

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

PSA
-
metody stanovení a klinické využití.
Bakalářská práce

Hradec Králové, 2007

Michal Kráčmar

P o d ě k o v á n í

Rád bych poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Prof. RNDr. Miloši Tichému, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky, motivaci k vědecké práci a především trpělivost. Dále pak Prof. MUDr. Jaroslavovi Dršatovi, CSc. jakožto mému garantovi za farmaceutickou fakultu a všem zaměstnancům katedry biochemických věd FAF UK za ochotu a pomoc. Zvláštní dík patří zaměstnancům biochemické laboratoře Městské nemocnice Hořice a mé rodině.

Obsah:

OBSAH:	2
1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE	5
3. TEORETICKÁ ČÁST	6
3.1. PROSTATICKÝ SPECIFICKÝ ANTIGEN.....	6
3.1.1. <i>Historie PSA</i>	6
3.1.2. <i>Chemická a fyzikální charakteristika PSA</i>	6
3.1.3. <i>Fyziologie PSA</i>	7
3.1.4. <i>Distribuce v organismu, obsah ve tkáních</i>	8
3.1.5. <i>Způsob vylučování – metabolismus</i>	10
3.2. NÁDOROVÉ MARKERY A PSA.....	10
3.2.1. <i>Nádorové markery</i>	10
3.2.1.1. <i>Interpretace výsledků nádorových markerů</i>	12
3.2.1.2. <i>Využití nádorových markerů</i>	13
3.2.1.3. <i>Kontrola efektu terapie</i>	13
3.2.1.4. <i>Prognóza</i>	13
3.2.1.5. <i>Screening</i>	14
3.2.2. <i>PSA – jako nádorový marker</i>	14
3.3. PŘEDSTOJNÁ ŽLÁZA.....	15
3.3.1. <i>Funkce prostaty</i>	17
3.3.2. <i>Stavba</i>	17
3.3.3. <i>Onemocnění prostaty</i>	18
3.4. ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ PROSTATY	18
3.5. BENIGNÍ HYPERPLAZIE PROSTATY.....	19
3.5.1. <i>Definice</i>	19
3.5.2. <i>Epidemiologie</i>	20
3.5.3. <i>Diagnostika</i>	20
3.5.3.1. <i>Fyzikální vyšetření</i>	20
3.5.3.2. <i>Laboratorní vyšetření</i>	20
3.5.3.3. <i>Další diagnostické metody</i>	21
3.5.3.4. <i>Diferenciální diagnostika</i>	21
3.5.4. <i>Terapie</i>	22
3.5.4.1. <i>Medikamentózní léčba</i>	22
3.6. KARCINOM PROSTATY	22
3.6.1. <i>Definice</i>	23
3.6.2. <i>Epidemiologie</i>	23
3.6.3. <i>Diagnostika</i>	25

3.6.4.	<i>Vyšetřovací metody</i>	25
3.6.4.1.	<i>Vyšetření krve</i>	25
3.6.5.	<i>Terapie</i>	26
3.6.5.1.	<i>Léčba nádoru omezeného na prostatu</i>	26
3.6.5.2.	<i>Léčba pokročilého karcinomu prostaty</i>	26
3.7.	PSA A DETEKCE KARCINOMU PROSTATY	27
3.7.1.	<i>Celková hladina PSA</i>	27
3.7.2.	<i>Volné PSA</i>	27
3.7.3.	<i>Poměr volný/celkový PSA (f/t PSA)</i>	28
3.7.4.	<i>Věkově specifické PSA</i>	28
3.7.5.	<i>PSA densita (PSAD)</i>	29
3.7.6.	<i>PSA densita přechodné zóny (PSA-TZ)</i>	29
3.7.7.	<i>PSA velocita (PSAV)</i>	29
3.7.8.	<i>Zdvojovací čas PSA</i>	30
3.8.	METODY STANOVENÍ PSA	31
3.8.1.	<i>Imunoradiometrická analýza (IRMA)</i>	31
3.8.2.	<i>Radioimuanalýza (RIA)</i>	32
3.8.3.	<i>Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)</i>	33
3.8.4.	<i>Enzymová imunoanalýza na mikročásticích (MEIA)</i>	33
3.8.5.	<i>Luminoimunoanalýza (LIA)</i>	34
3.8.6.	<i>Imunoluminometrická analýza (ILMA)</i>	35
3.8.7.	<i>Metoda RT-PCR</i>	35
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.9.	VLASTNÍ VÝSLEDKY MĚŘENÍ	36
5.	DISKUSE	40
6.	ZÁVĚR Z VLASTNÍHO MĚŘENÍ	41
7.	SOUHRN	42
8.	SEZNAM ZKRATEK	43
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	45
10.	LITERATURA	46

1. Úvod

Prostatický specifický antigen je v klinické biochemii řazen mezi nádorové markery. V poslední době se vedou především diskuze o jeho využití, coby screeningového testu při určení karcinomu prostaty, respektive k rozlišení karcinomu prostaty od benigní hyperplazie prostaty. Jde zejména o správné určení cut off hodnoty, kterou se nastaví optimální poměr senzitivity a specifity daného testu. Správné určení referenční hladiny testu má veliký význam pro další léčebný postup u konkrétního pacienta. Zejména jde o odvrácení nepříjemného invazivního vyšetření v případě překročení cut off hodnoty.

Metody stanovení tohoto nádorového markeru jsou poměrně dosti citlivé (ng/ml) a převážně založené na různé formě imunoanalýzy. Interpretace jednotlivých výsledků jsou hlavně závislé na druhu použité metody a na typu přístroje na kterém se daná analýza provádí.

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je pokud možno podat celkový přehled o klinickém využití prostatického specifického antigenu a o možnostech jeho stanovení.

Teoretická část bude zaměřena především na podání základní charakteristiky PSA a na možnosti jeho stanovení. Dále zde bude pojednáno o nádorových markerech jako celku a pokusím se o hrubé popsání předstojné žlázy – především její patofyziologie versus stanovení PSA.

Experimentální částí se pokusím ověřit publikované výsledky referenčních hodnot PSA v závislosti na věku pacienta a jejich konečné využití. K tomuto účelu budou sloužit nashromážděná data naměřených výsledků od pacientů naší laboratoře v průběhu roku 2006.

3. Teoretická část

3.1. Prostatický specifický antigen

3.1.1. Historie PSA

Prostatický specifický antigen (PSA) byl objeven a popsán v sedmdesátých letech. Jako první ho identifikoval v prostatické tkáni Ablin a spol. již v roce 1970 (1,2). V roce 1971 jej Hara a spol. objevili v seminální plazmě (3). V roce 1978 byl definován biochemicky (Sensabaugh a Crim) a v roce 1979 Wang a spol. izolovali PSA z prostatické tkáně (4).

K většímu využití PSA, jakožto nádorového markeru došlo až v osmdesátých letech, kdy byly zavedeny imunoanalytické metody jeho stanovení.

V molekule PSA bylo doposud identifikováno 5 různých antigenních determinant a jejich mapování dále pokračuje. Imunologicky aktivním je volný PSA a z komplexů jen PSA-ACT a PSA-AT. Pomocí protilátek proti PSA nelze jeho ostatní formy stanovit. Imunoanalytické stanovení PSA může dále komplikovat přítomnost homologických kallikreinů a zkřížené reakce jiných látek.

3.1.2. Chemická a fyzikální charakteristika PSA

PSA je glykoprotein s molekulovou hmotností kolem 34 kDa. Jeho molekula se skládá z polypeptidického řetězce 237 aminokyselin, na který je navázaná (na dusík kyseliny asparágové) uhlohydrátová část, která však tvoří jen méně než 10% molekuly.

Patří mezi žlázové proteiny kallikreinového typu (hK3 \Rightarrow PSA) a je strukturálně homologický s pankreatickým kallikreinem hK1 (62% homologie s PSA) a glandulárním kallikreinem hK2 (80% homologie). Gen PSA je (spolu s ostatními kallikreiny) lokalizován na chromosomu 19.

V organismu se vyskytuje v řadě různých forem, především jako volný (fPSA) a vázaný, ve formě různých komplexů s inhibitory proteáz. Volný PSA se vyskytuje v 5 různých izoformách A – E, z nichž první dvě mají enzymovou aktivitu, kdežto tři ostatní jsou částečně degradované (“nickované”) a neaktivní izoenzymy. Izoelektrický bod leží mezi 6,8 – 7,2. V komplexech je PSA vázaný na α 1-antichymotripsin (PSA-ACT), α 2-makroglobulin (PSA-AMG), protein-C inhibitor (PSA-PCI), α 1-antiproteáza nebo α 1-antitrypsin (PSA-AT), inter- α -trypsin (PSA-IT). Tyto jednotlivé formy PSA mají odlišné vlastnosti.

3.1.3. Fyziologie PSA

PSA je enzym patřící k serinovým proteázám s proteolytickou aktivitou podobnou chymotripsinu. Secernují ho epiteliální buňky prostaty, které lemujícími aciny a dukty prostatické tkáně. V seminální plazmě je zodpovědný za její ztekucení při postejakulačním rozpouštění spermatického gelu, prostřednictvím proteolytického štěpení vysokomolekulárních proteinů.

Vyskytuje se především ve spermatu, kde je jeho koncentrace velmi vysoká (0,2-0,5 mg/ml). Nejvyšší koncentraci PSA v těle však obsahuje lumen acinů. Aby se PSA dostal do krevního oběhu, musí překonat významnou bariéru mezi prostatickým lumen a kapilární krví, zahrnující prostatickou bazální membránu, stroma, kapilární bazální membránu a kapilární endoteliální buňku.

V séru existuje PSA ve 2 formách - volný a vázaný s alfa1 antichymotrypsinem nebo s alfa2 makroglobulinem. Laboratorně stanovitelný je PSA vázaný na alfa1 antichymotrypsin (cca 50-90 % stanovitelného PSA) a volný PSA (fPSA-cca 5-50 % stanovitelného PSA). Komplex PSA s alfa2 makroglobulinem tvoří nedetekovatelnou složku (5,6). Sérový poločas celkového PSA je 1,9 – 3,2 dny, poločas volného PSA necelé 2 hodiny(7,8).

Patologicky zvýšená produkce PSA je spojována především s karcinomy prostaty, ale může se vyskytovat i při některých benigních onemocněních prostaty, obzvláště při benigní hyperplazii (BPH), prostatitidě a infarktu prostaty. Lze ji také nalézt při mechanickém dráždění a vyšetření prostaty (vyšetření per rectum, cévkování, cystoskopie, biopsie, aj.).

U karcinomu prostaty jsou zdrojem PSA zejména dobře diferencované maligní tkáně prostaty a kostní metastázy karcinomu prostaty. Jeho produkce může být ovlivňována i některými léky. Vyšší hladiny PSA byly výjimečně zaznamenány i u jiných maligních onemocnění, jako jsou karcinomy plic, prsu, nadledvin, kolorektální a hepatocelulární karcinomy, aj.

Představy o výlučné tkáňové specifitě PSA tak byly v posledních létech překonány, avšak podíl extraprostatického PSA je relativně malý a z hlediska vlivu na celkové sérové koncentrace PSA zpravidla zanedbatelný. Předpokládá se, že PSA plní i funkci modulátora buněčného růstu.

3.1.4. Distribuce v organismu, obsah ve tkáních

PSA se nevyskytuje pouze ve tkáních, ve kterých vzniká, ale i v tělních tekutinách, a to zejména v prostatické tekutině, seminální plazmě a krvi (sérum, plazma).

Převážná část PSA produkovaná normální prostatou je vylučována do seminální plazmy, ve které jeho koncentrace dosahují 0,5 – 2 mg/ml. Většina tohoto PSA je enzymově aktivní, 15 – 30% neaktivní (“nickovaný”) PSA a méně než 10% je neaktivní následkem vazby na PCI.

Za normálních okolností jen malá část PSA přechází do cirkulace a jeho koncentrace v krevním séru jsou cca o 6 řádů nižší než v seminální tekutině. V séru je PSA přítomný ve dvou frakcích – jako volný a vázaný. Volný (nevázaný) PSA je “nickovaný” a tvoří menší část (5 - 40%) celkového PSA. Převážná část sérového PSA je vázaná v komplexech s inhibitory proteáz, většina s ACT a jen malá množství s AT a AMG (jen u pacientů s velmi vysokými hladinami PSA). Sérum obsahuje velké množství těchto antiproteáz, přičemž největší afinitu k PSA má AMG, menší ACT a minimální AT. Avšak vzhledem ke krátkému biologickému poločasu PSA-AMG a poměrně dlouhému PSA-ACT, je tento druhý komplex hlavní formou PSA v cirkulaci a v séru. Z praktického hlediska tedy ani nevádí, že pomocí běžných imunoanalytických postupů k vyšetření PSA není přímé stanovení PSA-AMG v séru možné (imunoreaktivní vazebná místa PSA jsou zablokována navázaným AMG).

Pro klinické účely se pomocí imunoanalytických metod obvykle vyšetřují sérové koncentrace tzv. celkového PSA (TPSA), které zahrnuje fPSA, PSA-ACT a PSA-AT.

Koncentrace PSA v séru koreluje s objemem (epitelu) prostaty a protože objem prostaty s věkem vzrůstá, zvyšují se i hladiny PSA (ovlivňují je i další, ale méně významné faktory). Proto rozmezí normálních koncentrací PSA v séru se s věkem zvyšuje (Oesterling a spol., 9):

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

Bylo zjištěno, že zvýšení sérové koncentrace PSA na jednotku hmotnosti prostatické tkáně je v případě BPH asi třikrát větší a karcinomu 10 - 30krát větší než u normální prostatické tkáně. Toto zvýšení však není způsobeno zvýšením lokální produkce PSA nádorovými buňkami, ale změnou mechanismu a rychlosti sekrece PSA do cirkulace.

V normální tkáni a u BPH PSA napřed proniká do extracelulární tekutiny, ze které pak teprve difunduje do krve (v případě BPH je uvolňování PSA ze tkáně zřejmě snadnější). U karcinomu jsou membrány i struktura tkáně narušeny a PSA je vylučován rychleji do extracelulární tekutiny anebo přímo do cirkulace.

Diagnostika karcinomu prostaty je však komplikována skutečností, že sérové koncentrace (celkového) PSA jsou zvýšeny nad normální hodnoty i u řady mužů s BPH. Proto koncentrace PSA v rozmezí od 4 do 10 ng/ml jsou pokládány za hraniční (suspektní), ve skupině vyšetřovaných s PSA od 10 do 20 ng/ml se vyskytuje ještě několik % pacientů s BPH a teprve při hodnotách nad 20 ng/ml se s největší pravděpodobností jedná o karcinom prostaty. Proto ke zvýšení klinické specifiity vyšetření PSA při diagnostice ca prostaty se užívá výpočet PSA-density, PSA-velocity a v posledních letech zejména stanovení poměru volného a celkového PSA (ve formě podílu nebo v %).

Nižší podíl volného PSA v séru nemocných s Ca prostaty ve srovnání s nemocnými s BPH a zdravými muži souvisí se změnou mechanismu a zvýšením rychlosti přechodu PSA do cirkulace u nemocných s karcinomem. Do cirkulace se tak dostává větší podíl aktivního PSA, který může vytvářet komplexy s antiproteázami. Naopak, u zdravých mužů a nemocných s BPH přechod PSA trvá delší dobu, během které dochází k jeho značné degradaci za vzniku "nickovaného" PSA, který komplexy netvoří. U normálních mužů je index volného PSA okolo 35%, u BPH zpravidla výrazně přesahuje 20% a u Ca prostaty je nižší 20%. Diskriminační hodnoty indexu volného PSA užívané v praxi se značně liší (15 ÷ 25%) a podobně jako výsledky vyšetření (celkového) PSA jsou závislé na užití metodě stanovení a některých dalších faktorech.

Jako referenční hodnoty a diskriminační hladiny vyšetření PSA (celkového, indexu volného) v klinické praxi je proto možné užívat jen hodnoty ověřené pro danou laboratoř a metodu.

3.1.5. Způsob vylučování – metabolismus

Vytváření komplexu s AMG a jeho rychlé odstraňování z cirkulace (zřejmě v játrech) je hlavním mechanismem metabolismu a vylučování PSA.

3.2. Nádorové markery a PSA

3.2.1. Nádorové markery

Jsou to látky, které často vznikají v souvislosti se změněným metabolismem nádorově transformované buňky, a proto jejich hladiny v přítomnosti malignity výrazně stoupají. Prokázat je můžeme jednak přímo v nádorové tkáni (celulární nádorové markery) a nebo v tělních tekutinách (humorální nádorové markery).

Historie nádorových markerů začíná již v roce 1845 objevením Bence Jonesovy bílkoviny v moči při zkoušce varem (průkaz monoklonálních lehkých

řetězců imunoglobulinů při diagnostice monoklonálních gamapatií). V současné době jsou nádorové markery středem pozornosti při diagnostice, léčbě a dlouhodobém sledování nemocných s maligním onemocněním. Mohou přispět k rozlišení mezi benigním a maligním nádorem, k určení stadia onemocnění a především jsou vhodné pro včasný záchyt recidivy onemocnění. Při vyšetřování nádorových markerů je nutné si uvědomit jejich optimální indikaci a současně i limity vyšetření. Orgánová specifika při vyšetřování jednoho izolovaného markeru je relativně nízká a zvyšuje se především při použití kombinací nádorových markerů. Spolehlivost vyšetření nádorových markerů je dána senzitivitou a specificitou vyšetření, tj. výskytem falešně pozitivních nebo falešně negativních výsledků. Ideální nádorový marker by měl splňovat tato kritéria (10):

- nádorový marker je produkován pouze u maligních onemocnění
- je orgánově specifický
- vyskytuje se ve vysokých koncentracích v biologických tekutinách
- hladina koreluje s velikostí nádoru
- hladina koreluje se stádiem onemocnění
- hladina koreluje s prognózou
- hladina koreluje s efektem léčby
- umožňuje důkaz zbytkové nádorové tkáně

Bohužel nádorový marker, který by splňoval veškeré tyto požadavky v současné době neexistuje. Užívané markery však splňují alespoň některá z těchto kritérií. V současné době je známo více než 200 látek, které jsou označovány za nádorové markery a jejich počet neustále narůstá.

Nádorové markery je možno třídit podle různých hledisek. Nejčastěji se dělí podle chemické struktury nebo podle biologické funkce dané látky v organismu. Podle chemické struktury lze dělit na glykoproteiny, polypeptidy, cukerné determinanty glykoproteinů, glykolipidy, polyaminy, imunoglobuliny a glycidy. Podle biologické funkce se dělí na onkofetální antigeny, enzymy, hormony, receptory a ostatní blíže nespecifikované látky.

3.2.1.1. Interpretace výsledků nádorových markerů

Pro klinické zhodnocení nádorových markerů se používají zejména následující statistické pojmy:

- cut off (referenční hladina) - při primární diagnostice je definována jako hladina markeru pod kterou leží většina hodnot zdravých lidí a pacientů s benigním onemocněním
- při sekundární diagnostice je definována jako hladina markeru pod kterou leží většina hodnot pacientů s kompletní remisí
- Senzitivita (SN) - udává procento správně pozitivních výsledků z daného souboru.
- Specifita (SP) - udává procento správně negativních výsledků z daného souboru.
- BV + (pozitivní prediktivní hodnota) - udává v procentech, s jakou pravděpodobností bude mít pacient hledanou chorobu, když bude výsledek testu pozitivní
- BV – (negativní prediktivní hodnota) udává v procentech, s jakou pravděpodobností bude mít pacient hledanou chorobu, když bude výsledek testu negativní

Optimální interpretace výsledků nádorových markerů vyžaduje znalost jak metabolických problémů, tak i znalost průběhu onemocnění u daného nemocného. Základním předpokladem interpretace je vyšetření cut off mezi benigním a maligním nádorem, mezi remisí a progresí. Nejlepší, pokud to počet prováděných vyšetření dovolí, je stanovení vlastní cut off pro každou diagnózu a pro jednotlivé klinické stavy.

3.2.1.2. Využití nádorových markerů

Největší uplatnění mají nádorové markery pro dlouhodobé sledování s cílem včasného zachytu progresu onemocnění a generalizace. Pomocí pravidelného vyšetření nádorových markerů lze zachytit metastázy 4-6 měsíců před klinickými projevy. Doporučené časové intervaly kontrolních odběrů dle WHO jsou:

- první rok – 1x měsíčně
- druhý rok – 1x za dva měsíce
- třetí rok – 1x za tři měsíce

Příležitostné indikování a vyšetřování nádorových markerů není smysluplné. Nejdůležitější pro hodnocení nádorových markerů je dynamika změn nádorových markerů, nikoliv absolutní hodnoty hladin. Částečné využití nádorových markerů lze aplikovat na kontrolu efektu terapie a na prognózu.

3.2.1.3. Kontrola efektu terapie

Pro řadu nádorových onemocnění existují vhodné markery. Ke kontrole efektu terapie nádorových onemocnění. Je třeba počítat s falešnou negativitou i pozitivitou v určitém procentu případů.

3.2.1.4. Prognóza

Zvýšené či vysoké předoperační hodnoty upozorňují na možné vyšší stádium a tím i obecně horší prognózu.

3.2.1.5. Screening

Kritéria pro screeningový test jsou : efektivita včasného zachytu a správnost screeningového testu. (především senzitivita a specifita). Bohužel vzhledem k nízké senzitivitě v časných stádiích nelze nádorové markery použít na screening malignit.

3.2.2. PSA – jako nádorový marker

Indikace k vyšetření

- diagnostika karcinomu prostaty
- kontrola po radikální prostatektomii
- monitorování konzervativní terapie a průběhu Ca prostaty
- diferenciální diagnostika mezi hypertrofií prostaty a Ca prostaty
- monitorování hypertrofie prostaty s cílem časně diagnostiky maligního zvratu
- screening Ca prostaty (není zcela jednoznačný – protichůdné názory)

Zvýšené hladiny u maligních onemocněních

- Ca prostaty
- Ca plic
- Kolorektální Ca
- Ca prsu
- Hepatocelární Ca
- Ca nadledvin

Zvýšené hodnoty při benigní etiologii onemocnění

- BHP
- Prostatitida
- Infarkt prostaty
- Mechanické dráždění prostaty

Hodnoty PSA

Normální hodnoty: 0 – 4 ng/ml

Hraniční hodnoty: 4 - 10 ng/ml

Patologické hodnoty: 10 ng/ml a výše

Hodnoty fPSA

Při hodnotách PSA mezi 4 – 10 ng/ml je dobré též stanovit fPSA. Nehodnotí se ovšem výsledná koncentrace fPSA, ale poměr hodnot $fPSA/PSA \times 100$ (v procentech).

Maligní nádor: 0 – 15 %

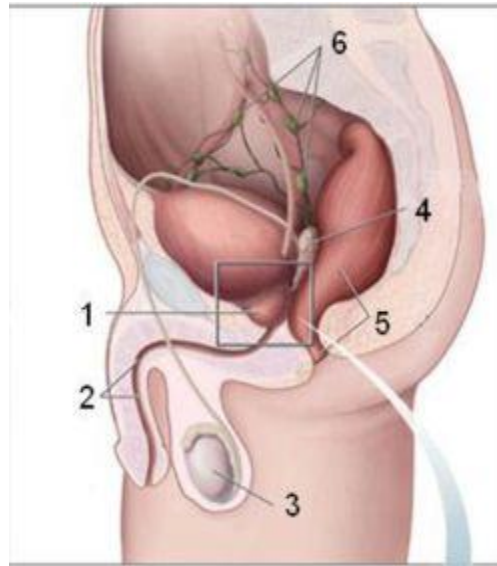
Hraniční hodnoty: 15 – 20 %

Benigní onemocnění: 20 % a více

3.3. Předstojná žláza

Předstojná žláza (lat. Prostata) je přídatná pohlavní žláza, jejíž sekret je součástí ejakulátu a zvyšuje životaschopnost spermií. Prostata zdravého muže je velká asi jako vlašský ořech, je umístěna pod močovým měchýřem (obr. 1, 2) jako prstenec obkružuje močovou trubici. Je vklíněná do prostoru mezi stydkou kostí a konečníkem - faktu, že se dotýká stěny konečníku a je tak poměrně snadno dostupná, se využívá jak při rektálním vyšetření prostaty, tak při sexu.

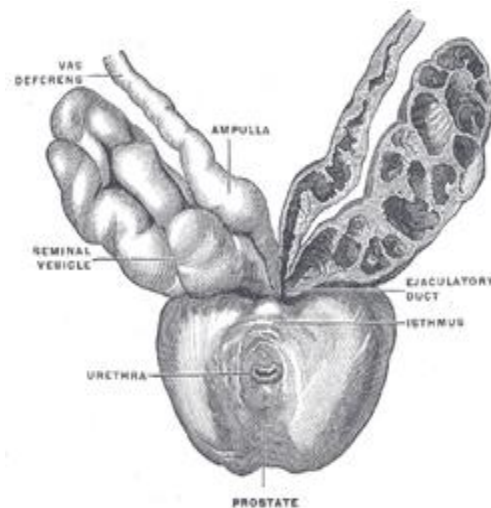
- 1.- Prostata
- 2.- močová trubice
- 3.- varle
- 4.- Semenný váček
- 5.- konečník
- 6.- mízní uzliny



umístění mužské prostaty



Obrázek 1: nákres prostaty



Obrázek 2: detail prostaty a semenných váčků

3.3.1. Funkce prostaty

Základní funkcí prostatických žlázek (obr. 2) je vylučovat sekret, který se při ejakulaci mísí se spermii a tvoří 10-30% ejakulátu. Sekret sám o sobě je bezbarvá nebo slabě opaleskující tekutina, se slabě kyselou reakcí (pH 6,4). Má typický zápach. Obsahuje bílkoviny (u člověka méně než 1% objemu), hlavně imunoglobuliny, kyselou fosfatázu, proteázy a prostatický specifický antigen, dále nacházíme polyaminy spermin a spermidin, prostaglandiny, kyselinu citrónovou a zinek.

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

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

3.3.2. Stavba

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

Žláza vzniká modifikací stěny močové trubice a u mužského plodu se objevuje v 9. týdnu nitroděložního vývoje. Materiálem pro vznik prostaty je močová trubice, Wolffův vývod a okolní mezenchym. Homologní strukturou u žen jsou parauretrální žlázy, které jsou vytvořené u některých žen a jsou příčinou tzv. ženské ejakulace.

U lidí se, z anatomického hlediska, prostata skládá z pěti laloků: pravého, levého, předního, zadního a středního. V průběhu života srůstají a v dospělosti

již zcela splynou. V urologické praxi se proto používá rozdělení prostaty podle McNeala na tři zóny:

- Periferní zóna (PZ)

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

- Centrální (vnitřní) zóna (CZ)

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

- Tranzitorní (přechodná) zóna (TZ)

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

3.3.3. Onemocnění prostaty

- Zánět prostaty (prostatitis)
- Benigní hyperplazie prostaty
- Karcinom prostaty

3.4. Zánětlivá onemocnění prostaty

Zánět prostaty je možno rozdělit podle následující tabulky:

A - akutní infekční prostatitis

B - chronická infekční prostatitis

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

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

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

D - bezpříznakový záněť prostaty znamená, že takový pacient nemá žádné obtíže a přijde se na toto onemocnění při vyšetřování pro jinou chorobu.

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

3.5. Benigní hyperplazie prostaty

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

Benigní prostatická hyperplazie postihuje většinu mužů, pokud mají normální endokrinní funkci varlat a žijí dostatečně dlouho. Její riziko začíná od 40. roku života, v 5. decenniu ji lze očekávat u 20 % mužů, v 6. decenniu u 60 % a v 7. decenniu u 70 % mužů, pouze asi 25 % z nich však potřebuje léčbu. Do začátku devadesátých let bylo jedinou léčebnou alternativou pouhé sledování nebo operační léčba (11).

3.5.1. Definice

BPH je definována jako nezhoubné uzlované zbytnění prostatické tkáně. Anatomicky vychází z periuretrální a tzv. přechodné zóny prostaty. U postižených mužů tvoří až 70 % celkového objemu tkáně. Onemocnění je výrazně závislé na věku pacienta. Může se projevovat celou řadou příznaků, zahrnovaných někdy pod označení BOO (bladder outlet obstruction) nebo širší a častěji používaný pojem LUTS (lower urinary tract symptoms).

3.5.2. Epidemiologie

V prevalenci BPH existují celosvětově velké geografické a rasové rozdíly. Literárně udávaná data v souvislosti s výskytem prostatické hyperplazie se často rozcházejí nebo nejsou zcela objektivní. Obecně se dá říci, že BPH je histologicky prokazatelná u 40–50 % mužské populace ve věkové skupině 50–60 let a u 10–20 % pacientů se manifestuje klinickými projevy. Incidence BPH s věkem narůstá a u mužů starších 80 let se s hyperplazií prostaty setkáváme ve více než 90 % případů. Klinické projevy onemocnění má více než 60 % pacientů této věkové skupiny. Vyšší výskyt prostatické hyperplazie byl zaznamenán u Afroameričanů a u Židů. Vzhledem k prodlužování průměrné délky života a celkovému stárnutí populace v zemích Evropy a Severní Ameriky se incidence BPH zvyšuje.

3.5.3. Diagnostika

3.5.3.1. Fyzikální vyšetření

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

3.5.3.2. Laboratorní vyšetření

Součástí diagnostického postupu u pacientů s BPH je dále laboratorní a bakteriologické vyšetření moče a stanovení hladiny PSA, urey a kreatininu v séru.

Hladina PSA je závislá na věku pacienta, objemu prostatické tkáně a může být ovlivněna akutním či chronickým zánětem prostaty nebo instrumentací v dolních močových cestách.

3.5.3.3. Další diagnostické metody

- Ultrazvukové vyšetření
- Rentgenové vyšetření
- Urodynamické vyšetření

3.5.3.4. Diferenciální diagnostika

Okruh onemocnění, jejichž symptomy jsou podobné jako u BPH, je poměrně široký. Vyloučit musíme zejména karcinom prostaty, který se vyskytuje ve stejné věkové skupině jako prostatická hyperplazie a v současnosti představuje 2. nejčastější maligní onemocnění mužské populace nad 50 let. Nejdůležitějšími vodítky v jeho diagnostice je palpační vyšetření per rectum, stanovení hladiny PSA a transrektální ultrasonografie (TRUS).

Nejcitlivějším indikátorem je hladina PSA v séru, která by neměla přesahovat hranici 4 ng/ml, avšak jak již bylo zmíněno výše, PSA roste s věkem a toto číslo tedy neplatí absolutně. Při elevaci PSA stanovujeme hladinu volné frakce PSA v séru a poměr volného a vázaného PSA. Zejména při nižších hladinách PSA 2,5–4,0 ng/ml nás poměr volný/celkový PSA, který by neměl poklesnout pod 15%, upozorňuje na možnou přítomnost karcinomu (12).

Senzitivita ostatních zmíněných vyšetření v záchytu karcinomu prostaty je spíše nižší a je nutné kompletní zhodnocení výsledků v korelaci s hladinou PSA. Při přetrvávajícím podezření na zhoubné onemocnění prostaty indikujeme punkční biopsii pod kontrolou TRUS. Jedná se o minimálně zatěžující a pacienty dobře tolerovaný zákrok prováděný ambulantně v lokální anestezii, je vhodná antibiotická profylaxe.

Obdobnou symptomatologii jako BPH může mít chronická prostatitida, se kterou se setkáváme spíše u mladších mužů. Při vyšetření per rectum nenacházíme zvětšenou prostatu a v popředí klinických obtíží většinou stojí neurčitá bolest na hrázi, v inguinách a šourku.

K dalším onemocněním, které se klinicky projevují jako LUTS, patří nádory močového měchýře, striktury uretry, vrozené vady dolních močových cest a

neurogenní poruchy mikce, spojené s neurologickými a systémovými chorobami jako diabetes mellitus, sclerosis multiplex apod.

3.5.4. Terapie

V posledních 10 letech došlo k velice rychlému rozvoji na poli medikamentózní léčby prostatické hyperplazie a na trhu se objevila celé řada nových preparátů. Celosvětově v současné době farmakoterapie dominuje nad operační léčbou BPH. Jen asi 20–30 % pacientů se symptomatologií BPH je léčeno chirurgickými postupy.

3.5.4.1. Medikamentozní léčba

Preparáty příznivě ovlivňující mikci v souvislosti prostatickou hyperplazií může rozdělit do 3 skupin:

- blokátory alfa 1 adrenoreceptorů
- inhibitory 5–alfa reductázy
- fytopreparáty

3.6. Karcinom prostaty

Výskyt rakoviny prostaty má vzrůstající trend. Za 15 let se počet nahlášených onemocnění ztrojnásobil.

Příčinu zvratu vývoje normální buňky v nádorovou zatím přesně neznáme. Nádor se obvykle vyvíjí pomalu a nezpůsobuje nemocnému větší potíže. Teprve když tlačí na močovou trubici a omezuje její průsvit, objeví se obtíže s močením.

Karcinom prostaty nesouvisí s hypertrofickou poruchou orgánu, může se však vyskytovat současně. Nádor v časných stádiích nevyvolává obtíže, ale

pokud se vyvíjí současně s hyperplasií, umožňuje vyšetření lékařem jeho včasné rozpoznání.

Na vzniku karcinomu se podílí řada vlivů, např.:

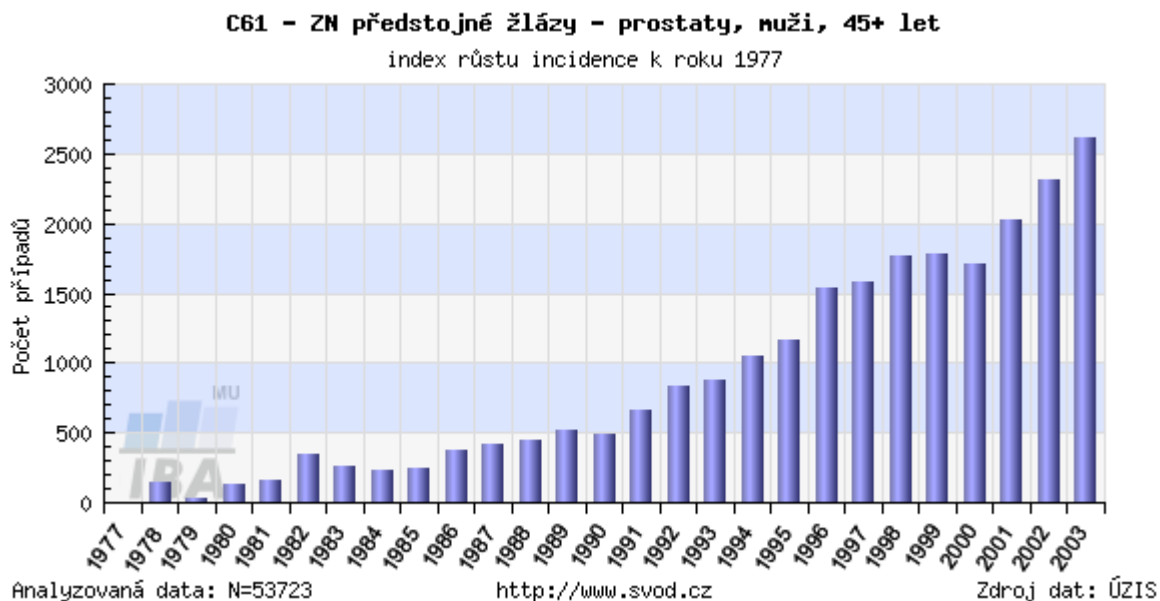
- Hormonální vlivy - působení dihydroandrosteronu, který stimuluje produkci růstových faktorů s parakrinními a autokrinními vlivy.
- Genetické vlivy – předpokládá se, že 9% karcinomů vzniká na dědičném podkladě, jedná se o autosomálně dominantní typ dědičnosti se vztahem ke ztrátě supresorového genu tumoru.
- Profesionální vlivy – radioaktivní záření, herbicidy a pesticidy a některé těžké kovy. Jejich karcinogenita nebyla jednoznačně prokázána, zřejmě hraje významnou roli délka a intenzita expozice.

3.6.1. Definice

Karcinom (nádor) je prakticky nezvratná změna tkáně ve smyslu jejího místně neregulovaného růstu a autonomní povaze. Nevratnost (ireverzibilita) je míněna tak, že vzniklý nádor se již nemůže přeměnit v normální tkáň. Autonomní povaha nádoru znamená, že nádor roste bez ohledu na nositele nádoru. Nádorové bujení (až na výjimky) vychází z buněk vlastního těla. Podstatné pro vznik nádoru je, že se vymyká z kontrolních mechanismů, které řídí růst normálních tkání (13).

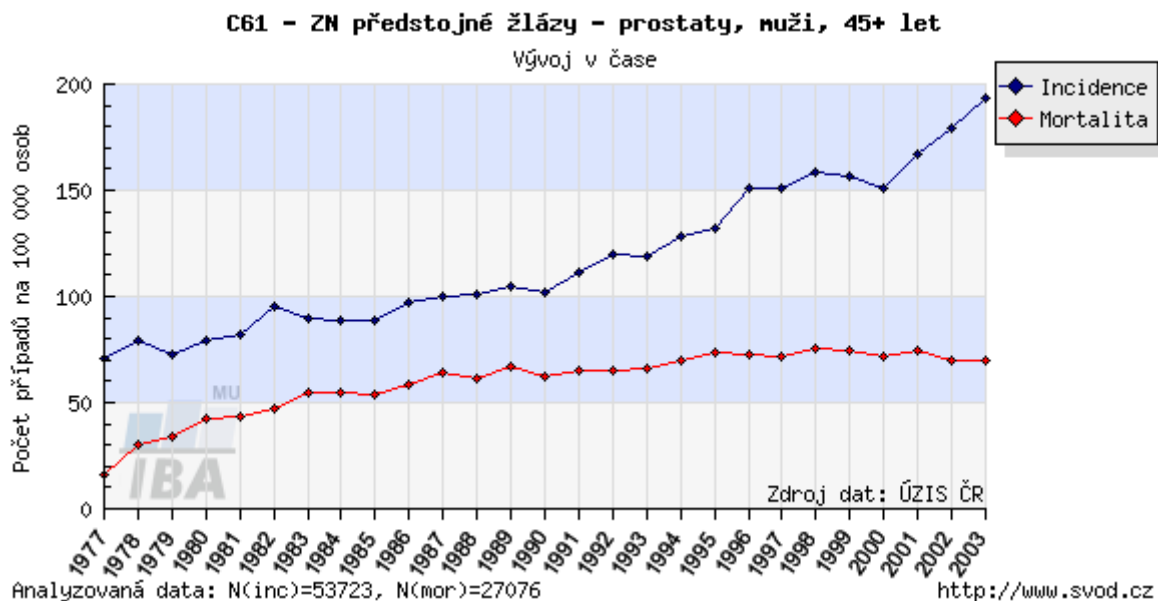
3.6.2. Epidemiologie

Ca prostaty se tradičně považuje za onemocnění vyššího věku – nad 70 let. Ovšem během posledních let byl zaznamenán výrazný růst incidence i v nižších věkových kategoriích (40 – 70 let, obr. 3).



Obrázek 3: zhoubné nádory prostaty – Incidence v České republice (2003)

Trend incidence vykazuje v ČR stejně jako ve světě významný růst. Přestože dochází k růstu incidence, mortalita se výrazněji nemění (obr. 4). Tato skutečnost dána vysokým věkem nemocných, trpících řadou dalších onemocnění, která je usmrtí dříve než karcinom.



Obrázek 4: zhoubné nádory prostaty – Incidence a mortalita v České republice (2003)

Existují výrazné geografické a rasové rozdíly. Například vysoká četnost výskytu karcinomu ve Skandinávii. Dále je prokázáno, že riziko onemocnění u černochů v USA je o 70% větší než riziko onemocnění u bělochů. Naopak riziko onemocnění u žlutého plemene (Japonsko a některé země Asie) je 3x nižší než riziko onemocnění u bělochů (nižší aktivita 5-alfa reduktázy).

3.6.3. Diagnostika

Většina karcinomů vyrůstá z periferní zóny prostaty a proto nemusí delší dobu působit žádné obtíže. První příznaky bývají často shodné s mikčními obtížemi při BHP. Karcinom prostaty se často vyvíjí v terénu změněném benigní hyperplazií a akcentuje její symptomatologii, není však výsledkem její maligní transformace (14).

3.6.4. Vyšetřovací metody

- Vyšetření ultrazvukem (sonografie)
- Rentgenové zobrazení ledvin a močových cest (urografie)
- Vyšetření krve
- Zobrazení kostí (scintigrafie skeletu)
- Cystoskopie

3.6.4.1. Vyšetření krve

Kromě standardních vyšetření, jako je krevní obraz, sedimentace erytrocytů jaterní testy, se při podezření nebo při léčbě a po ní stanovuje PSA. Hladina PSA nad normu může upozornit i na malý nádor a v průběhu léčby a po ní je vodítkem úspěšnosti terapie.

3.6.5. Terapie

3.6.5.1. Léčba nádoru omezeného na prostatu

V úvahu přichází buď chirurgické odstranění prostaty (prostatektomie) nebo léčba zářením (aktinoterapie).

- Radikální prostatektomie - radikální retropubická prostatektomie
- radikální transperineální prostatektomie
- Aktinoterapie (radioterapie) – využívá se toho, že nádorové buňky jsou na ozáření citlivější než zdravé buňky

3.6.5.2. Léčba pokročilého karcinomu prostaty

Jak bylo již zmíněno, vývoj buněk prostaty, a to jak zdravých tak nádorových je závislý na mužském pohlavním hormonu testosteronu. Potřebují ho jak nádorové buňky, rostoucí přímo v prostatě, tak v metastázách, v druhotných ložiscích mimo prostatu (mízních uzlinách, plicích, kostech). Snížení hladiny testosteronu v krvi nebo blokáce jeho účinku může zastavit nebo zpomalit růst nádoru. Na tom jsou založeny léčebné postupy u pokročilé rakoviny prostaty.

- Odstranění varlat (orchiektomie) - dosáhne se téměř naprostého zastavení produkce testosteronu
- Hormonální léčba - léčba pomocí estrogenů (ženských pohlavních hormonů) nebo látek blokujících působení testosteronu, tzv. antiandrogenů
- Léčba depotními analogy gonadotropin releasing hormonu (GnRH) - působí zástavu tvorby testosteronu ve varlatech

3.7. PSA a detekce karcinomu prostaty

3.7.1. Celková hladina PSA

Proběhla řada studií, které se zabývaly zjištěním celkové specifity a senzitivity PSA při hodnotách nad 4 ng/ml (Gann a spol., Catalona a spol.)

Výsledky těchto studií se spolu však ne úplně shodují. Částečně se na tom může podílet jak věková diference vyšetřovaných osob, tak i to, zda je tumor lokalizovaný, či ne.

Na základě dalších studií, které kombinovaly vyšetření PSA s vyšetřením per rektum (DRE), byl zvýšen záchyt lokalizovaného onemocnění skoro až na 80 %.

Americká urologická společnost a Americká společnost pro rakovinu doporučují roční stanovení hladin PSA u všech mužů nad 50 let věku. Afroameričané a muži, jejichž příbuzní první linie již onemocněli karcinomem prostaty, by měli být vyšetřováni již od věku 45 let.

Díky vyšetření PSA je detekováno signifikantně více tumorů, které by nebyly zachyceny při samotném vyšetření per rektum a více tumorů je také zachyceno v časných stádiích. Snahy o zlepšení senzitivity a specifity vyústily v hodnocení hladin PSA v různých souvislostech. Radíme sem věkově specifický PSA, poměr volného a celkového PSA (f/t PSA), PSA denzitu (PSAD) a PSA velocitu (PSAV) (15).

3.7.2. Volné PSA

Samotné vyšetření volného PSA nemá příliš vysoký diagnostický význam. Využívá se především k určení f/t PSA (viz. níže).

3.7.3. Poměr volný/celkový PSA (f/t PSA)

Pravděpodobnost vzniku karcinomu prostaty stoupá se zvyšujícím se podílem frakce PSA vázané na alfa-1-antichymotrypsin ku celkové hodnotě PSA. Měření volné frakce PSA je výhodné k odlišení mezi karcinomem prostaty a BPH při nízkých a středně zvýšených hodnotách PSA. Při zmíněném postupu se předpokládá zvýšení specificity tohoto testu. Catalona a spol. zjišťovali procento volné frakce PSA při hodnotách celkového PSA mezi 4,1 až 10,0 ng/ml (16). Podobnou studii provedl i Cohen a spol. (35). Oba se shodli na tom, že muži s karcinomem prostaty s normální nebo jen mírně zvětšenou prostatou mají nižší procento volného PSA než pacienti s BPH.

Pomocí těchto studií bylo stanoveno, že za fyziologické se považuje více než 25 % volného PSA při hladině celkového PSA mezi 4 až 10 ng/ml. Při těchto hodnotách je dosahováno 95% senzitivity, zatímco se vyhneme 20 % zbytečných biopsií u pacientů bez karcinomu prostaty (17). Partin a spol. stanovili horní hranici normálního procenta volného PSA na 20 % za předpokladu celkového PSA mezi 4 až 10 ng/ml, což mělo za následek ušetření 29 % pacientů zbytečné punkce. Tyto výsledky naznačují, že specificita detekce karcinomu prostaty může být zlepšena pomocí stanovení procenta volného PSA u pacientů s celkovou hodnotou PSA mezi 4 až 10 ng/ml.

Využití poměru f/t PSA je závislé na objemu prostaty. Hodnota poměru f/t PSA je u prostat nad 75 ccm pro detekci karcinomu bezcenná (18).

3.7.4. Věkově specifické PSA

Fyziologické hodnoty PSA jsou 0,0 – 4,0 ng/ml. V roce 1993 Oesterling a spol. poukázali na to, že hodnoty PSA se mění v závislosti na věku (19).

Morgan a spol. též poukázal na skutečnost, že sérové koncentrace PSA pozitivně korelují s věkem nemocných. Navíc upozornil i na skutečnost, že na odlišné hranici fyziologických hodnot PSA mají též vliv různé rasy lidské populace (20).

Vztah věku a hladiny PSA stále není zcela objasněn a využití věkově specifického PSA v klinické praxi zůstává sporné.

3.7.5. PSA densita (PSAD)

Babaian jako první poukázal v roce 1990 na význam sérové hladiny PSA ve vztahu k objemu prostaty a zavedl termín PSA densita (21). PSA densita je poměrem hodnoty celkového PSA (ng/ml) a objemu prostaty (cm³). Pro nepříliš vysokou senzitivitu PSAD, která je způsobena velkou variabilitou ve výsledcích sonograficky měřeného objemu prostaty (22) se zřejmě nejvíce jako vhodný diagnostický test pro zvýšení detekce Ca prostaty.

3.7.6. PSA densita přechodné zóny (PSA-TZ)

I zde jsou obdobné problémy s vysokou variabilitou při sonografických měřeních přechodné zóny. Od toho se odvíjí poměrně nízká senzitivita tohoto a parametru a tedy zároveň i jeho použitelnost.

3.7.7. PSA velocita (PSAV)

PSA velocita vyjadřuje vzestup hladiny PSA v určitém časovém období. $PSAV = 1/2 \times ((PSA2 - PSA1) / t1) + 1/2 \times ((PSA3 - PSA2) / t2)$, kde PSA1 je hodnota sérové hladiny PSA z prvního stanovení, PSA2 sérová hladina z druhého stanovení, PSA3 je hodnota ze třetího stanovení, t1 je čas mezi prvním a druhým stanovením PSA v letech a t2 je čas mezi druhým a třetím stanovením.

Rychlost vzestupu PSA závisí na agresivitě tumoru. U zdravých jedinců je 0,04 ng/ml/rok, u pacientů s BPH je 0,07-0,27 ng/ml/rok a u pacientů s KP je 0,75 ng/ml/rok a vyšší (72 % senzitivita, 95 % specificita) (23).

Podle Cartera pouze u 5 % mužů s hodnotou PSAV vyšší než 0,75 ng/ml/rok nebyl zachycen KP a 70 % mužů s diagnostikovaným KP mělo hodnotu PSAV vyšší než 0,75 ng/ml/rok (24).

Hlavní využití PSA velocity tedy především spočívá v možnosti detekce karcinomu prostaty při hladině PSA menší než 4,0 ng/ml, ve zlepšení indikačních kritérií pro opakované biopsie prostaty při PSA vyšším než 4 ng/ml a rovněž k monitoringu výsledků radikální léčby KP.

3.7.8. Zdvojovací čas PSA

PSA doubling time (PSADT) je doba, během které dojde ke zdvojnásobení sérové koncentrace PSA.

Nádorové buňky se při recidivě karcinomu prostaty po RAPE množí exponenciálně (25). Z toho plyne lineární závislost logaritmu PSA na čase. PSADT vypočteme tak, že dělíme přirozený logaritmus 2 (0,693) směrnicí přímky získané z grafu lineární závislosti logaritmu PSA na čase. Při znalosti dvou měření koncentrace PSA vypočteme PSADT ze vzorce: $PSADT = t \times \ln 2 / \ln (PSA_2/PSA_1)$. T znamená čas mezi oběma vyšetřeními, PSA1 a PSA2 znamenají hodnoty koncentrace PSA při prvním, respektive druhém vyšetření. PSADT bylo použito ve studiích, které se snažily odlišit lokální recidivu po RAPE od generalizace. Trapasso a spol. uvádí, že zatímco při metastatickém postižení pacientů po RAPE byla průměrná hodnota PSADT 4,3 měsíce, při lokální recidivě se tato hodnota pohybovala okolo 11,7 měsíců (26).

Na základě těchto studií (Trapasso a spol.26, Pound a spol.27) byla navržena pro PSADT hraniční hodnota pro rozlišení mezi lokální recidivou a generalizací 10 měsíců.

3.8. Metody stanovení PSA

3.8.1. Imunoradiometrická analýza (IRMA)

Je to nekompetitivní (nesoutěživá) imunochemická metoda, kde stanovovaná látka (například antigen - Ag) reaguje s nadbytkem vazebného činidla označeného radioindikátorem (specifická protilátka - Ab^{*})(28).

Průběh reakce lze zjednodušeně popsat:



Ke kvantifikaci slouží označená protilátka navázaná na antigen [Ag-Ab^{*}]. Množství tohoto komplexu je úměrné množství stanoveného antigenu, tedy se vzrůstající koncentrací stanovované látky vzrůstá také odezva (pokud je měřena vázaná frakce indikátoru), tj. radioaktivita vytvořeného komplexu.

V praxi se více využívá tzv. „two-site“ IRMA, také označovaná jako sendvičová IRMA. Do reakce se stanovovaným antigenem vstupují v nadbytku dvě specifické protilátky. Jedna neznačená "vychytávací" ("capture antibody"), většinou zakotvená na stěnu reakční zkumavky, nebo na jinou pevnou fázi (partikule, kuličky,...) a druhá "signální", značená radioaktivní látkou (např.: ¹²⁵I, ⁵⁷Co, ³H). Každá z těchto dvou protilátek je namířena proti jiné antigenní determinantě antigenu. Zjednodušené schéma reakce pak vypadá následovně:



Pro vyhodnocení výtěžku reakce je třeba separovat vázanou frakci indikátoru, tedy komplex [Ab₁-Ag-Ab₂^{*}], od frakce volné, tj. nezreagované značené protilátky Ab₂^{*}.

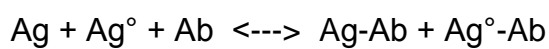
Praktické provedení IRMA metod může být realizováno jako "jednokrokové", kdy jsou obě protilátky přidávány do reakční směsi současně, nebo "dvoukrokové" (sekvenční), kdy jsou přidávány postupně. V prvním případě bývá pracovní rozsah metody (rozsah koncentrací kalibrační křivky) zásadně mezen možným vlivem tzv. "Hook efektu".

Další modifikací imunoradiometrické analýzy je nepřímá tzv. „three site“ IRMA. Používá stejného principu jako „two-site“ IRMA, avšak jako indikátor zde není použita protilátka Ab_2 , ale pro detekci je do systému přidána třetí protilátka (Ab_3^*), která je vhodně označena. Závěrečnou fázi metody lze schématicky znázornit jako:



3.8.2. Radioimunanálýza (RIA)

Jedná se o kompetitivní (soutěživou) imunochemickou reakci antigenu (stanovovaný analyt - Ag) a značeného antigenu (radioindikátor - Ag°) o vazebná místa specifické protilátky – Ab (28). Základní schéma reakce je následovné:



Omezeným množstvím protilátky je dosaženo kompetice o její vazebná místa pro antigeny. Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů antigen-protilátka a to s neznačeným a značeným antigenem, přičemž množství značeného komplexu je nepřímo úměrné původnímu množství stanovovaného antigenu (tzn., že čím je vyšší koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku, tím menší množství značeného komplexu [Ag^*-Ab] při reakci vznikne).

Praktické provedení testu vypadá tak, že k analyzovanému vzorku se přidá známé (limitované) množství antigenu značeného radioizotopem a limitované množství specifické protilátky proti stanovovanému antigenu (v tekutém stavu). Stanovuje se buď vzniklý komplex Ag^*-Ab , nebo zbylý nenavázaný značený Ag^* a to za předchozího odstranění nestanovované části z reakční směsi.

3.8.3. Fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA)

FPIA je kompetitivní homogenní metoda, při které se měření provádí v polarizovaném světle. Využívá různé rychlosti rotace malých a velkých molekul, které vedou ke změně polarizace (28).

Na antigen se naváže látka zvaná fluorofor, která excituje v polarizovaném světle a vyzařuje zelené světlo. Je-li antigen značený fluoroforem navázan na protilátku, nemůže rotovat a vyzařované světlo kmitá ve stejné rovině jako polarizované světlo. Není-li však značený antigen navázan na protilátku, může rotovat a emitované světlo bude vyzařovat v jiné rovině než světlo polarizované, tudíž dojde k zeslabení až úplné ztrátě polarizace. Nebo-li hodnota naměřené odezvy je nepřímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

3.8.4. Enzymová imunoanalýza na mikročásticích (MEIA)

MEIA je kvantitativní analytická metoda založená na principu enzymové imunoanalýzy s fluorogenním substrátem. Vazebná reagens (specifická protilátka) imobilizovaná na povrchu mikročástic. Konjugát je značený alkalickou fosfatázou, která katalyzuje hydrolýzu 4-metylumbelliferyl-fosfátu na 4-metylumbelliferon (28).

Vlastní analýza probíhá principiálně v několika krocích:

- navázání stanovovaného analytu na vazebná místa specifické protilátky zakotvené na povrchu submikronových částic
- přidání konjugátu s alkalickou fosfatázou. Ta je navázána buď na druhou specifickou protilátku proti jiné antigenní determinantě analytu, nebo přímo na analyt či jeho analog. Dojde k vytvoření "sendviče" Ab1-Ag-Ab2(E), nebo obsazení volných vazebných míst protilátky antigenem s konjugovaným enzymem Ab1-Ag(E).
- separace nenavázaného analytu nebo konjugátu se děje na speciální matrici ze skelných vláken, na které se mikročástice ireverzibilně zachytí, takže mohou být účinně promývány.

- po přidání substrátu dojde vlivem působení enzymu k přeměně 4-metylbelliferyl-fosfátu na 4-metylbelliferon, který je schopen emitovat fluorescenční záření.

Podle charakteru analytu dochází ke dvěma principiálně se lišícím imunochemickým systémům, které následně ovlivňují vztah závislosti velikosti měřené odezvy na koncentraci sledovaného analytu:

- vzniká komplex Ab1-Ag-Ab2(E), kdy se druhá protilátka s konjugovanou alkalickou fosfatázou váže na stanovovaný antigen již navázaný na imobilizované první protilátce, pak je velikost měřené odezvy proporcionální koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku,
- vzniká komplex Ab1-Ag(E), kdy se konjugát alkalické fosfatázy a analogu stanovovaného analytu váže na neobsazená vazná místa imobilizované protilátky, pak je velikost měřené odezvy nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku (čím více je analytu ve vzorku, tím méně zůstane neobsazených míst).

3.8.5. Luminoimunoanalýza (LIA)

LIA je kompetitivní metoda (princip RIA) využívající k detekci měření světelných kvant vzniklých luminiscencí reakcí indikátoru navázaného na jednu komponentu imunochemické reakce (protilátku nebo analyt).

Látky, které se používají k luminometrické detekci musí i po vazbě na antigen nebo protilátku vykazovat luminiscenční vlastnosti. Takovými látkami je např. isoluminol, estery akridinových barviv, některé diketony a další látky (28). Luminiscence je časově omezena a proto je luminiscenční reakce většinou nastartována před detektorem, přidáním některé substance chemiluminiscenční reakce nebo např. prudkým ohřevem reakční směsi. Světelná kvanta jsou detekována pomocí fotonásobiče. Výťažky chemiluminiscenčních reakcí nebývají vysoké řádu 0,1 až 1 %. Detekční limit luminiscenční reakce se pohybuje v attomolech. LIA jsou velmi citlivé metody.

3.8.6. Imunoluminometrická analýza (ILMA)

ILMA je nekompetitivní metoda, která využívá k detekci měření světelných kvant vzniklých luminiscenční reakcí indikátoru.

Tato metoda je stejná jako LIA až na to, že principiálně neodpovídá RIA, ale IRMĚ.

3.8.7. Metoda RT-PCR

Tato metoda používá reverzní transkriptázu k vytvoření kopií DNA ze všech mRNA transkriptů, následovanou PCR amplifikací tkáňově specifického genu pro PSA. Protože všechny buňky obsahují genomickou DNA pro PSA, amplifikací pouze mRNA transkriptů dochází k identifikaci buněk skutečně produkujících PSA (29).

Význam nálezu buněk exprimujících gen pro PCR v cirkulaci pomocí RT-PCR musí být tedy ještě detailně prozkoumán, poněvadž neexistuje důkaz o tom, že by jediná prostatická buňka cirkulující v krevním oběhu musela nutně být nositelem genetických změn vedoucích k vyšší invazivitě či k tvorbě vzdálených metastáz (30, 31, 32, 33, 34). Nález prostatické buňky v aspirátu z kostní dřeně či v lymfatické uzlině může být fyziologický, může se jednat o normální filtraci a eliminaci buněk v těchto kompartmentech.

4. Experimentální část

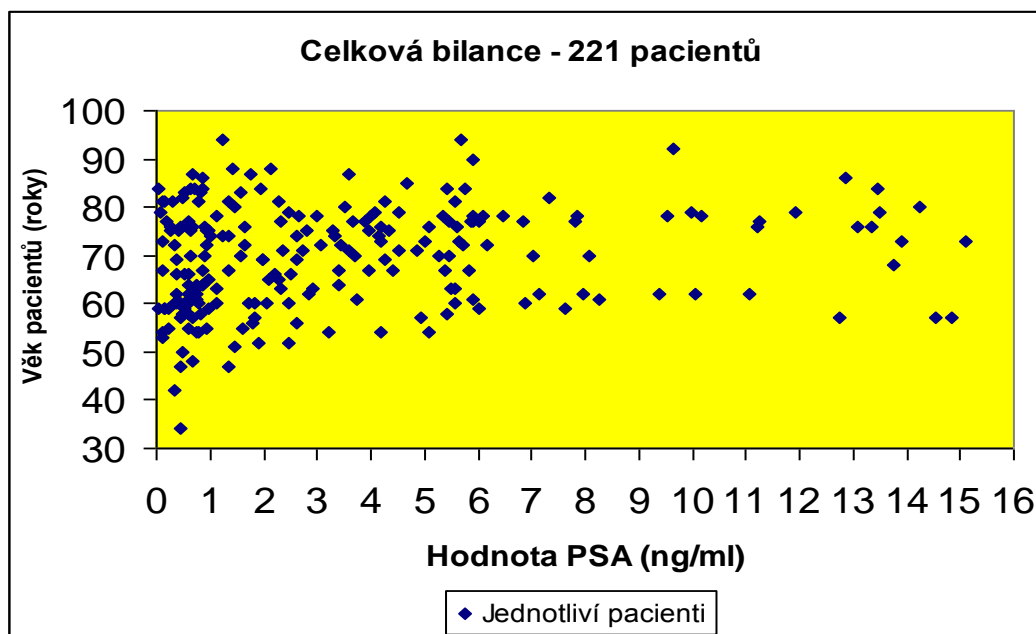
4.9. Vlastní výsledky měření

Naše laboratoř „Oddělení klinické biochemie, Městská nemocnice Hořice“ provádí měření PSA a fPSA pomocí technologie MEIA, na imunochemickém analyzátoru AIA 600 II od firmy Tosoh – Eurogenetics, Belgie.

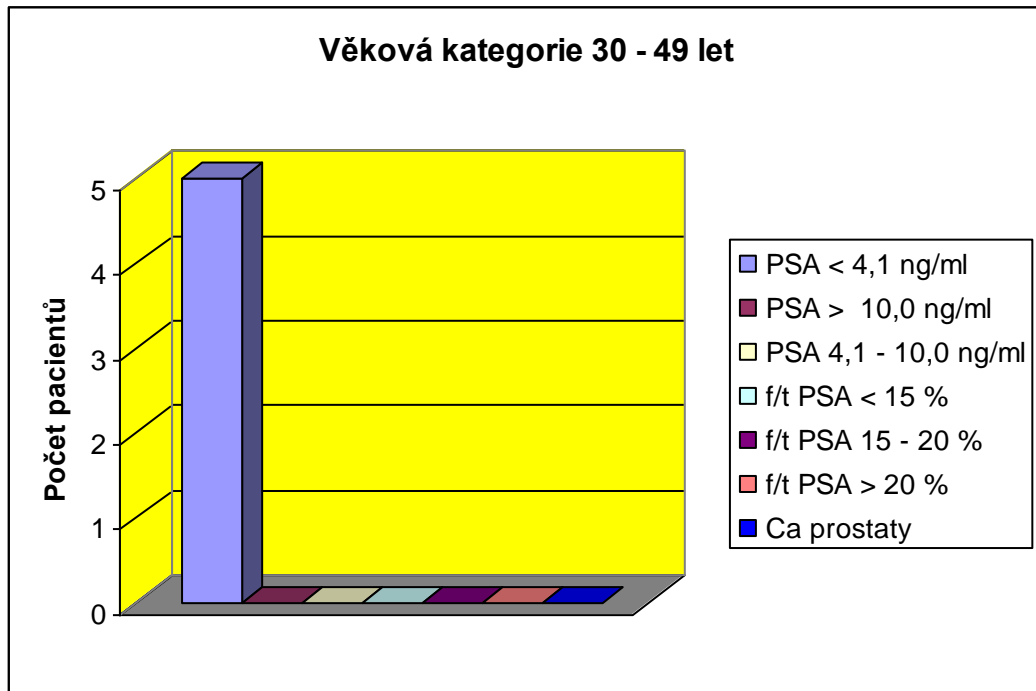
Během jednoho roku bylo sledováno a zaznamenáno 221 pacientů (obr. 5). Jejich výsledky jsou zpracovány v následujících grafech (obr. 6, 7, 8, 9, 10), kde jsou pacienti rozděleni dle věkových kategorií a jsou sledovány následující parametry:

- PSA < 4,1 ng/ml
- PSA > 10,0 ng/ml
- PSA 4,1 – 10,0 ng/ml
- f/t PSA < 15 %
- f/t PSA 15 – 20 %
- f/t PSA > 20 %
- Ca prostaty

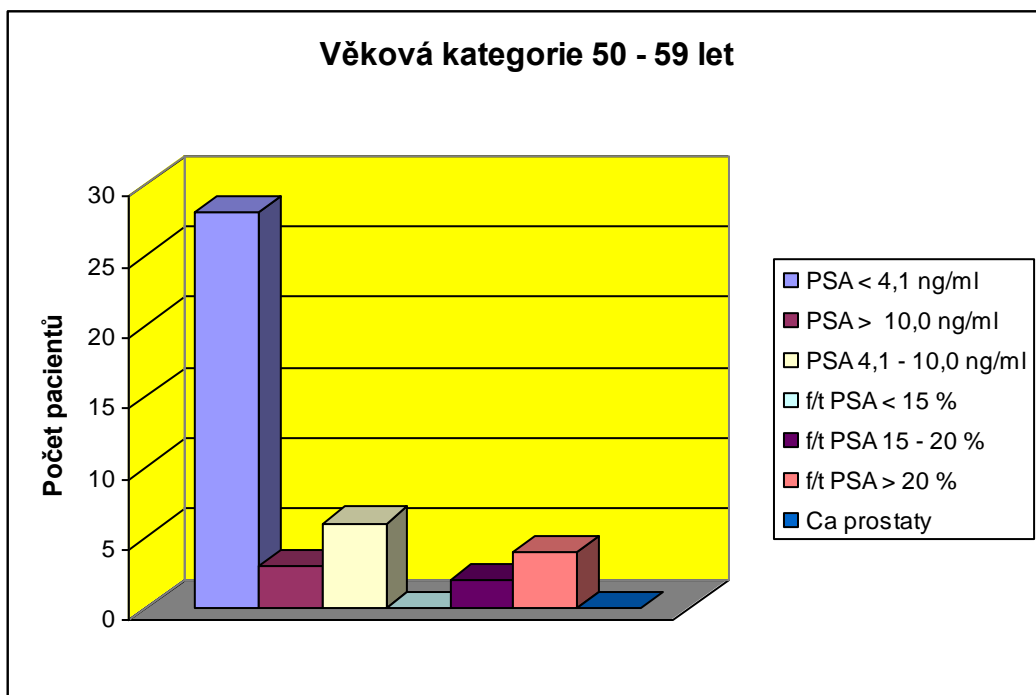
(f/t PSA je měřeno pouze u hodnot celkového PSA mezi 4,1 – 10,0 ng/ml)



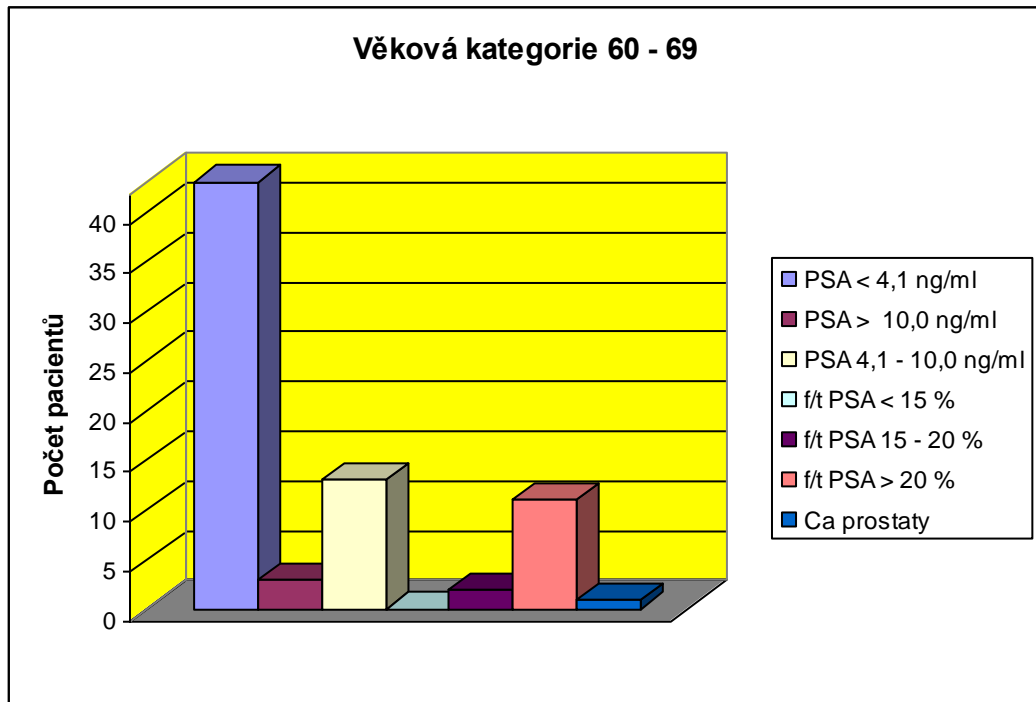
Obrázek 5: graf - celková bilance – 221 pacientů



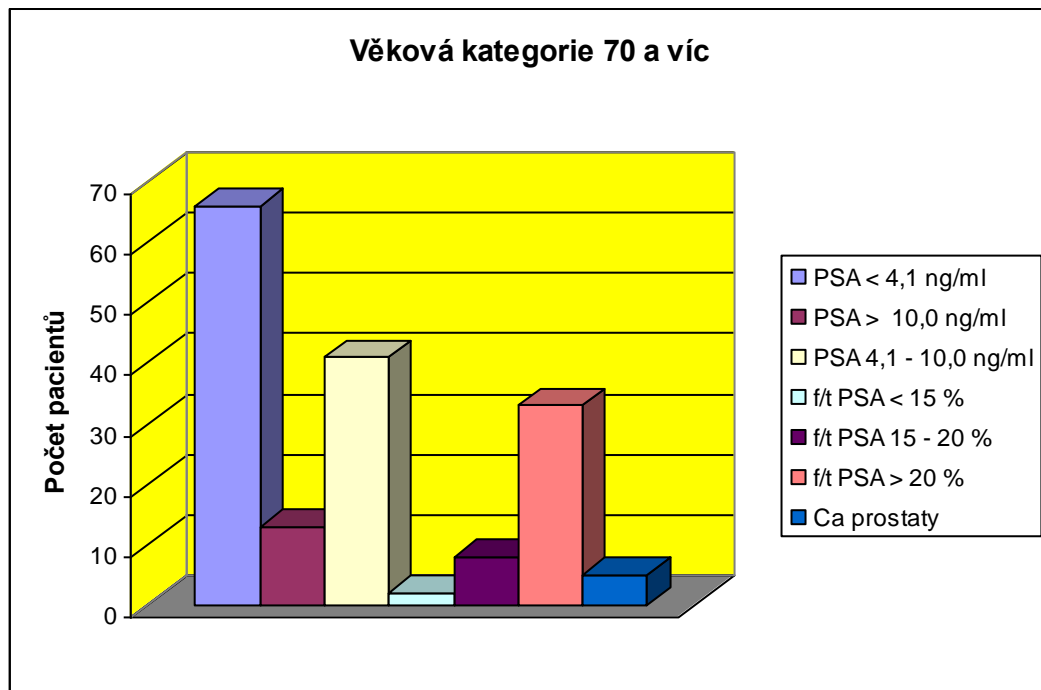
Obrázek 6: graf - věková kategorie 30 – 49 let



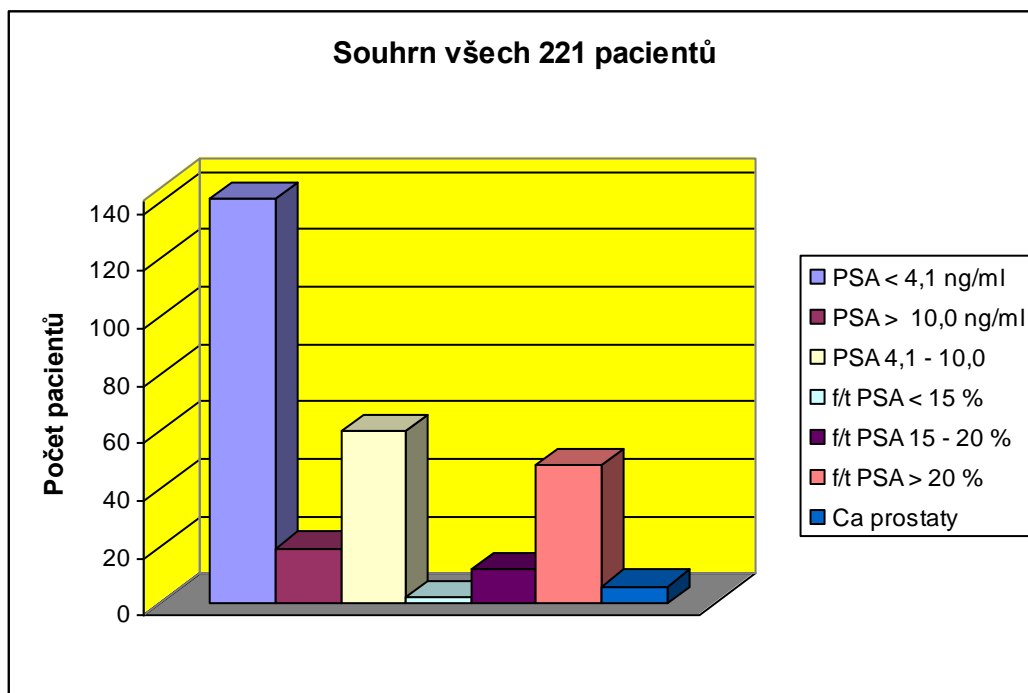
Obrázek 7: graf - věková kategorie 50 – 59 let



Obrázek 8: graf - věková kategorie 60 – 69 let



Obrázek 9: graf - věková kategorie 70 a víc let



Obrázek 10: graf - souhrn všech 221 pacientů

5. Diskuse

Cílem experimentální části této bakalářské práce, bylo především ověřit závislost cut-off hodnot PSA vůči věku pacienta, a zároveň ověření diagnostického významu této věkové závislosti.

V průběhu roku 2006 bylo celkem v naší laboratoři vyšetřeno 221 pacientů (obr. 5) na celkový PSA a na jeho volnou frakci fPSA. Tato data byla statisticky zpracována a vyhodnocena dle jednotlivých věkových skupin: 30-49 let, 50-59 let, 60-69 let, 70 a více let (obr. 6, 7, 8, 9). Za hraniční hodnotu cut-off byla vzata hodnota PSA 4,1 ng/ml, což je hodnota běžně uváděna v odborných publikacích. U všech pacientů, kterým se hodnoty pohybovaly v rozmezí 4,1 – 10,00 ng/ml se též sledovala hodnota fPSA (tzv. šedá zóna). Zároveň byla sledována u celého souboru pacientů potvrzená diagnóza Ca prostaty.

Z výsledků jednotlivých měření provedených v jednotlivých věkových skupinách vyplývají dvě skutečnosti. Ta první, potvrzuje, že hodnota PSA skutečně závisí na věku. To znamená, že se vzrůstajícím věkem pacienta, stoupá i fyziologická hodnota PSA. Druhá skutečnost je využití různých cut-off dle věku (věkově specifické PSA), což je dle mého úsudku, velice sporné. V nižších věkových skupinách (30-59 let) by totiž došlo k příliš vysokému nárůstu tzv. pozitivních pacientů (obr. 6), přičemž Ca prostaty, by nebylo takřka u nikoho z této skupiny pacientů prokázáno.

Daleko příznivější se mi jeví ponechat hodnoty cut-off na 4,1 ng/ml pro všechny věkové kategorie a u těch pacientů, kde hodnota PSA překročí výše zmíněnou hranici cut-off, provést vyšetření fPSA. Tímto se rapidně sníží počet pacientů u kterých lze oprávněně očekávat Ca prostaty, jak je patrné z výsledků provedené studie na 221 pacientech, provedené v naší laboratoři v průběhu roku 2006 (obr. 10).

6. Závěr z vlastního měření

Naše výsledky jednotlivých měření potvrdily ve shodě s literaturou závislost hodnot prostatického antigenu na věku pacienta. Což znamená, že se vzrůstajícím věkem roste i hodnota PSA. Dále lze tvrdit, že samotné vyšetření PSA, jakožto nádorového markeru k odhalení karcinomu prostaty není dostačující a vedlo by k příliš vysokému počtu falešně pozitivní diagnostiky karcinomu prostaty. Jako vhodné se jeví řešení doplnění tohoto markeru o stanovení f/t PSA, které výrazně eliminuje výše zmíněné pozitivní výsledky. To je příjemné zejména pro pacienty, neboť je výrazně ušetří invazivnímu odběru podezřelé tkáně pomocí biopsie.

7. Souhrn

Tato práce podává ucelenou informaci o prastatickém specifickém antigenu a o jeho klinickém využití. Je zde popsána chemická a fyzikální charakteristika PSA, jeho distribuce a způsob vylučování v organizmu.

Dále je zde pojednáváno o nádorových markerech a o využití PSA jakožto nádorového markeru.

Nemalá část je věnována popisu funkce a stavby předstojné žlázy, včetně její patofyziologie. Z nemocí prostaty je uvedena benigní hyperplazie prostaty a zvláštní důraz je kladen na karcinom prostaty. Popisuje se vždy epidemiologie, diagnostika, laboratorní vyšetření a terapie nemoci. U karcinomu prostaty je podrobně rozveden význam stanovení PSA ve vztahu k diagnostice tohoto onemocnění.

Jsou tu taktéž popsány jednotlivé metody stanovení PSA a je zde představena i vlastní studie, která proběhla v roce 2006 a obsahovala soubor 221 pacientů. Studie je zaměřena na ověření závislosti mezi hodnotami PSA a věkem pacienta, s následným zhodnocení významu této závislosti při diagnostice karcinomu prostaty.

8. Seznam zkratk

PSA	prostatický specifický antigen
PSA-ACT	α 1-antichymotripsin
PSA-AT	α 1-antitrypsin
GnRH	gonadotropin releasing hormonu
hK1	kallikrein
fPSA	volný prostatický specifický antigen
PSA-AMG	α 2-makroglobulin
PSA-PCI	protein-C inhibitor
PSA-IT	inter- α -trypsin
BHP	benigní hyperplazie
TPSA	celkového PSA
Ca	karcinom
SN	senzitivita
SP	specifita
BV +	pozitivní prediktivní hodnota
BV –	negativní prediktivní hodnota
WHO	World Health Organisation (Světová zdravotnická organizace)
PZ	periferní zóna
CZ	centrální (vnitřní) zóna
TZ	tranzitorní (přechodná) zóna
BOO	bladder outlet obstructi- on
LUTS	lower urinary tract symptoms
TRUS	transrektální ultrasonografie
DRE	vyšetřením per rektum
f/t PSA	poměr volný/celkový PSA
PSAD	PSA densita
PSA-TZ	PSA densita přechodné zóny
PSAV	PSA velocita
PSADT	PSA doubling time (zdvojovací čas)
RAPE	recidiva karcinomu prostaty

IRMA	imunoradiometrická analýza
RIA	radioimuanalýza
FPIA	fluorescenční polarizační imunoanalýza
MEIA	enzymová imunoanalýza na mikročasticích
LIA	luminoimunoanalýza
ILMA	imunoluminometrická analýza
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
Ag	antigen
Ab	protilátka

9. Seznam obrázků

1. nákres prostaty
2. detail prostaty a semenných váčků
3. zhoubné nádory prostaty – Incidence v České republice (2003)
4. zhoubné nádory prostaty – Incidence a mortalita v České republice (2003)
5. graf - celková bilance – 221 pacientů
6. graf - věková kategorie 30 – 49 let
7. graf - věková kategorie 50 – 59 let
8. graf - věková kategorie 60 – 69 let
9. graf - věková kategorie 70 a víc let
10. graf - souhrn všech 221 pacientů

10. Literatura

1. Ablin, R. J., Soanes, W. A., Bronson, P., Witebsky, E.: Precipitating antigens of the normal human prostate. *J. Reprod. Fertil.*, 22, 1970, 573-574.
2. Ablin, R. J., Bronson, P., Soanes, W. A., Witebsky, E.: Tissue- and species- specific antigens of normal human prostatic tissue. *J. Immunol.*, 104, 1970, 1329-1339.
3. Hara, M., Inorre, T., Fukuyama, T.: Some physico-chemical characteristics of gamma-seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma. *Jap. J. Legal. Med.*, 25, 1971, 322-324.
4. Wang, M. C., Valenzuela, L. A., Murphy, G. P., Chu, T. M.: Purification of a human prostate specific antigen. *Invest. Urol.*, 17, 1979, 159-163.
5. Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U. et al.: Prostate-specific antigen in human Serum occurs predominantly in complex with 1-antichymotrypsin. *Clin. Chem.*, 37, 1991, 1618-1625.
6. Vessella, R. L., Lange, P. H.: Issues in the assessment of prostate-specific antigen immunoassays. An update. *Urol. Clin. North. Am.*, 24, 1997, 261-8.
7. Oesterling, J. E., Chan, D. W., Epstein, J. I. et al.: Prostate specific antigen in the preoperative and postoperative evaluation of localized prostatic cancer treated with radical prostatectomy. *J. Urol.*, 139, 1988, 766-772.
8. Semjonow, A., Hamm, M., Rathert, P.: Halflife of prostate-specific antigen after radical prostatectomy. *Eur. Urol.*, 21, 1992, 200-205.
9. Oesterling, J. E.: Age-specific reference ranges for serum PSA. In: *Advances in Urology. Prostate Controversies: Diagnosis and Management.* Detroit, 1996.
10. *Imunotech: Nádorové markery a jejich stanovení.* 1999
11. Pacík D.: Benigní prostatická hyperplazie. *Postgraduální medicína*, 2007, 7, 5: 546-548
12. Pleš M., Zámečník L., Soukup V., Dvořáček J.: Prostatický specifický antigen a odvozené parametry. *Urologie pro praxi*, 2004, 2: 59-63
13. Mačák J., Mačáková J.: *Patologie*, 2004: 123

14. Kowaciuk I., Matoušková M.: Karcinom prostaty – diagnostika a možnosti léčby. *Practicus*: 286-288
15. Klečka J., Hora M.: Časná diagnostika karcinomu prostaty. *Biomarkers and Environment Supplement* 1, 2004: 57-57
16. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. *JAMA*, 1995; 274: 1214–1220.
17. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease. *JAMA*. 1998; 279: 1542–1547.
18. Šafařík L, Novák K, Stolz J, Novák J, Dvořáček J. Detekce karcinomu prostaty transrektální biopsií: porovnání senzitivity při odběru 8 a 10 vzorků a při opakované biopsii pro předchozí negativní výsledek. *Čes. Urol.*, IV, 2000; 3: 24–24. In: *Česká urologie*. IV, 2000; 3: 24–24. 12. Kongres České urologické společnosti ČLS JEP a Slovenské urologické společnosti. ČR, Liberec 2000.
19. Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, et al. Serum prostatespecific antigen in a community-based population of healthy men. *JAMA*, 1993; 270: 860–864.
20. Morgan, T. O., Jacobsen, S. J., McCarthy, W. F. et al.: Age-specific reference ranges for serum prostate-specific in black men. *N. Engl. J. Med.*, 335, 1996, 304-310.
21. Babaian, R. J., Fritsche, H. A., Evans, R. B.: Prostate specific antigen and prostate gland volume: correlation and clinical application. *J. Clin. Lab. Anal.*, 4, 1990, 135-137.
22. Bates, T. S., Reyard, J. M., Peters, T. J., Gingell, J.C.: Determination of prostate volume with transrectal ultrasound: A study of intraobserver and interobserver variations. *J. Urol.*, 155, 1996, 1299-1300.
23. Carter, H. B., Pearson, J. D., Metter, J. et al.: Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate diseases. *JAMA*, 267, 1992, 2215-2220.

24. Carter, H. B., Pearson, J. D.: Prostate-specific antigen velocity and repeated measures of prostate-specific antigen. *Urol. Clin. North. Am.*, 24, 1997, 333-338.
25. Patel A, Dorey F, Franklin J: Recurrence patterns after radical retropubic prostatectomy: clinical usefulness of prostate specific antigen doubling time and log slope prostate specific antigen. *J Urol.*, 1997; 158: 1441–1445.
26. Trapasso JG, DeKernion JB, Smith RB. The incidence and significance of detectable levels of serum prostate specific antigen after radical prostatectomy. *J Urol*, 1994; 152: 1821–1825.
27. Pound CR, Partin AW, Eisenberg MA. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*, 1999; 281: 1591–1597.
28. Doležalová V. a spol.: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii. 1995: 215-240
29. Olsson CA, de Vries GM, Buttyan R, Katz AE. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays for prostate cancer. *Urol Clin North Am*, 1997; 24: 367–378.
30. Gao CL, Dean RC, Pinto A, et al. Detection of circulating prostate specific antigen expressing prostatic cells in the bone marrow of radical prostatectomy patients by sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Urol*, 1999; 161: 1070–1076.
31. Gao CL, Maheshwar S, Dean RC, et al. Blinded evaluation of reverse transcriptase-polymerase chain reaction prostate specific antigen peripheral blood assay for molecular staging of prostate cancer. *Urology*, 1999; 53: 714–721.
32. Gomella LG, Raj GV, Moreno JG. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen in the management of prostate cancer. *J Urol*, 1997; 158: 326–37.
33. Ignatoff JM, Oefelein MG, Watkin W, et al. Prostate specific antigen reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in preoperative staging of prostate cancer. *J Urol*, 1997; 158: 1870–1875.

34. Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ, et al. Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology*, 1994; 43: 765–775.
35. Cohen YT, Luderer AA, Thiel RP, et al. Using proportions of free to total prostatespecific antigen, age, and total prostate-specific antigen to predict the probability of prostate cancer. *Urology*, 1996; 47: 518–524.