Porovnanie ROC analýz PHI, PSA a %fPSA

Graf č.14 zobrazuje porovnanie AUC hodnôt PHI, tPSA a % fPSA. PHI test mal najlepšiu diagnostickú predikciu CaP, čím môže znížiť počet zbytočne vykonaných biopsií, tzv. overdiagnosis. Ako účinný indikátor sa ukázala aj hodnota PSA. Pri rozhodovaní, či pacient podstúpi biopsiu sa hodnoty testov PSA spolu s PHI sa vyznačujú ako prínosné oproti len samotnému PSA.

Tabuľka 28: Distribúcia výsledkov podľa PHI a %fPSA pacientov s vykonanou biopsiou

	správna pozitivita	správna negativita	falošná pozitivita	falošná negativita	Celkom
<i>tPSA</i>	10	11	2	5	28
<i>% fPSA</i>	10	11	2	5	28
<i>PHI</i>	13	12	1	2	28

* červenou je označený počet zbytočne vykonaných biopsií

Z dát v kontingenčnej tabuľke č.28 je zrejmé, že pri výsledkoch PHI v porovnaní s ostatnými parametrami sa znížil počet falošne pozitívnych jedincov (zdraví jedinci s pozitívnym výsledkom testu) a falošných negatív (chorí pacienti s negatívnym výsledkom testu). Celkovo pri parametre PHI boli zobrazené 2 prípady falošnej negativity a 1 prípad falošnej pozitivity. V prípade použitia tohto deliaceho kritéria by sa pri 28 vykonaných biopsií by sa nemuselo vykonať 12 biopsií.

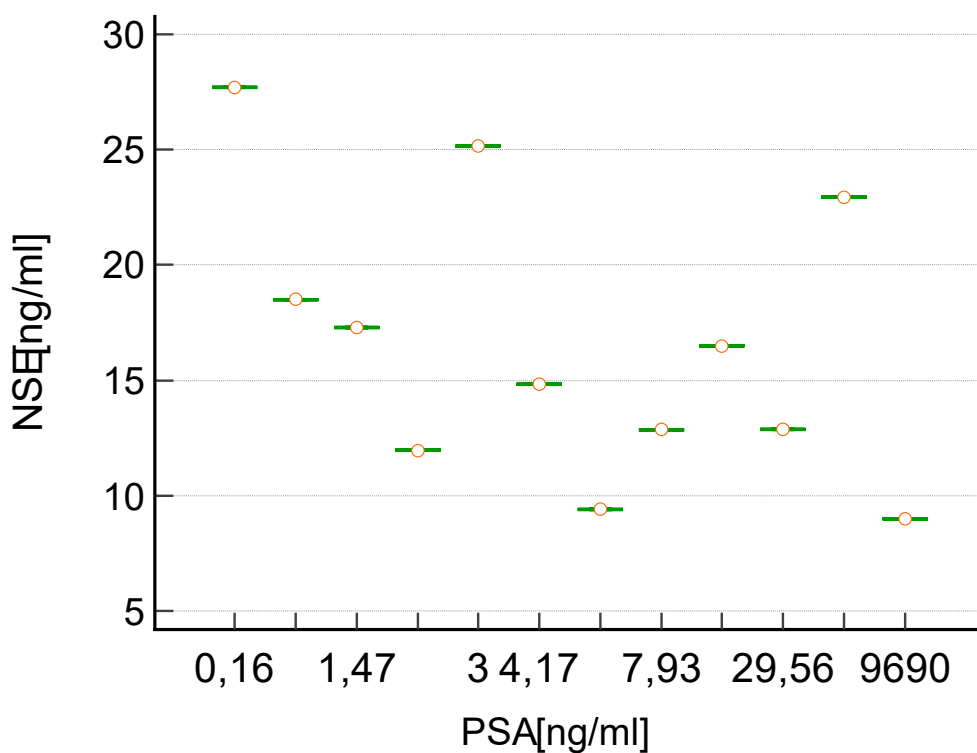
4.6 Stanovenie súvislosti medzi karcinómom prostaty a NSE

Približne 50 % všetkých malígnych nádorov prostaty obsahuje neuroendokrinné bunky, ktoré nie je možné pripísať malobunkovým nádorom ale vysoko agresívnym subtypom nádorov, a ktoré predstavujú 1-2 % z celkových malignít prostaty. V súčasnosti je len obmedzené množstvo údajov, ktoré stanovujú hladiny neuroendokrinných markerov v súvislosti s CaP, preto som sa zamerala aj na výsledky NSE pri pacientoch s CaP.

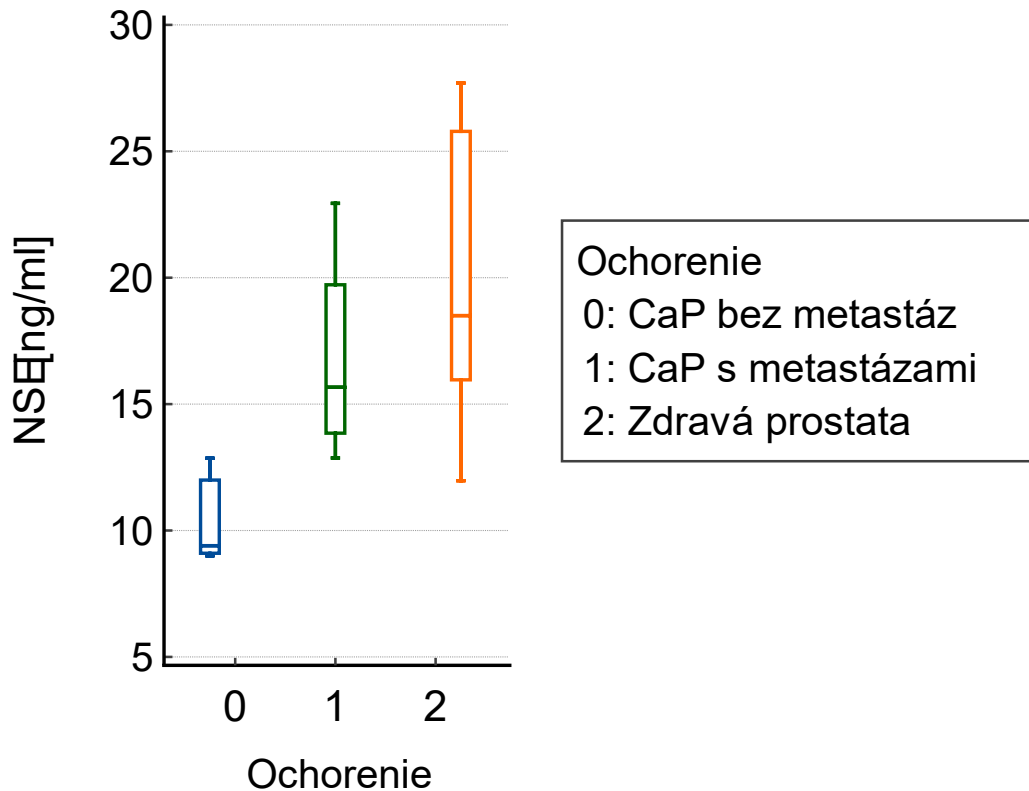
Tabuľka 29: Namerané hodnoty NSE a PSA v jednotlivých skupinách

	CaP bez metastáz		CaP s metastázami		Zdravá prostata		Celkom	
	PSA	NSE	PSA	NSE	PSA	NSE	PSA	NSE
<i>Medián</i>	7,93	9,4	20,925	15,665	1,47	18,5	4,17	13,29
<i>Priemer</i>	3234,83	10,42	38,31	16,785	1,49	20,12	758,98	15,45
<i>SD</i>	4564,495	1,73	40,82	3,78	1,095	5,65	2578,31	4,68
<i>Minimum</i>	6,59	9	4,17	12,87	0,16	11,97	0,16	9
<i>Maximum</i>	9690	12,86	107,21	22,94	2,36	27,7	9690	27,7

* hodnoty PSA a NSE sú uvedené v [ng/ml]



Graf 15: Závislosť PSA na NSE

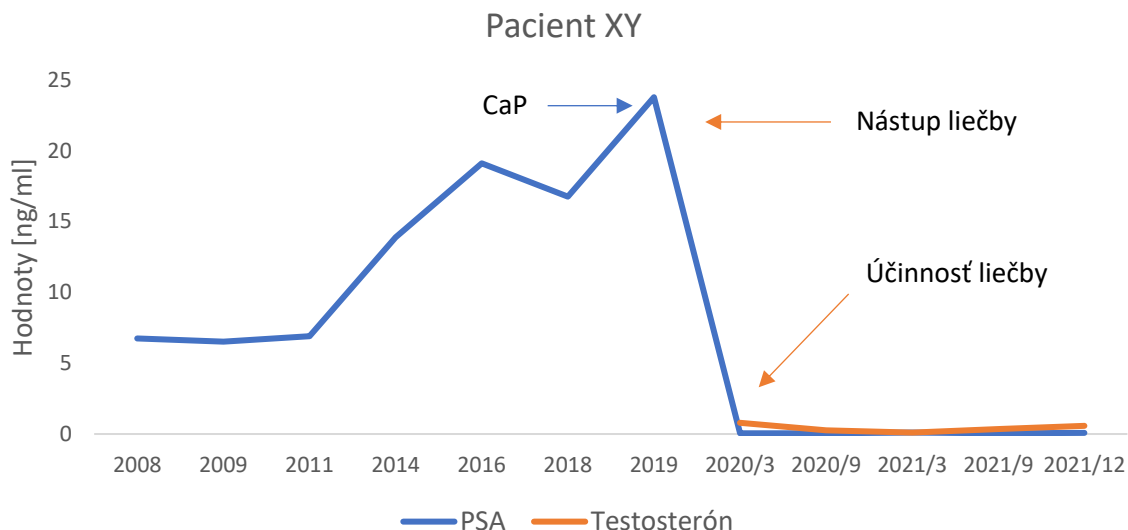


Graf 16: Distribúcia hodnôt NSE v závislosti od ochorenia

Z grafu č.16, ktorý pozostáva z hodnôt 12 pacientov, je viditeľné, že pacienti bez CaP mali vyššie hodnoty NSE v sére ako pacienti s CaP. Pacienti s metastázujúcim CaP mali výrazne vyššiu hladinu NSE ako pacienti bez metastáz (*tab. č.29*). U pacientov s CaP sérové hladiny NSE nekorelovali so sérovými hladinami PSA, na čo poukazuje graf č.15, to môže byť spôsobené prítomnosťou neepiteliálne transformovaných nádorových štruktúr, ktoré znižujú alebo normalizujú sérové hladiny PSA. Hodnotenie vyššie spomínaných parametrov, najmä ak sú spojené so zvýšenými plazmatickými koncentraciami NSE, môže dopomôcť pri rozlíšení pokročilého adenokarcinómu s prvkami malígnych neuroendokrinných štruktúr a bez nich.

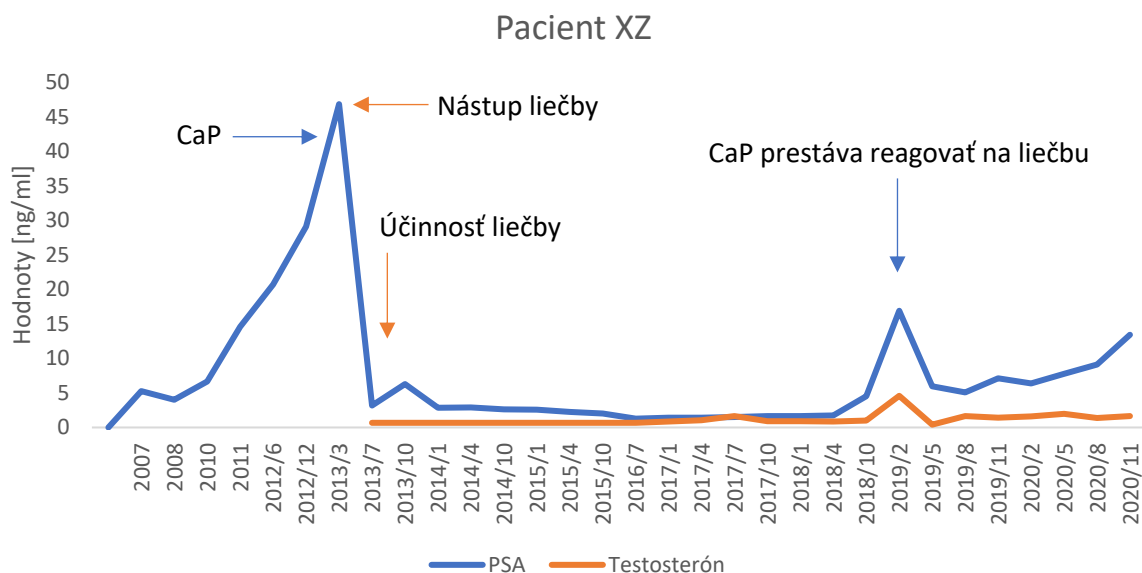
4.7 Monitorovanie pacientov na hormonálnej liečbe

Liečba pokročilého metastatického CaP spočíva hlavne v hormonálnej liečbe. Základom je, že bunky CaP pre rast a diferenciáciu potrebujú testosterón. Zastavenie jeho tvorby možno dosiahnuť chirurgickým odstránením semenníkov alebo farmakologickou kastráciou. Na farmakologickú kastráciu sa využívajú antiandrogény, ktoré na bunkách CaP zablokujú receptory pre testosterón, čím zabránia jeho účinku [107].



Graf 17: Rozvoj CaP u pacienta XY

Z grafu č.17 je možné pozorovať že, pacientovi XY bol v roku 2019 indikovaný CaP, ktorý sa následne začal liečiť. Testosterón je priamo závislý na raste malígnych buniek prostaty. Pri znížení hodnôt testosterónu pod tzv. kastročnú hodnotu testosterónu, sa rast nádoru spomaľuje, prípadne môže dôjsť k jeho zastaveniu. Hodnoty testosterónu sú priamo úmerne s hodnotami PSA.



Graf 18: Rozvoj CaP u pacienta XZ

Z grafu č.18 pozorujeme, indikáciu CaP pacientovi XZ v roku 2013, kedy bola stanovená hodnota PSA 46,8 ng/ml. Pacientovi bola podaná hormonálna liečba, ktorá sa spočiatku zdala ako úspešná keďže hladina testosterónu dosahovala nízke hodnoty a došlo k remisií. Liečba prestala účinkovať od roku 2018 kedy sa hodnoty PSA aj testosterónu začali zvyšovať a CaP sa ďalej zväčšoval, preto pacientovi bola navrhnutá iná liečebná možnosť (chirurgické odstránenie semenníkov).

5 DISKUSIA

Karcinóm prostaty, označovaný ako dg. C61 patrí medzi najčastejšie malígne ochorenia, ktorými trpia najmä muži vo vekovej skupine 60-90 rokov. Podnetom, nad úvahou o CaP sa najčastejšie stáva zvýšená hladina PSA, ktorá býva skreslená inými faktormi ako napr. vekom, infekciami prostaty alebo BHP. PSA patrí do skupiny orgánovo špecifických markerov, vyššie hladiny PSA sú predikcia k vyššiemu riziku CaP. Hodnoty PSA vzrastajú so stúpajúcim vekom fyziologicky. Využitie samotného PSA pri predpovedi CaP neponúka spoľahlivú citlivosť pri stanovení skorých formách, vyššiu citlivosť PSA vykazuje len pri pokročilých typoch CaP. Zvýšené hladiny aj v iných prípadoch ako pri CaP výrazne limitujú využitie testu v rozhodovacom procese indikácie biopsie pre definitívne potvrdenie prítomnosti malignity. Pacienti v šedej zóne hodnôt PSA od 4-10 ng/ml sú monitorovaní lekárom. Pomocou správne zvolených vykonávaných biochemických testov ako je PSA, % fPSA a p2PSA je možné týmto pacientom predikovať CaP. K lepšej diagnostike dopomáha aj test PHI vypočítaný z p2PSA, ktorý má najvyššiu diagnostickú presnosť pri hodnotách PSA v rozmedzí od 2-10 ng/ml. PHI disponuje vysokou špecificitou a správnou kombináciou biochemických testov by sa CaP mohol indikovať oveľa skôr. Laboratórne výsledky sú len cennou pomôckou v diagnostike pre ošetrojúceho lekára ale o ďalších postupoch rozhoduje samotný pacient s ošetrojúcim lekárom

Thompson a kol. uvádzajú, že vyššia hladina sérového PSA je spojovaná s vyšším rizikom vzniku CaP, pri hodnotách PSA 4 ng/ml je riziko 25 %, pričom pri hladine PSA > 10 ng/ml až 50 % [106]. Naopak Vukotic a kol. uvádza vo svojom výskume prítomnosti CaP pri hodnote PSA 4-10 ng/ml s rizikom 20 % a pri hodnote 10-20 ng/ml s rizikom výskytu 33 %. V mojom skúmanom súbore malo hodnotu PSA od 4-10 ng/ml 34 % mužov, čo koreluje so spomínanými faktami. Pacientom s hladinou nad 4 ng/ml bola navrhnutá biopsia, pri ktorej bolo zistené z celkových 28 pacientov bol diagnostikovaný CaP až 15 mužov, čo predstavovalo viac než polovicu [108].

Národný onkologický register Slovenskej republiky podľa analýz avizoval vzostup záchytu CaP od roku 2012, ktorý je najmä pripisovaný screeningu populácie mužov nad 50 rokov a zavedeniu rutinného vyšetrovania PSA a nových diagnostických testov do klinickej praxe. V roku 2012 sa zachytilo 16% pacientov v I. štádiu, 49,5 % v II. Štádiu, 15 % v III. Štádiu, 17 % v IV. štádiu a 2,4 % v neznámom štádiu CaP [109].

V analyzovanom súbore boli hodnotené parametre PSA, % fPSA a PHI. Štatisticky významné rozdiely boli nájdené u parametrov PSA ($p < 0,001$) a PHI ($p < 0,001$). Pri teste

% fPSA bola pomocou ROC analýzy stanovená AUC hodnota 0,775 (95 % IS: 0,574 - 0,912; $p = 0,005$). Za najlepšie deliace kritérium so špecificitou 84,6 % a senzitivitou 64,29 % bola stanovená hodnota 19,1 %. K podobným výsledkom sa dopracovali analýzou aj iní autori. Hussein a kol. študovali skupinu 84 pacientov s CaP, pri ktorých hodnoty % fPSA boli nižšie ako 11,1 % [110]. Tijani a kol. publikovali analýzu 169 pacientov s tPSA od 4-10 ng/ml s nesuspektnými nálezmi pri DRE vyšetrení. Zistilo sa, že zníženie % fPSA bolo spojené s vyššou mierou detekcie CaP. Pričom prevalencia CaP pacientov s % fPSA < 10 % bola 62 %, zatiaľ čo nad 20 % bola nulová. Na hranici 20 % bola špecificita 45 % a senzitivita 100 %. ROC analýzou bola určená plocha AUC: 0,76. Cutt off hodnota % fPSA pri 15 % mala najvyššiu schopnosť rozlišovať medzi benígnymi a malígnymi nádormi [111]. Roddam a kol. analyzovali využitie testu % fPSA. Konštatovali, že % fPSA zlepšilo diagnostický výkon u mužov s hodnotami tPSA 2-4 alebo 4-10 ng/ml v porovnaní len so samotným tPSA. Výkonnosť testu % fPSA bola signifikantne vyššia pri pacientoch s rozsahom tPSA 4-10 ng/ml než pri pacientoch s rozsahom 2-4 ng/ml. Pri senzitivite 95 % bola v rozmedzí 2-4 ng/ml špecificita 6% a pri rozmedzí od 4-10 ng/ml 18 % [112].

V študovanom súbore sa ROC analýzou hodnota PSA javila lepšia ako výpočet % fPSA. Plocha AUC bola 0,818 (95 % IS: 0,627-0,937; $p < 0,001$) so senzitivitou 66,7 % a špecificitou 92,3 %. Jansen a kol. analyzovali 405 vzoriek z Európskej randomizovanej štúdie screeningu CaP a 351 vzoriek z urologického oddelenia Lekárskej univerzity v Innsbrucku. Dospeli k záveru, že najvyššiu prediktívnu hodnotu CaP v oboch prípadoch (pacienti s BHP a CaP) dosiahol parameter PHI s AUC: 0,750, čo je oproti tPSA AUC: 0,585 významný nárast. AUC pri % fPSA malo hodnotu 0,675. Pri senzitivite 90% dosahovala špecificita pri PHI 31 % v porovnaní so špecificitou 8 % tPSA. Hodnota tPSA v porovnaní s ostatnými parametrami vykazuje najmenšiu diagnostickú presnosť pri predikcii CaP [113].

Najvyššiu diagnostickú presnosť vykazoval test PHI. Analýzou ROC plocha pod krivkou AUC dosahovala 0,861 (95 % IS: 0,678-0,962; $p < 0,001$) pri senzitivite 70,59 % a špecificite 90,91 %, pri hodnote deliaceho kritéria 37,84 %. AUC plocha pod krivkou pri parametre PHI v analyzovanom súbore mala najväčšiu hodnotu, čo potvrdzuje, že PHI ma v tomto prípade najlepší diagnostický efekt. Pri použití deliaceho kritéria pri hodnote 37,84 % by sa 12 mužov (42,86 %) vyhlo vykonaniu biopsie prostaty. V doposiaľ analyzovaných derivátov PSA a ich hodnotením významu pre predikciu CaP, test PHI s jeho plochou AUC prevyšuje ostatné. Lazzeri a kol. študovali 1026 pacientov, s pri ktorých hodnoty PHI ($p < 0,001$) výrazne vyššie a hodnoty % fPSA významne nižšie u pacientov s CaP ako u pacientov, ktorí nemali CaP. Analýza s jednoznačnou presnosťou ukázala, že PHI test s AUC 0,733 sú najpresnejšími

prediktormi CaP pri biopsii prostaty. AUC PHI významne prevyšuje tPSA AUC: 0,549, % fPSA AUC: 0,600. Zistilo sa, že prah PHI na hodnote 40 má najlepšiu rovnováhu medzi senzitivitou (64,8 %) a špecificitou (71,3 %). Pri 90 % senzitivite bola prahová hodnota PHI 25,5 so špecificitou 25,5 %. Pri tejto prahovej hodnote sa dalo vyhnúť 17,2 % biopsiám. PHI test výrazne zvýšil presnosť s viacerými indikátormi vrátane PSA [114].

V súčasnosti sa čím ďalej viac, spomína s CaP nový neuroendokrinný marker, konkrétne NSE. V súbore zdravých pacientov a trpiacich s CaP bolo dokázané, že zdraví jedinci mali vyššie hladiny NSE ako pacienti s CaP. Pacienti, ktorí mali metastázujúci CaP mali vyššie hladiny NSE ako pacienti bez metastáz. Hodnoty PSA nekorelovali s hodnotami NSE. Pilotné testovanie týchto 12 pacientov zobrazuje neisté výsledky v dôsledku malého počtu vyšetrených pacientov. Avšak podobne výsledky dosahovali aj Kamiya a kol. v analýze so 104 pacientmi s histologickým potvrdením CaP a s 59 pacientmi, ktorým nebol zistený CaP [115]. Sakuma a kol. študovali prípad malobunkového karcinómu a adenokarcinómu prostaty. V štúdií bolo 76 ročnému mužovi biopsiou prostaty zistený malobunkový karcinóm aj adenokarcinóm. Hodnoty PSA dosahovala 1760 ng/ml a NSE 88 ng/ml. Iba v časti malobunkového karcinómu boli exprimované neuroendokrinné markery. Androgéna blokáda viedla k zníženiu PSA na 5,13 ng/ml, ale k zvýšeniu NSE na 810 ng/ml [116].

Hladina testosterónu dosiahnutá pomocou androgén - depriváčnej terapie súvisí s prežitím pacientov s CaP. Do študovaného súboru boli zahrnutí aj dvaja pacienti, ktorí podstupujú hormonálnu liečbu. Pacientovi XY bola pred nástupom liečby zameraná najvyššia hodnota PSA 23,79 ng/ml po nástupe liečby hladina klesla na 0,05 ng/ml PSA. Boli sledované aj hodnoty testosterónu v priebehu liečby, najnižšia nameraná hodnota bola 0,1 ng/ml. Pacient XZ mal najvyššiu hodnotu PSA 46,8 ng/ml, pri liečbe sa hladina testosterónu znížila pod 0,69 ng/ml. Po čase liečba prestala účinkovať a so stúpajúcou hladinou PSA rástol aj testosterón. Perachino a kol. zhodnotili 129 pacientov s histologickou diagnózou metastatického kostného CaP, ktorí predtým neboli liečení androgén - depriváčnou terapiou. Merali hladiny testosterónu a PSA každé 3 mesiace počas trvania sledovania. Zaznamenali nasledujúce premenné: vek, štádium, Gleasonovo skóre, bazálna hladina PSA, bazálna hladina testosterónu, najnižšia hodnota PSA, čas do najnižšej hodnoty PSA, testosterón po 6 mesiacoch, najnižšia hodnota testosterónu a čas do najnižšej hodnoty testosterónu. Údaje sa analyzovali pomocou Coxových modelov proporcionálnych rizík, pričom primárnym koncovým bodom bolo prežitie špecifické pre rakovinu. Priemerná bazálna hladina PSA bola 185,8 ng/ml a priemerná najnižšia hladina PSA 2,7 ng/ml. Priemerné hladiny testosterónu na začiatku, po 6 mesiacoch a najnižšej hodnote boli 440, 40 a 21 ng/dl. Pri priemernom

sledovaní 47,5 mesiacov bolo v čase analýzy 71 pacientov mŕtvych (55 %) a 78 nažive (45 %). Štatistická analýza pomocou Coxovho modelu ukázala, že u týchto pacientov riziko úmrtia priamo korelovalo nielen s Gleasonovým skóre ($p < 0,01$) a 6-mesačnou hladinou PSA ($p < 0,01$), ale aj so 6-mesačným sérovým testosterónom (pomer nebezpečnosti 1,32; $p < 0,05$) [117].

ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bola analýza vybraných markerov prostaty pri rozlíšení karcinómu prostaty a benígnej hyperplázie prostaty, rozlíšenie diagnózy na základe PSA, fPSA a PHI ako indikátorov v diagnostickom procese výkonu biopsie. Tieto ciele boli splnené. V študovanom súbore 76 náhodne vybraných mužov boli laboratórne stanovené hodnoty PSA. Pacientom s hodnotami nad 4 ng/ml PSA bola navrhnutá biopsia. Týmto pacientom boli následne dovýšetrované hodnoty % fPSA a PHI. Karcinóm prostaty bol histologický potvrdený u 15 mužov (53,57 % zo súboru). Medzi skúmanými hodnotami PSA, % fPSA a PHI boli štatisticky patrné rozdiely medzi skupinou pacientov s karcinómom prostaty a pacientov s benígnou hyperpláziou prostaty. Tieto testy boli analyzované pomocou ROC krivky, kde najlepšia diagnostická presnosť pre predikciu karcinómu prostaty vyšla v teste PHI, ktorý mal najväčšiu plochu pod krivkou (AUC) v porovnaní s ostatnými. Po teste PHI nasledoval test PSA a posledný skončil % fPSA, aj keď ich hodnoty pod krivkou boli v kritériu dobrých testov. Pri využití deliaceho kritéria $PHI > 37,84$ bola senzitivita 70,59 % a špecificita testu 90,91 %, bolo ušetrených 12 pacientov (42,86 % zo súboru), čo je takmer polovica ušetrených biopsií. PHI vyšetrenie si pacient hradí sám, ak by poisťovne preplácali PHI test ako rutinné vyšetrenia, CaP by pacientom mohol byť indikovaný oveľa skôr. Všetky laboratórne vyšetrenia sú pre lekára a pacienta cenným doplnkom diagnózy ale o ďalšom osude rozhoduje sám pacient s ošetrojúcim lekárom.

Dvomi pacientom na hormonálnej liečbe boli monitorované hodnoty PSA. Pred nástupom liečby dosahovali vysoké hodnoty PSA, po znížení testosterónu na kastročnú hranicu sa rast nádoru ustálil len u jedného pacienta. Druhému pacientovi hormonálna liečba zabránila spomalenie rastu nádoru len na určitú dobu. Liečba prestala účinkovať a pacientovi bola navrhnuté chirurgické odstránenie semenníkov.

Diplomová práca sa zamerala aj na možnú súvislosť neurón špecifickej enolázy ako prognostického markera karcinómu prostaty. V analyzovanom súbore 12 pacientov, boli pacienti s diagnostikovaným karcinómom prostaty bez metastáz, s metastázami a zdraví jedinci. Štatisticky spracované hodnoty poukázali na rozdiely medzi hodnotami NSE medzi pacientmi s karcinómom a zdravými pacientmi. Zdraví pacienti vykazovali vyššie hodnoty NSE oproti pacientom s karcinómom. V súbore pacientov s karcinómom mali zvýšené hodnoty pacienti s metastázujúcim karcinómom. Porovnané hodnoty PSA a NSE medzi sebou nevykazovali súvis. Pilotné testovanie v študovanom súbore neposkytovalo 100 % výsledky z dôvodu malého počtu analyzovaných pacientov. Pri podstatne väčšom množstve

pacientov by hodnoty ukazovali jasnejšiu spojitosť s CaP. Štúdium NSE hladín by mohlo v budúcnosti pomôcť pri rozlíšení pokročilého adenokarcinómu s prvkami malígnych neuroendokrinných štruktúr a bez nich.

CITÁCIA

1. Fuchsová R., Hora M. a kol. *Biomarkery v diagnostike karcinomu prostaty*. Tribun, 2014, 3-10. ISBN 978-80-263-0821-8
2. Mclaughlin P. W., Troyer S. a kol. Functional anatomy of the prostate: Implications for treatment planning. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. 2005, **63**(2):479-491
3. Petrovický P. a kol. Systematická, topografická a klinická anatomie, VI. Vydání – Močopohlavní ústrojí, Praha, 1995, 48-51, ISBN 80-7184-108-0
4. Čihák R. Anatomie. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004, 341-345. ISBN 80-247-0143-X
5. Vipfarm, *Karcinom prostaty* [online]. 2016. [cit. 2022-09-01]. Dostupné z: <https://vipfarm.cz/karcinom-prostaty>
6. Doležel M. Cílená radioterapie karcinomu prostaty. 1.vyd. Nucleus, 2011. 100-115. ISBN 978-80-8700-981-9
7. Hynková L., Doleželová H. a Šlampa P. Radiační onkologie: učební texty pro studenty 5. roč. LF MU Brno. 1. vyd. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2009, 242. ISBN 978-80- 86793-13-9
8. Zaridze D. G., Boyle P. a kol. International trends in prostatic cancer. *International Journal of Cancer*. 1984, **33**(2): 223-230
9. Whittemore A. S., Wu A. H. a kol. Family History and Prostate Cancer Risk in Black, White, and Asian Men in the United States and Canada. *American Journal of Epidemiology*. 1995, **141**(8):732-740
10. Krška Z., Hoskovec D. a Petruželka L. *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada, 2014. 344-347. ISBN 978-80-247-4284-7
11. Buyyounouski M. K., Choyke P. L. a kol. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual: Implications for treatment planning. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017, **67**(3): 245-253
12. Harnden P., Shelley M. D. a kol. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*. 2007, **8**(5):411-419
13. Slovenská urologická spoločnosť. *O karcinóme prostaty* [online]. 2021 [cit. 2022-01-11]. Dostupné z: <http://sus.sk/o-karcin-me-prostaty>

14. Zachoval R., Ďušek L. a Babjuk M. Problematika screeningu karcinómu prostaty. *Czech Urology*. 2018, **22**(1):14-26
15. Kertes P., Blaško M. a kol. Karcinóm prostaty. *Via practica*. 2007, **4**(9):396-398.
16. Kaplan, O., Belej K. a Köhler O. *Současné trendy diagnostiky karcinomu prostaty*. 2010, **4**(2) 68-7
17. Presti J. Prostate biopsy strategies. *Nature Clinical Practice Urology*. 2007, **4**(9):505-511
18. Matlaga B. R., Eskéw A. a Mccullough D. L. Prostate Biopsy: Indications and Technique. *The Journal of Urology*. 2003, **169**(1):12-19
19. Streicher J., Meyerson B. L. a kol. A review of optimal prostate biopsy: indications and techniques. *Therapeutic Advances in Urology*. 2019, **11**(1):1-8
20. Quentin M., Blondin D. a kol. Prospective Evaluation of Magnetic Resonance Imaging Guided In-bore Prostate Biopsy versus Systematic Transrectal Ultrasound Guided Prostate Biopsy in Biopsy Naïve Men with Elevated Prostate Specific Antigen. *Journal of Urology*. 2014, **192**(5):1374-1379
21. Woodrum D., Gorny K. a kol. MRI-Guided Prostate Biopsy of Native and Recurrent Prostate Cancer. *Seminars in Interventional Radiology*. 2016, **33**(03):196-205
22. Valerio M., Donaldson I. a kol. Detection of Clinically Significant Prostate Cancer Using Magnetic Resonance Imaging–Ultrasound Fusion Targeted Biopsy: A Systematic Review. *European Urology*. 2015, **68**(1):8-19
23. Sidana, A., Watson M. J. a kol. Detection of Clinically Significant Prostate Cancer Using Magnetic Resonance Imaging–Ultrasound Fusion Targeted Biopsy: A Systematic Review. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2018, **36**(7):8-19
24. Sciarra A., Panebianco V. a kol. Value of Magnetic Resonance Spectroscopy Imaging and Dynamic Contrast-Enhanced Imaging for Detecting Prostate Cancer Foci in Men With Prior Negative Biopsy: A multi-institutional analysis. *Clinical Cancer Research*. 2010, **16**(6):1875-1883
25. Harvey C. J., Pilcher J. a kol. Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *The British Journal of Radiology*. 2012, **85**(1):317
26. Belej K. Transrektální sonografie v diagnostice onemocnění prostaty. *Urologie pro praxi*. 2019, **10**(1):7-10
27. Terada N., Akamatsu S. a kol. Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2017, **9**(8):565-573

28. Mizuno T., Goto T. a kol. Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications. *Open Journal of Pathology*. 2021, **11**(02):565-573
29. National Cancer Institute. *Tumor Markers* [online]. 2021 [cit. 2022-01-28] Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet>
30. Bettegowda CH., Sausen M. a kol. Clinical Uses of Tumor Markers: A Critical Review. *Science Translational Medicine*. 2014, **6**(224):225-262
31. Duffy M. J. Clinical Uses of Tumor Markers: A Critical Review. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2008, **38**(3):225-262
32. Malm J. a Lilja H. Biochemistry of prostate specific antigen, PSA. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2009, **55**(221):15-22
33. Yousef G. M., Chang A. a kol. Genomic Organization of the Human Kallikrein Gene Family on Chromosome 19q13.3–q13.4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000, **276**(1):125-133
34. Pérez-Ibave D. C., Burciaga-Flores C. H. a Elizondo-Riojas M. Á. Prostate-specific antigen (PSA) as a possible biomarker in non-prostatic cancer: A review. *Cancer Epidemiology*. 2018, **54**(1):48-55
35. Cleutjens K. B. J. M., Eekelem C. C. E. M. a kol. Two Androgen Response Regions Cooperate in Steroid Hormone Regulated Activity of the Prostate-specific Antigen Promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, **271**(11):6379-6388
36. McCormack R. T., Wang T. J. a kol. Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: A new era. *Urology*. 1995, **45**(5):729-744
37. Takayama T. K., Fujikawa K. a kol. Characterization of the Precursor of Prostate-specific Antigen: A new era. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, **272**(34):21582-21588
38. Frazier H. A., Humphrey P. A. a kol. Immunoreactive Prostatic Specific Antigen in Male Periurethral Glands: A new era. *Journal of Urology*. 1992, **147**(1):246-248
39. Stenman U. H., Leinonen J. a kol. Prostate-specific antigen: A new era. *Seminars in Cancer Biology*. 1999, **9**(2):83-93
40. Lebeau A. M., Singh P. a kol. Prostate-Specific Antigen Is a “Chymotrypsin-like” Serine Protease with Unique P1 Substrate Specificity: A review. *Biochemistry*. 2009, **48**(15):3490-3496

41. Nixon R. G., Wener M. H. a kol. Biological Variation of Prostate Specific Antigen Levels In Serum: An Evaluation of Day-to-Day Physiological Fluctuations in a Well-Defined Cohort of 24 Patients. *Journal of Urology*. 1997, **157**(6):2183-2190
42. Hradil D., Študent V. JR. a kol. Diagnostika a staging karcinomu prostaty. *Onkologie* 2014, **8**(1):15-18
43. Pešl M., Zámečník L. a kol. Prostatický specifický antigen a odvozené parametry. *Urologie pro praxi*. 2004, (2):59-93
44. Zlotta A. R., Djavan B. a kol. Prostate specific antigen density of the transition zone: a new effective parameter for prostate cancer prediction. *The Journal of urology*. 1997, **157**(4):1315-1321
45. Heidegger I., Klocker H. a kol. [-2]proPSA is an early marker for prostate cancer aggressiveness. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2014, **17**(1):70-74
46. Tricoli J. V., Schoenfeldt M. a kol. Detection of Prostate Cancer and Predicting Progression. *Clinical Cancer Research* . 2009, **10**(12):3943-3953
47. Cheng Y. T., Chiang CH. H. a kol. The application of p2PSA% and prostate health index in prostate cancer detection: A prospective cohort in a Tertiary Medical Center. *Journal of the Formosan Medical Association* . 2019, **118**(1):260-267
48. Xu H., Wang F. a kol. Prostatic Acid Phosphatase (PAP) Predicts Prostate Cancer Progress in a Population-Based Study: The Renewal of PAP? *Disease Markers*. 2019, 2014, **2019**(5):1-10
49. Muniyan S., Chaturvedi N. a kol. Human Prostatic Acid Phosphatase: Structure, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 2014, **14**(5):10438-10464
50. Goldfarb D. A., Stein B. S. a kol. Age-Related Changes in Tissue Levels of Prostatic Acid Phosphatase and Prostate Specific Antigen. *Journal of Urology*. 1986, 1997, **136**(6):1266-1269
51. Gunia S., Koch S. a kol. Expression of prostatic acid phosphatase (PSAP) in transurethral resection specimens of the prostate is predictive of histopathologic tumor stage in subsequent radical prostatectomies. *Virchows Archiv*. 2009, 1997, **454**(5):573-579
52. Solin T., Kontturi M. a kol. Gene expression and prostate specificity of human prostatic acid phosphatase (PAP): evaluation by RNA blot analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1990, 1997, **1048**(1):72-77

53. Kong H. Y., Byun J. a kol. Emerging Roles of Human Prostatic Acid Phosphatase: The Renewal of PAP? *Biomolecules and Therapeutics* . 2013, 2014, **21**(1):10-20
54. Salameh A., Lee A. K. a kol. Gene expression and prostate specificity of human prostatic acid phosphatase (PAP): evaluation by RNA blot analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, 1997, **112**(27):72-77
55. Hessels D., Gunnewiek J. M. T. K. a kol. DD3PCA3-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer: evaluation by RNA blot analyses. *European Urology*. 2003, 1997, **44**(1):8-16
56. Marks L. S. a Bostwick D. G. Prostate Cancer Specificity of PCA3 Gene Testing: Examples from Clinical Practice. *Reviews in Urology*. 2008, **10**(3):175-181
57. Vyhnánková V., Fedorko M. a kol. Možnosti predikce karcinomu prostaty pomocí PCA3. *Urologické listy*. 2011, **9**(4):43-48
58. Tyagi V., Scordo M. a kol. Revisiting the role of testosterone: Are we missing something? *Reviews in Urology*. 2017, **19**(1):16-24
59. Liao S. a Fang S. *Receptor-Proteins for Androgens and the Mode of Action of Androgens on Gene Transcription in Ventral Prostate*. Elsevier, 1970, **54**(1):17-90
60. Michaud J. E., Billups K. L. a Partin A. W. Testosterone and prostate cancer: an evidence-based review of pathogenesis and oncologic risk. *Therapeutic Advances in Urology*. 2015, **7**(6):378-387
61. Horňák M. *Karcinóm prostaty-Zásady hormonálnej liečby*. 2006, **1**(3):188-192
62. Muoio B., Pascale M. a Roggero E. The role of serum neuron-specific enolase in patients with prostate cancer: a systematic review of the recent literature. *The International Journal of Biological Markers*. 2018, 2006, **33**(1):10-21
63. Xu C. M., Luo Y. L. a kol. Multifunctional neuron-specific enolase: its role in lung diseases. *Bioscience Reports*. 2019, 2006, **39**(11):10-21
64. Beltran H., Tomlins S. a kol. Aggressive Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. Elsevier, 2014, 1970, **20**(11):2846-2850
65. Komiya A., Suzuki H. a kol. Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *International Journal of Urology*. Elsevier, 2009, 1970, **16**(1):37-44
66. Wright M. E., Tsai M. J. a Aebersold R. Androgen Receptor Represses the Neuroendocrine Transdifferentiation Process in Prostate Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*. 2003, **17**(9):1726-1737

67. Rosar F., Ribbat K. a kol. Neuron-specific enolase has potential value as a biomarker for [18F]FDG/[68Ga]Ga-PSMA-11 PET mismatch findings in advanced mCRPC patients: a systematic review of the recent literature. *EJNMMI Research*. 2020, 2006, **10**(1):10-21
68. Brozmanová H. Laboratorní metody v terapeutickém monitorování léků. *Klinická farmakologie a farmacie* .2020, **34**(2):56-58
69. Chromý V. a Bittová M. Bioanalytika: analytické metody v klinické chemii a laboratorní medicíně. 2., přeprac. a dopl. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 331. ISBN 978- 809-0453-937
70. Topolčan O. a Karlíková M. Imunoanalytické metody a jejich využití v biomedicínském výzkumu a klinické praxi [online]. 2009 [cit.2022-02-22] Dostupné z: <http://www.imunokurzy.cz/>
71. Aydin S., Thompson J. P. a Lambert D. G. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015, **72**(2):4-15
72. Konstantinou G. N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Food Allergens*. New York, NY: Springer New York, 2017, **54**(1):79-94
73. Grange R. D., Thompson J. P. a Lambert D.G. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *British Journal of Anaesthesia*. 2014, **112**(2):213-216
74. Lin A. V., Wu W. a kol. Indirect ELISA. *ELISA*. New York, NY: Springer New York, 2015, **31**(3):359-370
75. Trac, *Trends in Analytical Chemistry*. 1. New York, NY: Springer New York, 1982. **1**(15):352-354
76. Shinohara H., Wang F. a Hossain S. M. Z. A convenient, high-throughput method for enzyme-luminescence detection of dopamine released from PC12 cells. *Nature Protocols*. 2008, **3**(10):1639-1644
77. Šimsa D. a Skopal J. Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické Listy*. 2008, č. 102, 1017-1019. ISSN 1213-7103
78. Mao D., Wu W. a kol. Chemiluminescence-Guided Cancer Therapy Using a Chemiexcited Photosensitizer. *Chem*. New York, NY: Springer New York, 2017, **3**(6): 991-1007
79. Britannica. *Chemiluminescence* [online] .2018 [cit. 2022-02-12] Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/chemiluminescence>

80. Poulsen F., Jensen K. B. a kol. A Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay for the Determination of Insulin in Human Plasma: A Facile and Robust Suspension Array Platform. *Journal of Biomolecular Screening*. 2007, **12**(2):240-247
81. Poulsen F., Jensen K. B. a kol. Wash-LOCI - A Semi-Heterogeneous Version of the LOCI Technology Allowing Removal of Unbound Material After Each Assay Step: A Facile and Robust Suspension Array Platform. *Trends in Immunolabelled and Related Techniques*. InTech, 2012, **12**(2):240-247
82. Ullman E. F., Kirakossian H. a kol. Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. *Clinical chemistry*, 1996, **42**(9):1518–1526
83. Guo Q., Wang Y. a kol. Multiplexed Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay Based on Dual-Functional Barcodes with a Host–Guest Structure: A Facile and Robust Suspension Array Platform. *Small*. 2020, **16**(17):e1907521
84. Forster R. J., Beroncello P. a Keyes T. E. Electrogenerated Chemiluminescence. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2009, **2**(1): 359-385
85. Marquette CH. A. a Blum L. J. Analytical and Bioanalytical Chemistry: Electrochemiluminescent biosensing. Berlin: Springer, 2008, s. 155-168. ISBN 1618-2650
86. Richter M. M, Belisle CH. M. a kol. Assays employing electrochemiluminescent labels and electrochemiluminescence quenchers. USA. 1997, 1-37
87. Grange R. D., Thompson J. P. a Lambert D. G. Radioimmunoassay, enzyme and non-enzyme-based immunoassays. *British Journal of Anaesthesia*. 2014, **112**(2):213-216
88. Yalow R.S. Radioimmunoassay. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1980, **9**:327-345
89. Clinical Chemistry. 31. New York, NY: Springer New York, 1985, **31**(3):359-370
90. B.H.R.A.H.M.S. TRACE technologie [online]. 2014 [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: <https://www.brahms.de/en-gb/products/kryptor-analyzers/trace-technology.html>
91. Goldys E.. Fluorescence applications in biotechnology and life sciences. Hoboken: WileyBlackwell, 2009, s. 367. ISBN 978-0-470-08370-3
92. Gosling J. P. Immunoassays: a practical approach. New York: Oxford University Press, 2000, s. 304. ISBN 01-996-3710-5
93. Kristalyová K. *Rakovina prostaty – príznaky, liečba, prognóza, štádiá* [online]. 2020 [cit. 2022-03-02] .Dostupné z: <https://zdravovek.eu/rakovina-prostaty/>
94. Hanzel J. *Ochorenie prostaty- príznaky a liečba* [online], [cit. 2022-03-02] Dostupné z: https://zdravovyziva.sk/blog/2_ochorenie-prostaty-priznaky-a-liecba

95. Karlíková M. a Topolčan O. *Principy imunoanalytických metod pro mediky*. 2013, 16-17
96. Creative Biolabs. *ECLIA Based Kits Development* [online]. 2022 [cit. 2022-03-03]. Dostupné z: <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/diagnostics/eclia-based-kits-development.htm>
97. Siemens Healthineers. *ADVIA Centaur XPT Immunoassay System* [online], 2022 [cit. 2022-03-02]. Dostupné z: <https://www.siemens-healthineers.com/en-us/immunoassay/systems/advia-centaur-xpt>.
98. Siemens. Systémy ADVIA Centaur ADVIA Centaur XP a ADVIA Centaur XPT: PSA. *Originálny návod*. 2015, 1-18
99. Kysucká nemocnica s poliklinikou Čadca, Makuka J. Stanovenie freePSA na analyzátoch Advia Centaur setom fPSA fy Siemens. *Štandardný pracovný postup*. 2016, 1-4
100. Beckman Coulter. *Access 2 Immunoassay*. 2021, 12
101. Analis. *Access 2 Immunoassay system* [online]. 2022 [cit. 2022-03-03]. Dostupné z: <https://analis.be/en-us/immunoassay/access-2-immunoassay-system-132500>
102. Beckman Coulter. *Access immunoassay system testosterone*. 2006, 1-6
103. Roche. *Cobas e 411 analyzer* [online]. 2022 [cit. 2022-03-03]. Dostupné z: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-e-411.html>
104. Roche. *Cobas e 411 analyzer: Operator's Manual*. 2019, 19-32
105. Roche. Cobas: Elecsys NSE. *Originálny návod*. 2022, 1-4
106. Thompson I. M., Pauler D. K. a kol. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *New England Journal of Medicine*. 2004, **350**(22):2239-2246
107. Hornňák M. Karcinóm prostaty-Zásady hormonálnej liečby. *Onkológia*. 2006, **1**(3):188-192
108. Vukotic V., Cerovic S. a kol. The predictive value of PSA in diagnosis of prostate cancer in non screened population. *Acta chirurgica Iugoslavica* [online]. 2005, **52**(4):81-87

- 109.** Národné centrum zdravotníckych informácií. *Incidenca v jednotlivom roku podľa klinických štádií* [online]. 2022 [cit. 2022-03-29]. Dostupné z: [https://iszi.nczisk.sk/nor.sr/incidenca/rok/klinicke-stadia?filter={%22ukazovatel%22:%22abs%22,%22pohlavie%22:\[%22M%22\],%22rok%22:2012,%22stadium%22:\[%22I%22,%22II%22,%22III%22,%22IV%22,%22Nezn\u00e1me%22\],%22diagnoza%22:\[%22SPOLU%22\]}](https://iszi.nczisk.sk/nor.sr/incidenca/rok/klinicke-stadia?filter={%22ukazovatel%22:%22abs%22,%22pohlavie%22:[%22M%22],%22rok%22:2012,%22stadium%22:[%22I%22,%22II%22,%22III%22,%22IV%22,%22Nezn\u00e1me%22],%22diagnoza%22:[%22SPOLU%22]})
- 110.** Hussein A. A., Baran R. a Hussein A. Prostate-specific antigen and free prostate-specific antigen/prostate-specific antigen ratio in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Baghdad Journal of Biochemistry and Applied Biological Sciences*. 2020, **1**(01):18-26
- 111.** Tlijanki K. H., Anunobi C. C. a kol. The role of the percentage free PSA in the diagnosis of prostate cancer in Blacks: Findings in indigenous West African men using TRUS guided biopsy. *African Journal of Urology* . 2017, **23**(1):14-19
- 112.** Roddam A. W., Duffy M. J. a kol. Use of Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoforms for the Detection of Prostate Cancer in Men with a PSA Level of 2–10 ng/ml: Systematic Review and Meta-Analysis. *European Urology*. 2005, **48**(3):386-399
- 113.** Jansen F. H., Schaik R. H. N. a kol. Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoform p2PSA in Combination with Total PSA and Free PSA Improves Diagnostic Accuracy in Prostate Cancer Detection: Systematic Review and Meta-Analysis. *European Urology*. 2010, **57**(6):921-927
- 114.** Lazzeri M., Haese A. a kol. Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoform p2PSA in Combination with Total PSA and Free PSA Improves Diagnostic Accuracy in Prostate Cancer Detection: Systematic Review and Meta-Analysis. *BJU International*. 2013, **112**(3):921-927
- 115.** Kamiya N., Akakura K. a kol. Pretreatment Serum Level of Neuron Specific Enolase (NSE) as a Prognostic Factor in Metastatic Prostate Cancer Patients Treated with Endocrine Therapy. *European Urology*. 2003, 2007, **44**(3):309-314
- 116.** Sakuma T., Yoshida T. a kol. *Combined small-cell carcinoma/adenocarcinoma of prostate: report of two cases*. 2007, **53**(7):489-492
- 117.** Perachino M., Cavalli V. a Bravi F. Testosterone levels in patients with metastatic prostate cancer treated with luteinizing hormone-releasing hormone therapy: prognostic significance?. *BJU International*. 2010, **105**(5):648-651

PRÍLOHY

Príloha 1 Vek a hodnoty PSA náhodne vybratých pacientov

Pacient č.	Vek	PSA [ng/ml]	Výkon biopsie	Pacient č.	Vek	PSA [ng/ml]	Výkon biopsie
1	90	5,1	+	39	69	8,67	+
2	90	3,46	-	40	69	7,64	+
3	88	2,76	-	41	69	0,83	-
4	86	1,91	-	42	69	1,3	-
5	85	1,84	-	43	69	0,82	-
6	84	2,71	-	44	68	1,36	-
7	83	6,14	+	45	68	1,88	-
8	83	10,33	+	46	67	4,95	+
9	83	13,32	+	47	66	6,74	+
10	83	2,85	-	48	66	1,04	-
11	83	6,08	+	49	66	4,11	+
12	82	6,32	+	50	66	4,48	+
13	82	1,5	-	51	65	0,8	-
14	82	0,93	-	52	65	0,4	-
15	82	4,62	+	53	65	6,26	+
16	81	1,76	-	54	64	0,77	-
17	81	2,72	-	55	64	0,97	-
18	81	4,62	+	56	64	3,76	-
19	80	3,53	-	57	64	7,74	+
20	80	4,59	+	58	63	1,9	-
21	80	7,45	+	59	62	5,43	+
22	79	5,44	+	60	62	0,4	-
23	78	5,06	+	61	61	1,77	-
24	77	1,48	-	62	60	8,92	+
25	77	2,21	-	63	59	1,16	-
26	77	0,49	-	64	59	0,83	-
27	77	0,52	-	65	59	0,51	-
28	76	1,25	-	66	58	6,77	+
29	75	4,29	+	67	57	2,49	-
30	74	3,63	-	68	57	0,9	-
31	73	4,11	+	69	55	4,18	+
32	72	2,49	-	70	51	0,28	-
33	72	2,21	-	71	51	4,63	+
34	71	2,56	-	72	50	0,96	-
35	71	2,68	-	73	49	0,77	-
36	71	5,19	+	74	47	0,85	-
37	70	1,51	-	75	47	0,84	-
38	70	0,38	-	76	46	7,5	+

Príloha 2

Hodnoty pacientov s vykonanou biopsiou

Pacient č.	Vek	PSA [ng/ml]	fPSA [mg/ml]	p2PSA [ng/l]	fPSA [%]	PHI [%]	Diagnóza
<i>1</i>	90	5,1	2,54	70,19	12,9	62,4	CaP
<i>7</i>	83	6,14	2,23	2,23	36,3	12,3	BHP
<i>8</i>	83	10,33	0,95	58,8	9,3	178,62	CaP
<i>9</i>	83	13,32	4,2	13,59	32,1	43,16	CaP
<i>11</i>	83	6,08	10,13	0,41	42,8	10,13	BHP
<i>12</i>	82	6,32	1,1	18,55	17,4	51,29	CaP
<i>15</i>	82	4,62	1,33	15,81	28,8	45,18	CaP
<i>18</i>	81	4,62	2,16	8,21	46,8	38,13	BHP
<i>20</i>	80	4,59	0,79	39,08	17,2	66,15	CaP
<i>21</i>	80	7,45	0,97	22,25	13,0	58,91	CaP
<i>22</i>	79	5,44	1,69	4,70	31,1	18,51	BHP
<i>23</i>	78	5,06	1,33	12,65	26,3	37,84	CaP
<i>29</i>	75	4,29	1,9	6,80	44,3	26,75	BHP
<i>31</i>	73	4,11	1,23	3,43	29,9	8,56	BHP
<i>36</i>	71	5,19	1,28	20,08	24,7	58,54	CaP
<i>39</i>	69	8,67	1,04	18,70	12	57,25	CaP
<i>40</i>	69	7,64	1,71	5,82	22,4	27,53	CaP
<i>46</i>	67	4,95	1,2	7,61	24,2	20,32	BHP
<i>47</i>	66	6,74	0,68	65,86	10,1	116,27	CaP
<i>49</i>	66	4,11	0,87	4,22	21,2	7,44	BHP
<i>50</i>	66	4,48	0,55	21,19	12,3	24,67	BHP
<i>53</i>	65	6,26	1,43	2,62	22,8	9,39	BHP
<i>57</i>	64	7,74	1,48	19,95	19,1	82,16	CaP
<i>59</i>	62	5,43	0,48	21,01	8,8	23,5	BHP
<i>62</i>	60	8,92	1,49	7,30	16,7	32,5	CaP
<i>66</i>	58	6,77	0,98	9,17	50,4	23,38	BHP
<i>71</i>	55	4,18	1,12	2,91	26,7	12,82	BHP
<i>76</i>	46	7,5	0,705	151,4	9,4	145,12	CaP

* pacienti zhodní s prílohou č. 1

Príloha 3**Namerané hodnoty PSA a NSE pacientov**

Pacient	PSA [ng/ml]	NSE [ng/ml]	Diagnóza
<i>1</i>	6,56	9,4	CaP bez metastáz
<i>2</i>	9690	9	CaP bez metastáz
<i>3</i>	7,93	12,86	CaP bez metastáz
<i>4</i>	107,21	22,94	CaP s metastázami
<i>5</i>	4,17	14,83	CaP s metastázami
<i>6</i>	29,56	12,87	CaP s metastázami
<i>7</i>	12,29	16,5	CaP s metastázami
<i>8</i>	0,16	27,7	Zdravá prostata
<i>9</i>	0,4	18,5	Zdravá prostata
<i>10</i>	1,47	17,29	Zdravá prostata
<i>11</i>	2,36	11,97	Zdravá prostata
<i>12</i>	3	25,15	Zdravá prostata

Príloha 4**Monitorovanie pacienta XY**

Rok	Mesiac	PSA [ng/ml]	Testosterón [ng/ml]
2008		6,76	
2009		6,53	
2011		6,91	
2014		13,9	
2016		19,11	
2019		16,77	
2020	3.	23,79	0,79
2020	9.	0,05	0,25
2021	3.	0,05	0,1
2021	9.	0,1	0,36
2021	12.	0,8	0,57

Príloha 5 Monitorovanie pacienta XZ

Rok	Mesiac	PSA [ng/ml]	Testosterón [ng/ml]
2007		5,25	
2008		4,03	
2010		6,64	
2011		14,6	
2012	6.	20,7	
2012	12.	29,1	
2013	3.	46,8	
2013	7.	3,17	< 0,69
2013	10.	6,29	< 0,69
2014	1.	2,85	< 0,69
2014	4.	2,88	< 0,69
2014	10.	2,61	< 0,69
2015	1.	2,57	< 0,69
2015	4.	2,25	< 0,69
2015	10.	2,01	< 0,69
2016	7.	1,29	< 0,69
2017	1.	1,4	0,86
2017	4.	1,4	1,04
2017	7.	1,51	1,64
2017	10.	1,66	0,92
2018	1.	1,66	0,92
2018	4.	1,72	0,84
2018	10.	4,5	1,01
2019	2.	16,9	4,58
2019	5.	5,96	0,41
2019	8.	5,1	1,64
2019	11.	7,13	1,44
2020	2.	6,37	1,59
2020	5.	7,76	1,99
2020	8.	9,13	1,36
2020	11.	13,43	1,67