Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Experimentální chirurgie

MUDr. Jakub Řezáč, FEBU

NOVÉ BIOMARKERY JAKO PARAMETRY PRO PREDIKCI SIGNIFIKANTNÍHO KARCINOMU PROSTATY V BIOPSII A RECIDIVY ONEMOCNĚNÍ PO RADIKÁLNÍ LÉČBĚ

Novel biomarkers as parameters for prediction of significant prostate cancer in biopsy and disease relapse after radical treatment

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Otakar Čapoun, Ph.D., FEBU

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně pod vedením doc. MUDr. Otakara Čapouna, Ph.D., FEBU, uvedl všechny použité literární a odborné zdroje a dodržoval zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 27.2.2024

MUDr. Jakub Řezáč, FEBU

……

Poděkování

Děkuji doc. MUDr. Štěpánovi Veselému, Ph.D. a doc. MUDr. Otakarovi Čapounovi, Ph.D., FEBU za dosavadní vedení v mém postgraduálním vzdělávání a možnost zaměřit se speciálně na problematiku onkourologie a karcinomu prostaty. Děkuji také za poskytnutí cenných rad a připomínek při přípravě této práce. Vřele děkuji rovněž Ing. Lence Hanouskové, Ph.D., se kterou jsem celý projekt zpracoval.

Dále poděkování patří prof. MUDr. Viktorovi Soukupovi, Ph.D., FEBU, MHA a MUDr. Liborovi Zámečníkovi, Ph.D., FEBU, FECSM, MBA, za podporu v mé činnosti a odbornou záštitu mých vlastních projektů.

V neposlední řadě děkuji mé partnerce MUDr. Kristýně Dolečkové a mamince MUDr. Jitce Řezáčové za podporu a trpělivost.

Nové biomarkery jako parametry pro predikci signifikantního karcinomu prostaty v biopsii a recidivy onemocnění po radikální léčbě

Abstrakt

Karcinom prostaty je jedním z nejčastěji diagnostikovaných onkologických onemocnění. Onkomarkery, v čele s prostatickým specifickým antigenem (PSA), výrazně zpřesnily diagnostiku i sledování pacientů s tímto onemocněním. Ani PSA však není ideální molekulou a jeho omezení otevírají dveře dalšímu výzkumu a snaze o objevení onkomarkeru s vyšší specificitou a senzitivitou k signifikantnímu karcinomu prostaty. Cílem této práce je podat přehled aktuálně využívaných i budoucích onkomarkerů a dále také prezentace našich dat z několik let trvajícího základního výzkumu v této oblasti. Jedná se o výsledky imunochemických analýz annexinu, SPINK-1, TIMP, chromograninu A, endoglinu, mindinu a především rozsáhlé analýzy thymidinkinázy 1.

Klíčová slova

karcinom prostaty, biomarkery, nádorové markery, thymidinkináza 1, mindin, TK210, annexin, SPINK-1, TIMP, chromograninu A, endoglin

Novel biomarkers as parameters for prediction of significant prostate cancer in biopsy and disease relapse after radical treatment

Abstract

Prostate cancer is one of the most diagnosed oncological diseases. Oncomarkers, especially prostate specific antigen (PSA), have significantly improved the diagnosis and monitoring of patients with this disease. However, PSA is not an ideal molecule, and its limitations open the door to further research and efforts to discover an oncomarker with higher specificity and sensitivity to significant prostate cancer. The aim of this paper is to give an overview of currently used and future oncomarkers and to present our data from several years of basic research in this field. Specifically, the results of immunochemical analyses of annexin, SPINK-1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin and especially the extensive analysis of thymidine kinase 1.

Keywords

Prostate cancer, biomarkers, tumor markers, thymidinkinase 1, mindin, TK210, annexin, SPINK-1, TIMP, chromogranin A, endoglin

Obsah

1. ÚVOD 8

2. NÁDOROVÉ MARKERY KARCINOMU PROSTATY 10

2.1 ONKOMARKERY V OBECNÝCH DOPORUČENÍCH 10
2.2 DĚLENÍ ONKOMARKERŮ 12
2.3 JEDNOTLIVÉ MARKERY 13
2.3.1 PSA 13
2.3.2 PHI 15
2.3.3 4K skóre 15
2.3.4 miRNA 16
2.3.5 PCA3 17
2.3.6 TMPRSS2: ERG, Mi Prostate score (MiPS) 19
2.3.7 Exosomální biomarkery 20
2.3.8 ExoDx 21
2.3.9 Cirkulující nádorové buňky 22
2.3.10 SelectMDx 24
2.3.11 ConfirmMDx 24
2.3.12 Oncotype Dx (GPS test) 25
2.3.13 Decipher 25
2.3.14 ProMark 25
2.3.15 Prolaris 26
2.3.16 Prostate Core Mitomic Test (PCMT) 26
2.3.17 Prostarix Risk Score 27
2.3.18 Detekce buněk KP v moči 27

3. IMUNOCHEMICKÉ METODY 28

3.1 ANTIGENY A PROTILÁTKY 28
3.2 DĚLENÍ IMUNOCHEMICKÝCH METOD 29
3.3 IZOTOPOVÉ METODY 30
3.4 NEIZOTOPOVÉ METODY 31
3.5 ELISA 31
3.5.1 Přímá ELISA 32
3.5.2 Nepřímá ELISA 32
3.5.3 Kompetitivní ELISA 33
3.5.4 Sendvičová ELISA 33

4. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY 35

5. METODIKA 37

5.1 CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ A ODBĚRU VZORKŮ 37
5.2 VÝBĚR ONKOMARKERŮ A CHARAKTERISTIKA METOD 38
5.2.1 Studie 1: Stanovení annexinu, SPINK–1, TIMP, chromograninu A, endoglinu a TK1 38
5.2.2 Studie 2: Stanovení mindinu 42
5.2.3 Studie 3: Stanovení thymidinkinázy 1 (TK1) – rozšířená studie 42
5.2.4 Studie 4: Stanovení epitopu TK210 u thymidinkinázy 1 (TK1) 42
5.3 STATISTICKÉ METODY 44

6. VÝSLEDKY 45

6.1 STUDIE 1 – STANOVENÍ ANNEXINU, SPINK–1, TIMP, CHROMOGRANINU A, ENDOGLINU A TK1 45
6.2 STUDIE 2 – STANOVENÍ MINDINU 46
6.3 STUDIE 3 – STANOVENÍ TK1 – ROZŠÍŘENÁ STUDIE 48
6.4 STUDIE 4 – STANOVENÍ EPITOPU TK210 53

7. DISKUSE 55

8. ZÁVĚR 59

9. SOUHRN 60

10. SUMMARY 61
11. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA 62
12. SEZNAM PŘEDNÁŠEK AUTORA 64
13. SEZNAM ZKRATEK 66
14. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 69
15. SEZNAM PŘÍLOH 85

1. Úvod

Karcinom prostaty (KP) je jedním z nejčastěji diagnostikovaných maligních onemocnění. Aktuálně představuje přibližně 15 % všech diagnostikovaných tumorů a jeho incidence nadále vzrůstá.[1] I přes výrazné pokroky v léčbě zůstává v Evropě třetí nejčastější příčinou úmrtnosti na nádorové onemocnění u mužů.[2] Ve Spojených státech se dokonce v incidenci řadí u mužů na první místo mezi všemi onkologickými onemocněními s téměř 180 tisíci novými případy ročně a úmrtností 32 tisíc ročně.[3] Když toto onemocnění v roce 1853 poprvé popsal londýnský chirurg J. Adams, považoval ho za extrémně vzácné.[4] V současné době se stává vzhledem ke zlepšující se diagnostice a lékařské péči vůbec nejčastěji diagnostikovanou malignitou.

Základem diagnostiky KP je vyšetření per rektum (digital rectal exam – DRE). I přesto, že se většina KP vyskytuje v periferní zóně prostaty, vede toto vyšetření samotné k diagnóze pouze přibližně v 18 % případů.[5] Zlom v diagnostice představoval rok 1970 a objevení glykoproteinového enzymu prostatického specifického antigenu (PSA). Jeho zavedení do praxe znamenalo revoluci v detekci, léčbě i sledování pacientů s KP.[6] Definitivní diagnóza se odvíjí od histopatologického výsledku biopsie prostaty (BP).

Zavedení PSA mezi screeningová vyšetření vedlo k významnému vzestupu záchytu KP v časných stadiích a prodloužení celkového přežití pacientů. Samotné PSA má však jako onkomarker řadu úskalí. Jedná se o orgán specifický marker, není však tumor specifický, a proto může být zvýšen i u benigní hyperplazie prostaty (BHP), prostatitidy a dalších nezhoubných onemocnění. I tak dokáže PSA samo o sobě lépe předpovědět záchyt KP v BP než DRE či transrektální ultrasonografie (TRUS).[7]

Dalším problémem využití PSA v široké praxi je častý nález indolentního, tj. nerizikového, onemocnění.[8] Předpokládá se, že v současné době diagnostikujeme 23–42 % případů KP předčasně. Mnohdy dokonce i zcela zbytečně u pacientů, kterým by neléčený KP ani nezkrátil život, ani nezhoršil jeho kvalitu. Recentně tak vznikl nový epidemiologický termín tzv. nadbytečná diagnóza (overdiagnosis). Ta může pak vést k tzv. nadbytečné léčbě (overtreatment) – léčbě i u pacientů, které by jejich nesignifikantní KP nijak neohrozil, a naopak by profitovali z prostého sledování bez nežádoucích účinků, ať již pooperačních, poradiačních, či socio–ekonomických.

Vzhledem k heterogenitě KP od indolentního onemocnění až po agresivní metastazující formy vzniká prostor pro nový onkomarker, který by pomohl lépe odlišit nízkorizikové pacienty profitující ze sledování od pacientů vyžadujících radikální léčbu. Takový onkomarker by měl odhalovat KP s vyšší sensitivitou i specificitou, predikovat agresivitu onemocnění a v neposlední řadě by měl být levný a laboratorně snadno proveditelný. Vzhledem k četnosti KP probíhá v posledních desetiletích nepřeberné množství studií hledajících tento „ideální“ onkomarker.

V rámci diagnostiky KP nelze opomenout ani použití prediktivních nomogramů a rozvoj zobrazovacích diagnostických metod jako například TRUS, magnetické rezonance, či PSMA (prostatický specifický membránový antigen) PET/CT, to však již přesahuje rozsah této práce.[9, 10, 11, 12]

Předkládaná disertační práce je zaměřena na nové potenciální markery KP a na využití imunoanalytických metod, konkrétně sendvičového enzymově vázaného imunosorbentního testu (enzyme–linked immuno sorbent assay – ELISA). Ačkoli je dnes známa asi stovka potenciálních sérových a močových markerů KP, žádnému z nich se dosud nepodařilo nahradit PSA.[13]

V rámci našeho výzkumu jsme provedli rešerši aktuálně zkoumaných markerů KP i jiných onkologických onemocnění a vybrali spektrum možných markerů, které by bylo možné měřit z krevního séra užitím metody ELISA a komerčně dostupných ELISA kitů. Konkrétně jsme zvolili annexin, serin proteázový inhibitor Kazal-type 1 (SPINK-1), tkáňový inhibitor metaloproteináz (TIMP), chromogranin A, endoglin, mindin a thymidinkinázu 1 (TK1). Tyto jsme analyzovali na souboru krevních sér a moči pacientů s KP a u zdravých kontrol za účelem zefektivnění minimálně invazivní diagnostiky KP.

2. Nádorové markery karcinomu prostaty

2.1 Onkomarkery v obecných doporučeních

Evropská urologická společnost v Guidelines pro rok 2020 se slabou úrovní doporučuje před biopsií prostaty provedení dalšího testu séra či moči u pacientů s benigním nálezem per rektum a hodnotou PSA mezi 2–10 ng/ml. Se silnou úrovní pak nabídnutí dalšího zobrazení, či nomogramu.[14]

Další doporučení týkající se onkomarkerů v aktuálních Guidelines chybí. V textu se věnuje především sérovým markerům PSA a fPSA, omezeně pak testu Prostate Health Index (PHI), dále testu skóre čtyř kallikreinů (4K) a testům z moči, konkrétně PCA3 marker, SelectMDX, Mi Prostate score (MiPS) a ExoDX. Těmto, ale i jiným markerům, se budeme dále věnovat.

Americký National Cancer Institute (NCI) definuje biomarker jako biologickou molekulu nacházející se v krvi, či jiné tělní tekutině, případně v tkáni, která může být objektivně měřena a hodnocena jako známka normálního / abnormálního biologického procesu a patogenetického stavu. Biomarker může být využit ke screeningu, diagnostice, stanovení prognózy a ke sledování odpovědi onemocnění na léčbu.[15, 16, 17]

Prvním popsaným biomarkerem KP byla prostatická kyselá fosfatáza (PAP) a to již v třicátých letech minulého století.[18] Ta byla následně nahrazena PSA. V liberálním prostředí Spojených států je aktuálně dle Food and Drug Administration (FDA), případně v rámci norem Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) „vylepšování klinické laboratoře“ schválena celá řada molekul, viz tabulka č. 1.

Tabulka 1: Výčet v textu uvedených markerů

Název markeru	Materiál	Využití markeru	Schváleno*
PSA	Sérum	prediktivní / prognostický	FDA, EAU
PHI	Sérum	prediktivní / prognostický	FDA, EAU
4K	Sérum	prediktivní / prognostický	FDA, EAU
miRNA	Sérum	prediktivní	0
CTC	Sérum	prognostický	FDA
PCA3	Moč	prediktivní	FDA, EAU
ExoDx	Moč	prediktivní	CLIA
MiPS	Moč	prediktivní/ prognostický	CLIA
SelectMDx	Moč	prediktivní	CLIA, EAU
Prostarix	Moč	prediktivní	CLIA
Detekce buněk KP z moči	Moč	prediktivní	0
Confirm MDx	Tkáň	prediktivní	CLIA
Prolaris	Tkáň	prognostický	FDA
Oncotype Dx	Tkáň	prognostický	FDA
Decipher	Tkáň	prognostický	CLIA
Promark	Tkáň	prognostický	CLIA
PCMT	Tkáň	prediktivní	0

FDA - U.S. Food and Drug Administration; EAU - European Association of Urology; CLIA- Clinical Laboratory Improvement Amendments, PSA - prostatický specifický antigen, PHI - index zdraví prostaty, 4K - panel 4 kalikreinů, miRNA - mikro RNA, CTC - cirkulující nádorové buňky, PCA3 - Prostate Cancer Gene 3, MiPS - Mi Prostate Score, PCMT - Prostate Core Mitomic Test

*** v případě EAU se jedná o doporučení**

2.2 Dělení onkomarkerů

Onkomarkery KP dělíme třemi způsoby. Prvním je, jak již bylo dříve v textu uvedeno, dělení dle využití. V tomto případě rozdělujeme tři skupiny:

V prvé řadě markery prediktivní, jinak také diagnostické, tedy ty, které stanovují, zda pacient je, či není v riziku záchytu KP, těm především se věnuje tato práce. Dále markery prognostické, které využijeme, při již známém onemocnění a hodnotíme pomocí nich účinnost léčby, případně předpokládané výsledky aktivního sledování (active surveillance – AS) nebo vyčkávání s terapií (watchful waiting – WW).

Druhou možností dělení je dle vyšetřovaného materiálu. V tomto případě dělíme na markery sérové (případně z plné krve), močové (někdy po masáži prostaty) a tkáňové.

Třetím způsobem dělení související s výzkumnou činnosti na markery klinicky užívané, ať už schválené či ne (dle zdravotnických organizací) a markery čistě experimentální.

Mnohdy se tyto jednotky překrývají, jak je uvedeno v tabulce č. 1.

2.3 Jednotlivé markery

2.3.1 PSA

Prostatický specifický antigen (PSA) je kalikreinová proteáza produkovaná epitelovými buňkami prostatické žlázy.[19] Nachází se v prostatickém sekretu a její koncentrace je často zvýšena u KP.[20] Po zavedení do praxe v 80. letech minulého století signifikantně zlepšila diagnostiku a léčbu KP včetně přežití.[21] Rozšíření PSA s sebou však nese množství úskalí. Ač se jedná o molekulu orgánově specifickou, nejedná se o marker nádorově specifický a k elevaci dochází i u jiných onemocnění jako například BHP, močová retence, prostatitida, uroinfekce, či po cystoskopickém vyšetření. Sporný je naopak vliv vyšetření per rektum, traumatizace prostaty jízdou na kole, či ejakulace.[22]

Dle doporučení Evropské urologické společnosti (EAU) neexistují žádné standardní hodnoty PSA.[23] Jedná se o kontinuální parametr, kde vyšší hodnoty indikují vyšší riziko KP. Dříve stanovená horní hranice 4 ng/ml pro PSA již dávno neplatí, neboť až 25 % pacientů s nově diagnostikovaným KP má PSA pod touto mezí.[24] Doporučení EAU zmiňují výskyt středně a vysoce rizikového KP (Gleason Score [GS] ≥ 7, případně International Society of Urological Pathology [ISUP] grade ≥2) také u nízkých hladin PSA, viz. tabulka č. 2.

Tabulka 2 – Riziko KP ve vztahu k nízkým hodnotám PSA [14]

Hodnota PSA (ng/ml)	Riziko KP (%)	Gleason Score ≥ 7 (%)
0,0-0,5	6,6	0,8
0,6-1,0	10,1	1,0
1,1-2,0	17,0	2,0
2,1-3,0	23,9	4,6
3,1-4,0	26,9	6,7

PSA – prostatický specifický antigen, KP – karcinom prostaty

Specifickými jednotkami jsou PSA denzita, velocita a zdvojovací čas. Jedná se o výpočtové jednotky. Denzita PSA je rovna podílu hodnoty PSA a objemu prostaty (změřeného sonograficky nebo pomocí magnetické rezonance). Vyšší hodnoty PSA denzity znamenají rovněž vyšší riziko signifikantního KP v biopsii.

Pokud jde o kinetiku PSA, hovoříme o zdvojovacím čase „doubling time“ (PSA–DT) a PSA velocitě (PSA–V). Prvním rozumíme exponenciální růst PSA během času, druhým pak absolutní hodnotu ročního nárůstu. Jejich hodnota je především prognostická, využití v diagnostice je omezené, i vzhledem k BHP, nejednotným intervalům mezi odběry PSA a možné akceleraci/deceleraci PSA–DT a PSAV v čase.[25] Zatímco PSA–V a PSA–DT přesvědčivě specificitu konvenčního testu PSA nezlepšily,[26] PSA denzita prokazatelně zpřesňuje diagnostiku klinicky signifikantního KP.[27, 28] Hraniční hodnoty pro rutinní klinické používání však zatím stanoveny nebyly.[21]

Mimo PSA formy vázané na inhibitory sérové proteázy se v krvi vyskytuje rovněž jeho volná forma (fPSA), která tvoří přibližně 5–35 % celkového PSA. Poměr fPSA k celkovému PSA (f/t) bývá nižší u KP.[29] Musí být vždy užit opatrně, neboť může být nepříznivě ovlivněn několika klinickými a předanalytickými faktory, jako např. nestabilitou volného PSA při různých teplotách, variabilní charakteristikou testu a BHP.[30] Systematický přehled zahrnující 14 studií ukázal, že při celkové hodnotě PSA >10 ng/ml nemá již fPSA klinické užití ani při diagnostice ani u sledování již známých karcinomů. U pacientů s hodnotami PSA 4–10 je pak senzitiva vyšetření pro pozitivní biopsii 70 %.[31] Poměr f/t nad 20 % svědčí pro BHP, 15–20 % je šedá zóna a pod 15 % svědčí pro KP.

Vyšetření PSA je vhodné nabídnout informovaným pacientům ve věku nad 50 let. V případě KP v rodinné anamnéze a u Afroameričanů již od 45 let, s ohledem na jejich celkový zdravotní stav. Další testování závisí na primární hodnotě, při nízkých hodnotách obvykle s DRE opakujeme každých 12 měsíců. Při iniciálních hodnotách nad 10 ng/ml odběr opakujeme a následně indikujeme BP. Při hodnotách 2–10 ng/ml přihlédneme k hodnotě fPSA a doplňujeme další vyšetření – např. pomocí jiného onkomarkeru, nomogramu či zobrazovacích metod.

2.3.2 PHI

Již několik let se v klinické praxi setkáváme s dalším onkomarkerem, tzv. proPSA, případně z něj vypočtené hodnoty Prostate Health Index (PHI). ProPSA je jedním z prekurzorů PSA. V krvi se nachází v několika izoformách [-2]proPSA, [-4]proPSA, [-5]proPSA a [-7]proPSA. Jednotlivé formy se od sebe liší počtem aminokyselin v původní peptidové sekvenci.[32] Prekurzory jsou dále konvertovány na aktivní formu pomocí enzymu human kallikrein–2 (hK2). Experimentálně bylo prokázáno, že [-2]proPSA je produkováno především periferní zónou prostaty, kde dochází ke vzniku většiny KP. Předpokládá se tedy, že se [-2]proPSA tvoří více u pacientů s KP než s BHP, kde většina hypertrofické tkáně pochází z přechodní zóny prostaty.[33, 34] Podobně jako PSA je i proPSA získáváno z krevního séra.

Z hodnoty [-2]proPSA je dále vypočtena hodnota PHI vzorcem ([-2]proPSA /fPSA) × √ PSA. Výpočet byl vyvinut v Brea ve Spojených státech společností Beckman Coulter a schválen FDA v roce 2012 a v současnosti je uveden i v EAU Guidelines. Jeho účelem bylo lépe odlišit pacienty v riziku signifikantního KP, konkrétně u pacientů ve věku nad 50 let, PSA 4–10 ng/ml a s nesuspektním DRE. Dle studií publikovaných Lazzerim et al. PHI signifikantně zlepšuje diagnostickou přesnost predikce KP.[35, 36] Výsledky byly dále potvrzeny metaanalýzou provedenou Bruzzesem et al., kde se zároveň na velkém počtu pacientů potvrdil vyšší záchyt KP u PHI oproti PSA a fPSA.[37]

2.3.3 4K skóre

Panel 4 kalikreinů – celkového PSA, fPSA, intaktního PSA a human kallikrein-2 (hK2) dohromady vytváří tzv. 4K skóre. Podobně jako předchozí testy ho provádíme z krevního séra. Dle řady studií prokázalo 4K skóre vyšší přesnost predikce KP než modely založené na PSA.[38, 39] Stejně jako předchozí je i 4K uvedeno v Guidelines EAU. Tento test je komerčně dostupný a schválený, včetně americké FDA. Vickers a Lilja vytvořili v roce 2010 model predikce záchytu KP z BP založený na 4K skóre vztaženém k věku, DRE a předchozích BP. Cílem testu je snížit počet zbytečných BP u mužů testovaných na PSA.

Výrazným vylepšením oproti PSA je u 4K menší ovlivnění výsledku velikostí prostaty u BHP.[40]

Několik prospektivních multicentrických studií prokázalo, že jak PHI, tak i 4K skóre mají lepší účinnost než samotné f/t PSA v detekci KP u mužů s PSA 2–10 ng/mL.[41, 42, 43] Prospektivní multicentrická americká studie z roku 2015 potvrdila předchozí výsledky. Při cut–off hodnotě 6 % byl počet BP snížen o 30 % a pouze 1,3 % high risk tumorů nebylo zachyceno.[44] V přímém srovnání vykázaly oba testy (phi a 4K) obdobné výsledky.[45] Dle dat National Comprehensive Cancer Network (NCCN) nebyly do současné doby stanoveny cut–off hodnoty umožňující využití 4K skóre v klinické praxi.[46]

Nadějnou se zdá i kombinace PHI a 4K skóre. Nordstrom et al. z roce 2015 publikovali výsledky studie s 513 pacienty indikovaných k primobiopsii prostaty. Při autory definovaných cut–off hodnotách (10 % u 4K skóre a 39 u PHI) by bylo možno neprovést až 29 % BP, avšak nezachytilo by se 10 % high grade (HG) KP.[45]

2.3.4 miRNA

Mikro RNA (miRNA) jsou malé (17–22 nukleotidů) nekódující sekvence RNA s důležitou úlohou v regulaci genové exprese na posttranskripční úrovni.[47] Byly identifikovány u řady onkologických diagnóz včetně KP.[48]

Počet identifikovaných miRNA se postupně zvyšuje od roku 1993, kdy byla první miRNA popsána u hlístice Caenorhabditis elegans.[47] V současné době je počet miRNA popsaných podle databáze mirbase.org téměř 40 tisíc, z nichž se však jen několik tisíc nachází u lidí. Počet studií, které hodnotí jejich užitečnost jako biomarkerů, roste od roku 2008, kdy Lawrie et al.[49] navrhli využití cirkulující miRNA jako diagnostického nástroje u pacientů s B-–buněčným lymfomem.

Ačkoli je miRNA dostatečně stabilní v plazmě a séru, existují aktuálně velké rozdíly v kvalitě vzorků a jejich zpracování a k využití v praxi je nutná další optimalizace a standardizace postupů.[50] Mitchell el al. jako první prokázali přítomnost miRNA v plazmě pacientů s KP.[51] Zároveň prokázali signifikantně vyšší výskyt konkrétní sekvence miR–141 u pacientů s pokročilým KP oproti zdravým kontrolám. Exprese aberantní miRNA byla

dále prokázána u KP v iniciaci, vývoji i progresi karcinomu.[52] Následně byl výzkum zaměřen na panely o desítkách sekvencí, např. Mihelich et al. popsali 14 miRNA, které přesně odlišily pacienty s HG a low grade (LG) KP.[53] Využití by tedy mohlo být v predikci signifikantního KP v BP.

Využití miRNA v moči je v současné době nejasné. I přesto, že bylo zkoumáno řadou autorů a některé výsledky jsou nadějné, jednalo se vždy o malé kohorty pacientů a je třeba dalšího výzkumu. EAU Guidelines jej jako standardní marker neuvádějí.[54]

2.3.5 PCA3

Společnost Progensa z Bedfordu, USA, vyvinula test Prostate cancer gene 3 (PCA3). Jedná se o gen transkribovaný z dlouhé nekódující mRNA, která je produkovaná ve vysoké míře tkání KP. Test PCA3 udává skóre vypočtené z koncentrace PCA3 mRNA a PSA mRNA. Na rozdíl od předchozích markerů je získáváno z moči, a to po masáži prostaty provedené k získání vyššího počtu prostatických buněk. Analýza je dále prováděna metodou polymerázové řetězové reakce (PCR).

Dostupné výsledky naznačují, že skóre PCA3 může být užitečné při detekci KP, zejména u pacientů po negativní BP.[55] Schválení FDA získalo PCA3 v roce 2012 pro identifikaci vhodných kandidátů k rebiopsii prostaty, a to pro pacienty po jedné, či více negativních BP, starších 50 let a výsledkem PCA3 nad 25. Doporučení NCCN jej v roce 2015 klasifikovala jako užitečný test před opakovanou BP.[56]

Kontroverzní je definice nejlepší diskriminační hodnoty. Multicentrická studie vedená Haesem ukázala, že skóre 35 poskytuje optimální rovnováhu mezi senzitivitou (47 %) a specificitou (72 %).[57] Podobné výsledky byly nedávno hlášeny v metaanalýze publikované týmem Hu et al. [58]

PCA3 bohužel přináší velké množství falešně negativních výsledků i u skóre vyššího než 35. Ve výše uvedené studii Haese by bylo možno neprovádět 67 % BP při využití diskriminační hodnoty 35, ale 21 % HG KP by nebylo diagnostikováno. Při diskriminantu 20 by pak ubylo pouze 44 % BP, ale počet nezachycených by se snížil na 9 %. Tato data byla potvrzena v multicentrické studii Crawfordem et al.[59] Jeho analýza zároveň prokázala

nečekaný fakt, že pouze 86 ze 114 pacientů s PCA3 skóre nad 100 měla KP, což neodpovídalo představě o nadprodukci tumorem v periferní zóně prostaty. Kontroverzní je i korelace PCA3 ke GS, respektive agresivitě tumoru, kde se výsledky studií liší.[60, 61] Většina současných studií i tak udává signifikantně vyšší diagnostickou přesnost PCA3 oproti samotnému PSA.

Hodnota PCA3 se zvyšuje s objemem KP, ale existují konfliktní údaje o tom, zda předpovídá stupeň ISUP gradu.[62] V šesti přímých srovnávacích studiích PCA3 a PHI pouze Seisen et al. našel významný rozdíl; PCA3 detekovalo více karcinomů, ale pro detekci signifikantního onemocnění, definovaného jako stupeň ISUP> 2, více než tři pozitivní vzorky nebo > 50% postižení karcinomem v jakémkoli vzorku, se PHI ukázalo jako lepší.[63]

Aktuální EAU Guidelines PCA3 doporučují před rebiopsií prostaty a po negativní primární BP, ale ne k monitoraci onemocnění například u AS. Dále je můžeme nabídnout pacientům s PSA 2–10 jako pomocný marker, doporučení je však nadále nízké úrovně. American Urological Association (AUA) Guidelines doporučují PCA3 jako sekundární test ke stanovení nutnosti BP, ale bez průkazu benefitu v rámci primárního screeningu. Guidelines NCCN jej zmiňují opět ve vztahu k opakované biopsii.

Marker je komerčně dostupný v ČR pod názvem Progensa urine test s cenou okolo 5000 Kč. V současné době je tedy hlavní indikací testu Progensa nejistota při indikaci opakované BP, klinický benefit však zůstává sporný.[64]

2.3.6 TMPRSS2: ERG, Mi Prostate score (MiPS)

Další alternativou uvedenou v EAU Guidelines je fúze TMPRSS2-ERG, tedy fúze genu transmembránové proteázy serinu 2 (TMPRSS2) a genu ERG (onkogen související s genem ETS – specifické transformace erytroblastů), kterou lze detekovat u vysokého procenta KP. Popsán byl na University of Michigan, Ann Arbor, USA, Tomlinsem et al. v roce 2005.[65] Aberantní fúze genu TMPRSS2 s ERG byla pozorována u 15–59 % pacientů s KP.[66]

Vzorky jsou stejně jako u PCA3 získávány z moči po předchozí masáži prostaty a následně měřeny pomocí metody PCR. Nadějná se zdá kombinace skóre PCA3 a TMPRSS2:ERG u pacientů před BP. Multicentrická studie publikovaná Leytenem et al.[67] prospektivně hodnotila oba parametry u 443 pacientů před BP a zjistila signifikantně zvýšenou prediktivní hodnotu u obou testů. TMPRSS2:ERG pak na rozdíl od PCA3 korelovalo rovněž s GS a klinickým stagingem.

Samotná prognostická hodnota fúze TMPRSS2: ERG se zdá být u KP nízká. Proto následně navrhl Tomlins kombinaci PCA3, TMPRSS2: ERG, PSA a kalkulátoru Prostate Cancer Prevention Trial s velmi slibným výsledkem jak ve výběru pacientů k BP, tak k predikci HG KP.[68] Tento model nazval Mi prostate score (MiPS). Měkké „i“ v názvu značí slovní hříčku se státem Michigan, kde model vznikl. Autoři ověřili, že statistické modely, které začleňovaly model MiPS, měly významně vyšší plochu pod křivkou (Area Under the Curve – AUC) než modely zahrnující pouze PCA3 a PSA (AUC 0,751; p <0,001). S jeho využitím by se mohl omezit počet BP o 36 % s nezachycením pouhých 1,6 % HG tumorů.

Test MiPS byl dále na souboru 246 pacientů hodnocen Stephanem et al., kde byl proti samotnému PSA záchyt HG KP v biopsii signifikantně vyšší.[69] Test nebyl do současné doby schválen FDA, v Guidelines EAU je zmíněn, ale pouze jako výzkumný marker.

2.3.7 Exosomální biomarkery

Exosomy jsou malé (30–150 nm) endocytické vezikuly s dvojitou lipidovou membránou. Jsou vylučovány řadou typů buněk a mohou obsahovat proteiny, lipidy a nukleové kyseliny.[70] Prvně je popsal v roce 1981 Trams et al. a v současnosti je jich již známo několik desítek tisíc.[71] Jejich přítomnost byla potvrzena v séru, plazmě a v jiných biologických tekutinách, včetně moči, slin, ascitu, mateřského mléka a plodové vody. Studium nových biomarkerů v exosomech se zdá velmi nadějné, neboť jsou v tělesných tekutinách velmi stabilní, čemuž napomáhá jejich lipidová dvojvrstva.[72]

Nádorové buňky uvolňují vysoké množství exosomů, které mohou tumor ovlivňovat v různých stadiích. Prvně bylo výrazně vyšší množství exosomů prokázáno u tumoru ovaria, kde korelovalo s klinických stadiem postižení.[73] Obdobné výsledky byly nalezeny i u dalších nádorových onemocnění, včetně karcinomu plic, tlustého střeva a chronické lymfocytární leukémie.[74, 75, 76]

Dostupné údaje napovídají, že exosomy odvozené od nádorových buněk aktivně přispívají k progresi onemocnění.[77] U KP byly dle Hosseini-Beheshti et al. v roce 2016 popsány exosomy, které by mohly přispívat k progresi onemocnění.[78] Konkrétněji ke snížení apoptózy, zvýšení proliferace maligních buněk a k indukci buněčné migrace.

Do současné doby neexistuje standardizovaná metoda k jejich získání. Nejčastěji jsou získávány izolací při diferenciální ultracentrifugaci, kdy se jednotlivé frakce oddělují při různých rychlostech odstřeďování (exosomy při nejvyšší 100,000 g).[79] Na tuto metodu pak existuje řada variací, např. s využitím komerčně dostupného reagencia ExoQuick. Přítomnost exosomů je dále ověřena elektronovým mikroskopem. Dále mohou být využity metody imunoanalýzy (ELISA) a Western blot k detekci exosomálních markerů (např. CD9, CD63 a CD81).

Jelikož v rámci KP se jedná o relativně novou jednotku, existuje do současné doby pouze několik studií. Například Øverbye et al. provedli analýzu na malém vzorku 15 zdravých kontrol a 16 pacientech s KP s nálezem 246 alterovaných exosomů v moči u pacientů s KP.[80] Dijkstra et. Al. porovnali PCA3 a TMPRSS2: ERG mezi sedimentem moči a exosomy. Ve výsledku byly exosomy robustnějším zdrojem biomarkerů než sediment, ovšem s těžko dosažitelným detekčním limitem. Jejich množství se signifikantně zvýšilo

po masáži prostaty.[81] Počáteční výsledky exosomálních biomarkerů jsou nadějné, k jejich využití v praxi je však nutno více analýz ve větších klinických studiích a standardizace jejich izolace.

2.3.8 ExoDx

ExoDx nebo také Intelliscore, je nový exosomální test vyvinutý v USA společností Exosome Diagnostics, který využívá vzorek moči bez nutnosti předchozí masáže prostaty. Test měří exosomální geny ERG, PCA3 a SPDEF. Je vhodný u pacientů nad 50 let a PSA 2–10 ng/ml, u kterých se zvažuje primobiopsie prostaty. Společně s PSA by měl lépe predikovat KP v biopsii.[82, 83]

Multicentrická studie o 774 pacientech potvrdila signifikantně lepší prediktivní schopnost záchytu signifikantního karcinomu prostaty než PSA. Při nezachycení pouhých 5 % GS > 7 KP by se s využitím ExoDx dalo omezit až 27 % BP.[82] V EAU Guidelines je o ExoDx uvedena pouze zmínka, NCCN ho zmiňuje jako investigativní biomarker.

2.3.9 Cirkulující nádorové buňky

Dalším markerem získávaným z krve by mohly být cirkulující nádorové buňky (circulating tumour cells – CTC). Buňky KP lze dle řady studií detekovat v krvi a kostní dřeni.[84, 85, 86]

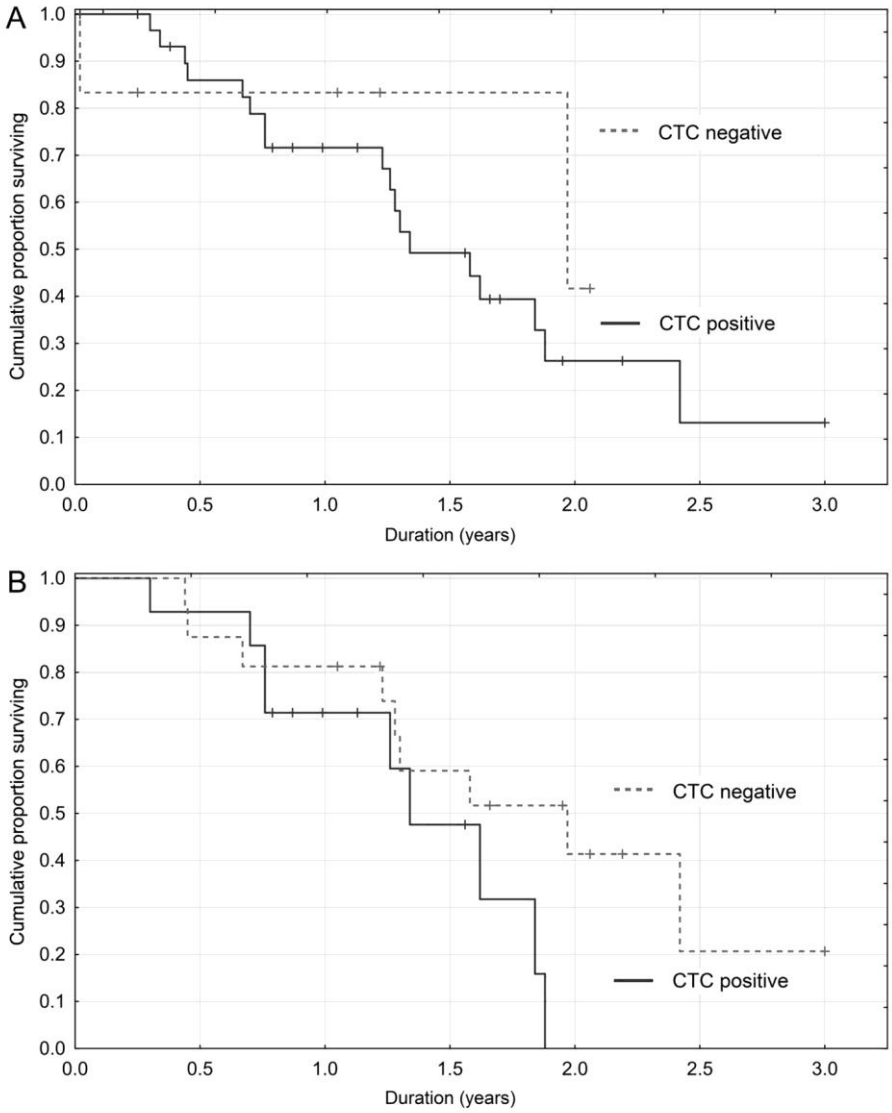
Díky zlepšujícím se metodám sekvenování a citlivějším metodám detekce je tzv. „tekutá biopsie“ nadějnou metodou detekce KP i dalších onkologických onemocnění. Jedná se o minimálně invazivní možnost sledování nádorové nálože i určení genomové nebo biologické povahy tumoru jak prediktivně, tak prognosticky.

Prvním dostupným je CellSearch™ (Jansen Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Jedná se o prognostickou platformu schválenou FDA. Je nezávislým prediktorem celkového přežití u pacientů s metastatickým KP.[87]

V současné době je tedy snaha o využití CTC jako prognostického biomarkeru KP. Bono et al. provedli analýzu u 276 pacientů s nálezem vyšší prediktivní hodnoty k celkovému přežití pacientů než u PSA. Molekulární analýza CTC se zdá být srovnatelnou s primární biopsií nádorové tkáně či metastázy.[88] Tekutá biopsie může KP sledovat minimálně invazivně a v reálném čase.

Alternativou k CTC je cirkulující volná DNA (circulating free – cf–DNA) – malé částečky deoxyribonukleové kyseliny vylučované nádorovými buňkami. I tato metoda se zdá být nadějnou. S technologickým pokrokem souvisejí ale i limitace. Především malé množství CTC a cf–DNA v krvi a v neposlední řadě i finanční náročnost testování. Svou roli si již našly u tumoru prsu a plic, využití u jiných nádorových onemocnění včetně KP musí být dále prostudováno.

Zkušenosti s CTC máme i na našem pracovišti. U 37 pacientů s kastračně rezistentním KP na terapii docetaxelem jsme s použitím komerčně dostupné platformy AdnaTest (Adnagen AG, Langenhagen, Německo) hodnotili přítomnost CTC. Úspěšně jsme CTC detekovali u 30 (81,1 %) pacientů. Hodnoty PSA po terapii byly signifikantně vyšší u CTC pozitivních pacientů. Přítomnost CTC korelovala s kratším celkovým přežitím. Výsledky analýzy byly publikovány v roce 2016.[89]



Obrázek 1: Pravděpodobnost celkového přežití u pacientů s kastračně rezistentním karcinomem prostaty dle přítomnosti cirkulujících nádorových buněk (CTC) před zahájením léčby docetaxelem (A) a během léčby docetaxelem (B) zobrazen na Kaplan-Meierových křivkách. Obrázek vložen s laskavým souhlasem doc. MUDr. Otakara Čapouna.

2.3.10 SelectMDx

SelectMDx test společnosti MDx Health v Ivine, USA, predikuje s vysokou specificitou (AUC 0,89) pravděpodobnost nálezu KP při biopsii a pravděpodobnost HG vs. LG onemocnění. Jedná se o PCR test z moči po masáži prostaty u pacientů, u nichž zvažujeme BP. Test stanovuje hodnoty mRNA dvou genů: DLX1 a HOXC6 s využitím exprese KLK3 jako reference.

Test se kombinuje ve výpočtu s tradičním PSA, věkem, předchozími BP a rodinnou anamnézou pacienta. Panel tří genů – TDRD1, DLX1 a HOXC6 rovněž signifikantně zlepšuje detekci signifikantního KP (AUC 0,77) oproti samotnému PSA (AUC 0,72) a PCA3 (AUC 0,68).[90]

Tyto výsledky byly recentně ověřeny a potvrzeny Van Nesteem et al.[91] na souboru 905 pacientů ve dvou prospektivních studiích (AUC 0,9) se snížením celkového počtu BP o 42 %, snížením zbytečných BP o 53 % a negativní prediktivní hodnotou 98 %. Model by tedy mohl vést ke snížení nadbytečné diagnostiky a léčby KP. Současné NCCN a EAU Guidelines zmiňují SelectMDx jako investigativní biomarker.

2.3.11 ConfirmMDx

ConfirmMDx je test vyvinutý společností MdxHealth v Kalifornii, USA. Jedná se o DNA metylační esej z prostatické tkáně. Test se zaměřuje na epigenetické alterace DNA, konkrétně genů GSTP1, APC, RalGDS/AF-6 a RASSF2. ConfirmMDx bylo úspěšně využito při negativním výsledku BP, kdy jeho pozitivní výsledek naznačuje, že se v tkáni prostaty KP nachází v blízkosti histologicky negativního bioptického vzorku a je tedy vhodné zvážit rebiopsii.[92]

Výsledky byly ověřeny například ve studii DOCUMENT a MATLOC, kde byla potvrzena souvislost s detekcí KP v rebiopsii[93] s až 90% negativní prediktivní hodnotou.[94]Je již komerčně dostupný a zahrnutý v NCCN Guidelines, kde je doporučen u mužů indikovaných k rebiopsii prostaty. Guidelines EAU tento marker prozatím pro nedostatek dat nedoporučují, pouze udávají, že lze pomocí ConfirmMDx získat další informace v rámci rozhodování o rebiopsii.

2.3.12 Oncotype Dx (GPS test)

Oncotype Dx je další americký test (Genomic Health, Redwood City, Kalifornie). Je to genomický test využívající tkáně z BP. Měří mRNA expresi 17 genů, které odpovídají za růst a přežití buněk tumoru. Test byl vyvinut a dále testován na kohortě 4500 pacientů.[95] Využívá metodu PCR na fixovaných vzorcích po radikální prostatektomii. Z původních 732 genů bylo vybráno 17 s nejvyšší prediktivní hodnotou a nazváno Genomic Prostatic Score (GPS).[96] Test předpovídá rekurenci onemocnění po radikální operaci a má vysokou prediktivní hodnotu především v léčbě nízko a středně rizikových KP.[97]

2.3.13 Decipher

Decipher test (GenomeDx, San Diego, Kalifonie, USA) je genomický test měřící expresi 22 různých genů. Ty byly vybrány retrospektivně z kohorty 192 pacientů s metastatickým KP.[98] Dle NCCN Guidelines je doporučen u pokročilých nádorů po radikální prostatektomii (RP).[99] Evropská doporučení jej zmiňují a uvádějí, že dosud chybí dostatek dat k využití markeru v klinické praxi.

Vypočítává pravděpodobnost výskytu klinické metastázy během pěti let po RP (AUC 0,75–0,83) a desetileté nádorově specifické přežití (AUC 0,78). Tyto výsledky byly potvrzeny několika klinickými studiemi. [98, 100, 101]

2.3.14 ProMark

Promark (Metamark, Cambridge, MA, USA) je prognostický tkáňový test predikující agresivitu onemocnění, založený na osmi proteinových markerech vyhodnocených automatizovaným imunofluorescenčním testem z fixovaných vzorků z BP.[102]

Výsledek je hodnota od nuly do jedné predikující nepříznivý výsledek histologie z BP u pacientů s nízce rizikovým onemocněním, kde by bylo případně zvažováno i aktivní sledování. V iniciační studii byla na vzorku 381 BP zjištěna vysoká prediktivní hodnota u

nízkorizikových KP se skóre <0,33 (až 95 %) a stejně tak u skóre> 0,8, kde prediktivní hodnota pro nepříznivý výsledek histologie dosahovala 76,9 %.[103]

2.3.15 Prolaris

Prolaris je FDA schválený genomický test vyvinutý společností Myriad Genetics ze Salt Lake City v USA. Jedná se o prognostický test z tkáně, například formaldehydem či parafínem fixovaného vzorku z BP. Spolu s GS a PSA predikuje agresivitu onemocnění. Měří se exprese 46 genů. Jejich nízká exprese je spojená s nízkým rizikem z progrese, takovým pacientům lze nabídnout například AS. U pacientů s vysokou expresí je naopak vhodné zvážit radikální léčbu. Užitečný by mohl být i k určení rizika rekurence po radikální prostatektomii.[20] Výsledky jsou hodnoceny a verifikovány v několika retrospektivních studiích.[104, 105, 106] Aktuálně nejsou dostupné žádné multicentrické prospektivní studie k jeho evaluaci. Nevýhodou testu je rovněž jeho vysoká cena. Guidelines EAU jej hodnotí jako nadějný, ale s nutností dalších dat před zavedením do klinické praxe.

2.3.16 Prostate Core Mitomic Test (PCMT)

Dalším tkáňovým prediktivním testem je PCMT. Prozatím se jedná o vývojovou studii. Je založen na faktu, že mitochondriální funkce je spojena s regulací onkogenů a tumor supresorových genů.[107] Cílem testu je identifikovat opravdu negativní BP a omezit tak nutnost případných rebiopsií.[108] Ve validační studii bylo PCMT asociováno se senzitivitou 84 %, specificitou 54 % a negativní prediktivní hodnotou 91 %.[109]

2.3.17 Prostarix Risk Score

Prostarix Risk Skóre (Boswick Laboratories) je experimentálním testem z moči po předchozí masáži prostaty. Měl by napomáhat k rozhodnutí o provedení první, či opakované BP. Využit by měl být u pacientů s negativním per rektum vyšetřením a mírně zvýšenou hodnotou PSA.[110]

Metoda kvantitativně měří čtyři metabolity (sarkosin, alanin, glycin a glutamát). Výsledky jsou vyšší než u PSA, respektive PCPT kalkulátoru (AUC 0,64 oproti AUC 0,61, respektive AUC 0,61).[111]

2.3.18 Detekce buněk KP v moči

V současné době je vyvíjen prediktivní test na průkaz intaktních buněk KP v moči po DRE. Ty se detekují metodou fluorescenčního barvení a následně imunofluorescenční cytologií. Na kohortě 50 pacientů byla senzitivita testu 36 %, ale specificita dosahovala až 100 %, podobně jako u cytologie moči známé u uroteliálního karcinomu močového měchýře.[112]

Obdobná studie sledovala opět moč po DRE. Experimentátoři vyvinuli membránu zachytávající jednotlivé buňky, které následně hodnotili metodou imunocytochemie. Mezi exprimovanými proteiny byly ERG, AMACR a prostein.[113] Senzitivita testu pro detekci KP v BP byla v kohortě 63 pacientů 64 %, specificita 68,8 %.

3. Imunochemické metody

Imunochemické metody představují často užívané techniky v praxi lékařů i odborníků v biomedicínském výzkumu. Od jejich objevení koncem devatenáctého století, byly široce aplikovány v lékařské diagnostice a bakteriologii. Moderní imunoanalytické metody (imunoanalýzy, imunoeseje) zahrnují snadno proveditelné a dobře automatizovatelné jednoduché metody. Jejich společnou vlastností je vysoká citlivost a přesnost, přičemž detekční limity dosahují řádově hodnot až 10^{-20} mol/l. To umožňuje jejich využití pro rutinní analýzy látek s velmi nízkou koncentrací, např. hormonů, nádorových markerů, cytokinů, virů.[114] Prostřednictvím epitopů či antigenních determinantů reagují antigeny s protilátkami, často získanými ze séra imunizovaných zvířat. Interakcemi antigenů a protilátek se zabývá vědecký obor imunochemie.[116]

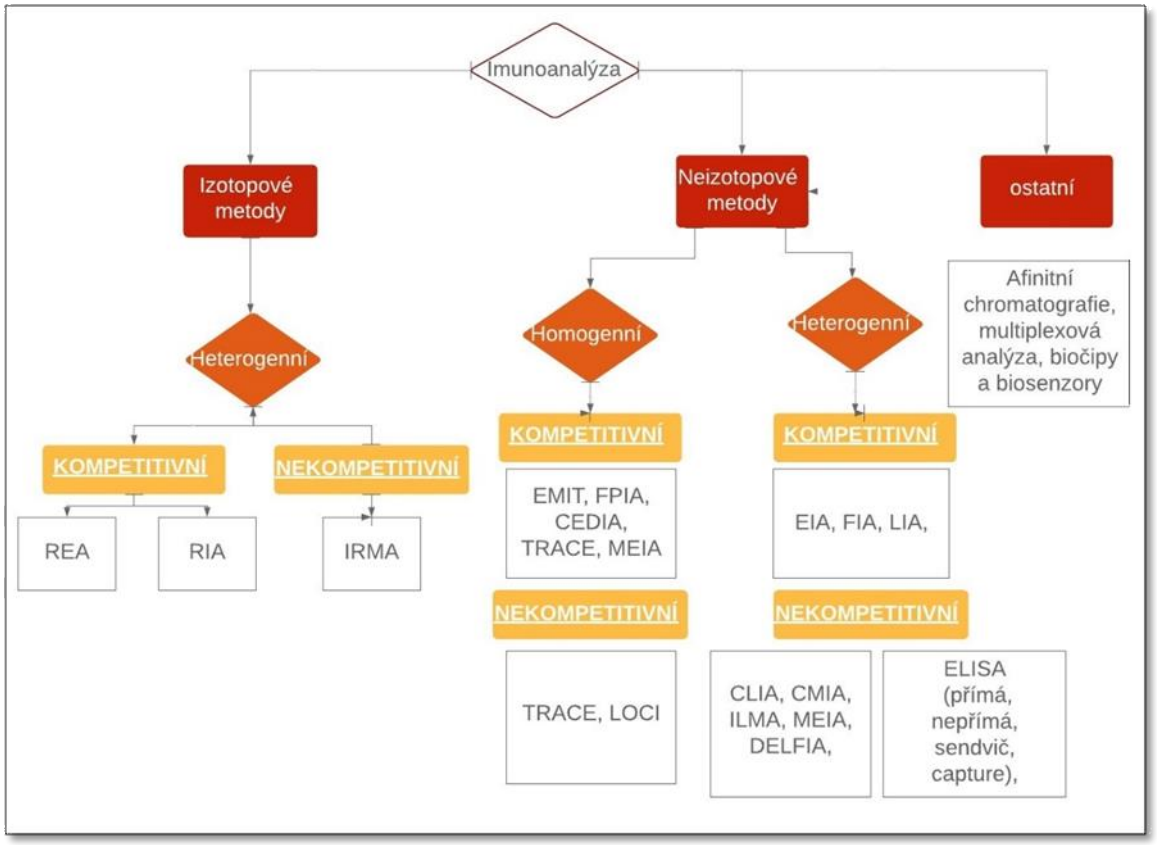
3.1 Antigeny a protilátky

Antigen definujeme jako látku, na kterou po jejím rozpoznání reaguje imunitní sytém tvorbou protilátek. Obvykle se jedná o proteiny, komplexní polysacharidy či lipopolysacharidy. Dělíme je na přírodní a syntetické. Vlastní reakce s protilátkou se neúčastní celý antigen, nýbrž jen jeho povrchová část, tzv. epitop. Vazba epitopu na protilátku je zprostředkována nekovalentními vazbami za vzniku imunokomplexů.

Protilátky představují obvykle látky bílkovinné povahy, patřící mezi imunoglobuliny. Jsou secernovány po vazbě antigenu a dalších signalizačních molekul na receptory B-lymfocytů. Vazba antigenu vyvolá diferenciaci B–lymfocytů na plazmatické buňky a tvorbu příslušných protilátek.[115] Jejich základní funkcí je vazba toxinů či virů, což brání jejich další vazbě na cílové receptory. Dále protilátky mikroorganismy opsonizují, tedy označují je jako cíl pro složky buněčné imunity (fagocyty, natural killer cells atd.).

3.2 Dělení imunochemických metod

Imunochemické metody dělíme především na izotopové a neizotopové a ty dále na homogenní a heterogenní. U každé skupiny rozdělujeme ještě na kompetitivní a nekompetitivní. Přehled imunochemických metod shrnuje obrázek č. 2.



Obrázek 2: Přehled vybraných imunochemických metod: radioenzymová imunoanalýza (REA), radioimunoanalýza (RIA), imunoradiometrická analýza (IRMA), enzymová multiplikovaná imunoanalýza (EMIT), fluorescenční polarizační imunoanalýza (FPIA), klonovaný imunotest dárce enzymu (CEDIA), časově rozlišená emise zesíleného kryptátu (TRACE), mikročásticová enzymová imunoanalýza (MEIA), luminiscence založena na přenosu kyslíku (LOCI), enzymová imunoanalýza (EIA), fluorescenční imunoanalýza (FIA), luminoimunoanalýza (LIA), chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA), chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích (CMIA), imunoluminoimunoanlýza (ILMA), disociačně vylepšený lanthanidový fluorescenční imunologický test (DELFIA), enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA).
Obrázek použit s laskavým souhlasem Ing. Lenky Hanouskové, Ph.D.

3.3 Izotopové metody

Izotopové (či radioizotopové) metody se vyznačují užitím radionuklidu vhodného prvku pro přípravu indikátoru imunochemické reakce. Mezi hlavní zástupce řadíme radioimunoanalýzu (RIA), radioenzymovou imunoanalýzu (REA) a imunoradiometrickou analýza (IRMA). Tyto se od sebe liší především kompeticí o protilátky.

První z metod, RIA, je metodou kompetitivní, u které značený a neznačený antigen soutěží o limitované množství protilátky. Další kompetitivní imunoanalýzou je REA. Vychází ze specifické reakce enzymu a odpovídajícího substrátu s detekcí radioaktivity pomocí vhodného radioindikátoru.

Příkladem může být např. stanovení thymidinkinázy (TK) od firmy Beckman Coulter, založené na enzymatické fosforylaci jodem značeného substrátu 5–125I–deoxyuridinu thymidinkinázou ve vzorku za vzniku 5–joddeoxyuridin monofosfátu. Ten se oddělí od zbylé reakční směsi sorbcí na ionexu a u sorbentu měříme radioaktivitu. Intenzita signálu je přímo úměrná aktivitě TK ve vzorcích.[116]

Poslední izotopovou metodou je IRMA. Ta je na rozdíl od předchozích nekompetitivní. Jedná se o sendvičovou metodu využívající ke stanovení antigenu neznačenou protilátku uchycenou na pevné fázi (dno zkumavky, magnetické částice) a značenou protilátku, která se přidává v nadbytku po interakci antigenu se značenou protilátkou.[114]

Tyto metody byly postupně nahrazeny bezpečnějšími neizotopovými metodami, které ke stanovení nevyžadují práci s radioizotopy a měření radioaktivity. Důvodem byla především snaha o omezení práce s potenciálně nebezpečnými a ekologicky škodlivými radionuklidy. Zásadním přínosem izotopových metod je jejich ekonomická výhodnost a také fakt, že pro rutinní stanovení některých analytů alternativní neizotopové metody nejsou k dispozici.[117]

3.4 Neizotopové metody

Izotopové metody byly v posledních desetiletích z velké části nahrazeny enzymovými imunoanalýzami. Ty jako indikátor užívají enzym, který je chemicky (kovalentně) vázán na antigen, či protilátku – vzniká tzv. enzymový konjugát.

Dělíme je na homogenní (nevyžadující separaci) a heterogenní (nutná separace), obě skupiny pak na kompetitivní a nekompetitivní dle nutnosti soutěžení o vazebné místo mezi značeným a neznačeným antigenem. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu přidaného do reakční směsi na barevný produkt. Stanovuje se pak spektrofotometricky nebo na základě fluorescence. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky ve vzorku.[117]

Imunoesejí je známo několik typů. Mezi homogenní řadíme např. enzymovou multiplikovanou imunoanalýzu (EMIT), fluorescenční polarizační imunoanalýzu (FPIA), klonovaný imunotest dárce enzymu (CEDIA), časově rozlišenou emisi zesíleného kryptátu (TRACE), mikročásticovou enzymovou imunoanalýzu (MEIA) a luminiscenci založenou na přenosu kyslíku (LOCI). Mezi heterogenní pak řadíme enzymovou imunoanalýzu (EIA), fluorescenční imunoanalýzu (FIA), luminoimunoanalýzu (LIA), chemiluminiscenční imunoanalýzu (CLIA), chemiluminiscenční imunoanalýzu na mikročásticích (CMIA), imunoluminoimunoanlýzu (ILMA), disociačně vylepšený lanthanidový fluorescenční imunologický test (DELFIA) a enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA).

3.5 ELISA

Enzymově vázaný imunosorbentní test byl vyvinut v roce 1971 Evou Engvall a Peterem Perlmannem jako modifikace metody RIA. Poprvé byla ELISA využita při stanovení IgG protilátek v séru králíka, kdy antigen byl označen enzymem alkalické fosfatázy.[118] Rozvoj metody nastal během 80. let minulého století s výrobou plně automatizovaných analyzátorů využívajících princip enzymových imunoanalýz.[119] Je zástupcem neizotopových nekompetitivních metod.

Základní princip metody ELISA spočívá v navázání antigenu na pevnou fázi zkumavek či mikrodestiček polystyrenu a polypropylenu. Pro značení antigenů/protilátek se nejčastěji využívají enzymy alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza nebo galaktosidáza připojené pomocí Fc–fragmentu. Po navázání značené protilátky k antigenu se do reakce přidá substrát, který je štěpen daným enzymem. Vzniklá barevná změna odpovídá koncentraci analytu.[116, 120]

Dělíme jí dále na přímou, nepřímou, kompetitivní a sendvičovou.

3.5.1 Přímá ELISA

Nejjednodušším typem enzymové imnunoanalýzy je přímá ELISA, založená na reakci jedné protilátky s jedním antigenem. Při této metodě je nejprve neznačený antigen adsorbován na pevnou fázi, dále je přidán přebytek jiného proteinu, obvykle sérový albumin, za účelem blokování všech zbylých vazebných míst. Enzym se spojí s protilátkou v samostatné reakci. Komplex enzym–protilátka přidáme k navázanému antigenu a po vymytí přebytku komplexu zůstane část navázaná na antigen. Po přidání substrátu, katalyzovaným enzymem, zaznamenáme signál odpovídající koncentraci navázaného antigenu. Postup je rychlejší oproti ostatním typům metod ELISA.[116]

Reakce je rychlá vzhledem k absenci pomývání vzorků. Metoda využívá uspořádání, kde na pevnou fázi může být navázána nejprve neznačená protilátka a v dalším kroku značený antigen nebo naopak.[121]

3.5.2 Nepřímá ELISA

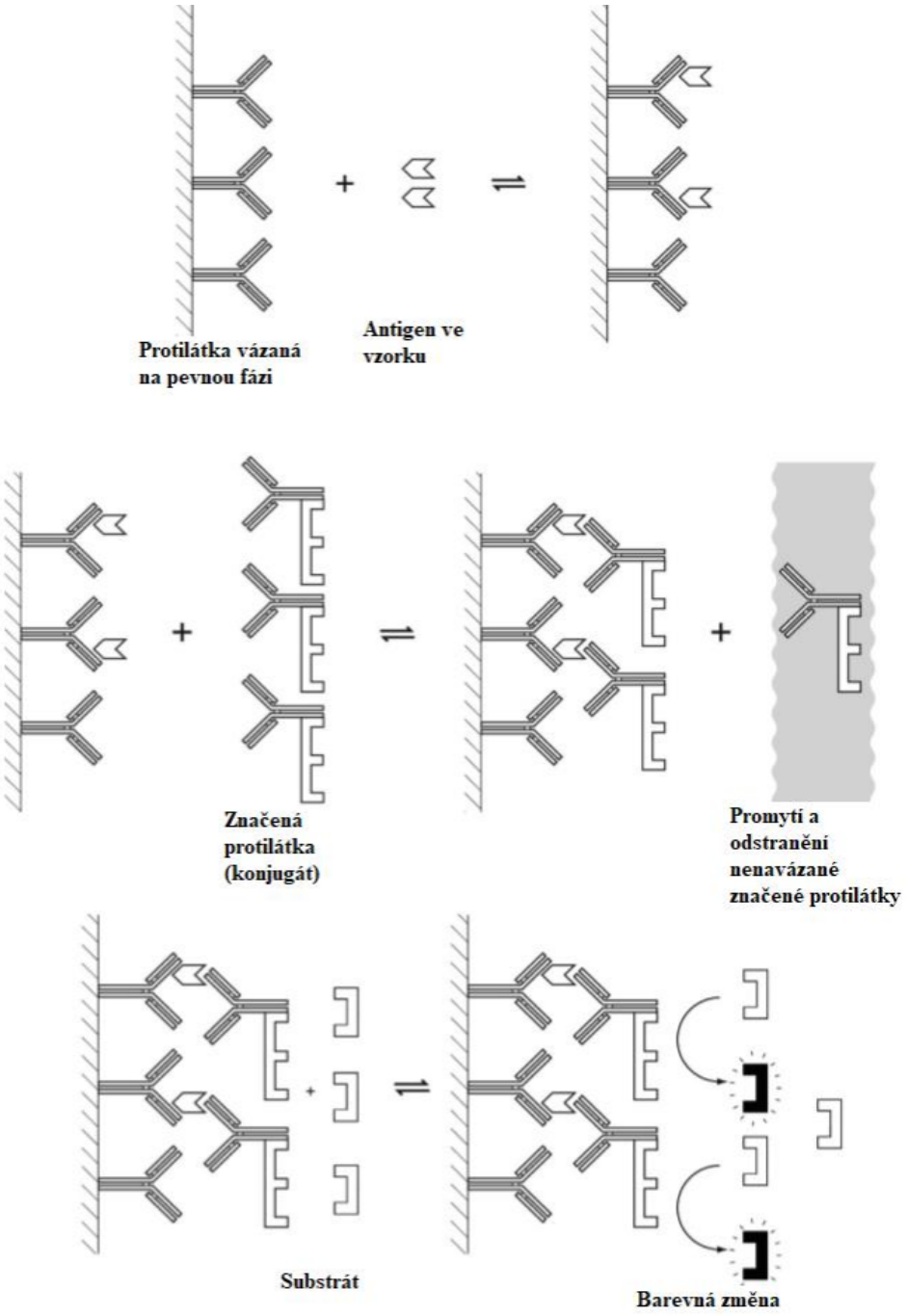
Nepřímá ELISA probíhá ve dvou stupních, zahrnuje proces vazby primární protilátky a značené sekundární protilátky. Primární protilátka je inkubována s antigenem zachyceným na pevnou fázi a po promytí je inkubován imunokomplex se sekundární značenou protilátkou. Tato metoda se využívá například k detekci antivirového IgG.[116, 121, 122]

3.5.3 Kompetitivní ELISA

Na rozdíl od předchozích využívá kompetitivní ELISA primární protilátku navázanou na pevnou fázi. Do reakce je poté přidán vzorek obsahující antigen značený enzymem spolu s neznačeným antigenem. Antigeny přidáváme ve větším množství než protilátku vázanou na nosič, ty následně soutěží o vazebná místa v poměru, v kterém se nacházejí v reakci. Po inkubaci jsou vymyty nenavázané antigeny a po přidání substrátu detekujeme barevnou změnu nepřímo úměrnou koncentraci stanovovaného analytu.[122, 116]

3.5.4 Sendvičová ELISA

Sendvičová ELISA porovnává množství antigenů mezi zachycovací a detekční protilátkou. Měřené antigeny musí mít alespoň dva antigenní epitopy, aby byly dvě protilátky schopné navázat. K detenci a záchytu se využívají monoklonální či polyklonální protilátky. Každá z nich vždy rozpoznává pouze jeden epitop, čímž dosahují velmi citlivé detekce a měření minimálních rozdílů v antigenu. Sendvičová ELISA rovněž dosahuje násobně vyšší citlivosti v porovnání s přímým uspořádáním, nevýhodou je obtížnější optimalizace sendvičových postupů. Protilátky jsou schopny detekovat různé epitopy na cílovém proteinu, čímž zabraňují možným interferencím s jinými protilátkami (obrázek 3). Podtypem je varianta „capture“ sloužící k průkazu protilátek ve vzorku.[122, 116]



Obrázek 3: Sendvičový enzymově vázaný imunosorbentní test (ELISA) [122]
Obrázek použit s laskavým souhlasem Ing. Lenky Hanouskové, Ph.D.

4. Cíle práce a hypotézy

Karcinom prostaty je jedním z nejčastějších maligních onemocnění u mužů. Základem diagnostiky KP jsou nádorové markery. Objev PSA znamenal pro diagnostiku tohoto onemocnění revoluci, nicméně i přes nesporné benefity přináší jeho užívání i nové problémy, otevírající dveře pro výzkum dalších markerů s vyšší senzitivitou a specificitou.

Naše práce upozorňuje na širokou problematiku biomarkerů KP. Mezi cíli této práce bylo provedení rešerše aktuálně dostupných a potenciálních markerů karcinomu prostaty. Výčet dostupných markerů viz kapitola 2. V poslední době se objevila řada nových biomarkerů KP, některé jsou velmi nadějné, nicméně základním biomarkerem KP zůstává nadále PSA, které má však v diagnostice KP značné limitace.

Zaměřili jsme se tedy na nové molekuly, které svoji úlohu v diagnostice KP teprve hledají. Jako hlavní kandidáty jsme s uvážením dostupných publikací na toto téma zvolili annexin, SPINK–1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin, a TK1. Stran analytické metody jsme s uvážením laboratorní efektivity, včetně dobré automatizace, vysoké přesnosti a citlivosti a v neposlední řadě možnosti získání komerčně dostupných kvalitních kitů, zvolili metodu sendvičové ELISA.

Naším hlavním cílem bylo využití imunochemických metod ke stanovení kandidátních biomarkerů karcinomu prostaty (annexin, SPINK–1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin, TK1).

V první a druhé studii jsme analyzovali všechny ze zvolených biomarkerů v rámci pilotního pokusu na omezeném počtu subjektů s cílem průkazu vyšších koncentrací zvolených analytů u pacientu s KP oproti zdravým kontrolám. Měření jsme prováděli na vzorcích mražených krevních sér a močí pacientů z našeho pracoviště. S uvážením výsledků této analýzy jsme se dále zaměřili na TK1 v krevním séru, s cílem ověřit výsledky na větším vzorku pacientů s KP a kontrol. Dalším cílem tedy bylo navýšení počtu alikvotovaných pacientů s KP i zdravých kontrol.

Při studiu předešlých publikací zaměřených na TK1 jsme se opakovaně setkali s alternativní metodou jeho stanovení, a to analýzou epitopu TK210, který dle výrobce vykazuje lepší senzitivitu i specificitu. Vzhledem k přesvědčivým výsledkům analýzy TK1

jsme jako závěrečný cíl zvolili ověření právě této hypotézy. Měřením TK1 a TK210 na dosud největším počtu pacientů jsme vytvořili prostor k další klinické aplikaci získaných dat v diagnostice KP.

Na základě dostupných prací jsme předpokládali, že:

a) Námi vybrané kandidátní biomarkery jsou pro primární diagnostiku KP přínosné.
b) Thymidinkináza 1 vykazuje signifikantně vyšší koncentraci v krevním séru pacientů s KP než u zdravých kontrol.
c) Koncentrace mindinu je signifikantně nižší v krevním séru pacientů s KP než u zdravých kontrol.
d) Stanovení epitopu TK210 zlepšuje citlivost a specificitu stanovení TK1.

Primárními cíli projektu byly:

a) Analýza kandidátních biomarkerů (annexin, SPINK–1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin, TK1) v krevním séru a moči metodou ELISA.
b) Rešerše možných nových markerů KP.
c) Ověření pilotních výsledků v analýze se statisticky významným počtem pacientů a zdravých kontrol.

Sekundárními cíli byly:

a) Prověření alternativní metody stanovení TK1 pomocí monoklonální protilátek specifické pro epitop TK210.
b) Analýza možnosti klinické aplikace výsledků provedením korelací mezi rizikovými faktory pro adjuvantní radioterapii, stadiem onemocnění a hodnotami TK1.
c) Rozšíření počtu alikvotovaných krevních sér a močí pacientů s KP a zdravých kontrol.

5. Metodika

5.1 Charakteristika souboru pacientů a odběru vzorků

Provedli jsme retrospektivní analýzu prospektivně odebraných vzorků séra od 169 pacientů s KP plánovaných k RP v letech 2013-2016. Kontrolní skupinu tvořily odběry séra od 39 zdravých mužů, dobrovolníků, jejichž průměrný věk byl 61 let, bez relevantní urologické a onkologické anamnézy, s negativní kultivací moče, hodnotou PSA pod 2 μg/l a negativním per rektum vyšetřením. Studie byla schválena institucionální etickou komisí. Všichni účastníci podepsali písemný souhlas s odběrem vzorků a zařazením do studie. Základní údaje o pacientech a zdravých kontrolách jsou shrnuty v tabulce 3. Odběry krve jsme provedli všem účastníkům studie nalačno, punkcí z kubity. Pacientům před RP byl odběr proveden v den výkonu. Krev jsme následně centrifugovali po dobu 10 minut při 3 000 otáčkách za minutu (1 450 g). Sérum bylo alikvotováno, okamžitě zmraženo a uchováváno při teplotě –70˚C až do provedení analýzy. Patologické preparáty z radikální prostatektomie vyšetřil specializovaný patolog. Tumory byly klasifikovány podle klasifikace nádorů, uzlin a metastáz (TNM)[14] a dle GS.[123]

Tabulka 3: Charakteristika pacientů a zdravých kontrol

	pacienti = 169	**kontroly = 39**
iPSA; medián (SD; min - max)	9,52 (7,93; 1,77-68,75)	X
iPSA denzita; medián (SD; min - max)	0,26 (0,21; 0,04-1,80)	X
Věk; medián (SD; min - max)	64,93 (6,36; 40,90-79,10)	65,92 (5,44; 55,30-80,10)
Gleasonovo skóre; n (%)		
6	68	X
7	79	X
8 a více	22	X
Stadium; n (%)		
Lokalizovaný (pT2)	110 (65)	X
Lokálně pokročilý	59 (35)	X
Chirurgický okraj; n (%)		
Pozitivní	47 (28)	X
Negativní	122 (72)	X

iPSA – iniciální prostatický specifický antigen; SD – standard deviation (směrodatná odchylka)

5.2 Výběr onkomarkerů a charakteristika metod

V rámci hledání potenciálních markerů KP jsme provedli rešerši dostupné literatury mezi roky 2000 a 2017 věnující se danému tématu s využitím databází PubMed a Scopus. Jako klíčová slova pro hledání jsme zvolili „biomarkers“ či „tumor markers“ a „prostate cancer“. Z možných molekul, souvisejících s KP nebo jinými nádorovými onemocněními, jsme vybrali Annexin, SPINK–1, TIMP, Chromogranin A, Endoglin, Mindin a TK1.

5.2.1 Studie 1: Stanovení annexinu, SPINK–1, TIMP, chromograninu A, endoglinu a TK1

Annexin

Annexiny jsou skupinou strukturně příbuzných proteinů vázajících vápník, které mají doménu vázající se na fosfolipidy a aminoterminální doménu, která určuje jejich specifičnost. Objeveny byly v roce 1978. Podílejí se na regulaci membránového přenosu a buněčné adhezi. Za fyziologických podmínek se v prostatě nenachází, mohou však být exprimovány v jejím epitelu u dobře až nízce diferencovaných tumorů.[124]

Serin proteázový inhibitor Kazal-type 1 (SPINK-1)

Protein SPINK–1 je inhibitor trypsinu, v organismu může fungovat jako autokrinní růstový faktor. Za fyziologických podmínek inhibuje předčasnou aktivaci pankreatických proteáz a hovoří se o něm v souvislosti s hereditárními pankreatitidami. Objeven však byl i v moči pacientek s karcinomem ovaria. V onkologii se s ním setkáváme v rámci downstream signalizace epidermálního růstového faktoru (EGFR).[125] V případě KP byla popsána nadměrná exprese SPINK–1 oproti BHP.[126]

Tkáňový inhibitor metaloproteináz (TIMP–1)

Protein TIMP–1 je jedním ze čtyř přirozeně se vyskytujících inhibitorů matrixových metaloproteináz (MMP), což jsou enzymy, které hrají důležitou roli v normálních fyziologických procesech i v patologických remodelacích tkání. Zde se podílí na štěpení kolagenu bazální membrány, díky čemuž napomáhá invazi tumoru. Rovněž stimuluje jeho růst a inhibuje apoptózu. Těmito mechanismy může být zodpovědný za zahájení metastatického procesu. Rovnováha mezi metaloproteinázami a jejich inhibitory může vést k větší degradační aktivitě a vyšší invazivitě nádorových buněk.[127] Dle klinických studií byly nalezeny zvýšené hladiny TIMP–1 v nádorových tkáních včetně KP.[128]

Chromogranin A

Glykoprotein chromogranin A je hlavní složkou sekrečních granul neuroendokrinních buněk. V neuroendokrinních buňkách reguluje ukládání a sekreci hormonů a neuropeptidů a slouží jako prekurzor biologicky aktivních peptidů. Exprimují ho však i neuroendokrinní tumory.[129] Neuroendokrinní a malobuněčná varianta KP je obtížně zjistitelná a souvisí s horší prognózou.[130]

Endoglin 2

Endoglin 2 je transmembránový receptor s úlohou v modulaci adheze a motility různých typů buněk včetně prostaty. Exprimují jej proliferující buňky hladké svaloviny včetně prostaty, ve zvýšené míře pak při tumorové angiogenezi. Ve studiích byly prokázány zvýšené sérové koncentrace endoglinu u řady onkologických onemocnění, včetně kolorektálního karcinomu, karcinomu plic a prsu. Byla prokázána souvislost mezi vysokými hladinami endoglinu a zvýšenou mortalitou pacientů s KP.[131]

Thymidinkináza 1 (TK1)

Sérová thymidinkináza 1 je biomarker proliferace, v minulosti již opakovaně využit jako diagnostický marker maligních onemocnění. Jedná se o buněčný enzym, který se podílí na

syntéze prekurzorů DNA. Katalyzuje přeměnu thymidinu na deoxythymidinmonofosfát, který je dále fosforylován na deoxythymidindi– a trifosfáty před inkorporací do DNA.[132]

Aktivita TK1 závisí na buněčném cyklu a vykazuje rozdíly u fyziologicky proliferujících a maligních buněk. V normálních buňkách dosahuje aktivita TK1 svého maxima v pozdní G1 fázi / začátkem fáze S (10–20násobné zvýšení) a dramaticky klesá na nedetekovatelnou úroveň na konci M fáze.[133]

U maligních buněk může ale zůstat aktivita TK1 zvýšená i ve fázích G2 a M buněčného cyklu, nejspíše v důsledku narušené regulace transkripce a procesu degradace[134] Vysoké hladiny TK1 byly pozorovány v proliferujících a maligních buňkách.[135]

Koncentrace vybraných biomarkerů byly měřeny u 58 pacientů (průměrný věk 68 let, rozmezí 45–82 let) s klinicky diagnostikovaným KP a u 30 zdravých kontrol (průměrný věk 64 let, rozmezí 55–78 let), bez relevantní urologické anamnézy a s normální hladinou PSA. V souboru pacientů a kontrol byly stanoveny koncentrace chromograninu A, TK1 a SPINK–1, endoglinu, annexinu a TIMP–1 v moči metodou ELISA. Charakteristiku metod uvádíme v tabulce 4.

Tabulka 4: Charakteristika metod

Biomarker	*Vyšetřovaný materiál*	*Metoda*	*Výrobce kitu*	*detekční limit*	*pracovní rozsah*	*střední variační koeficient*
chromogranin A	sérum	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp. (USA)	13,70 pg/ml	31,20 – 2000 pg/ml	10–12 %
SPINK-1	moč	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp. (USA)	0,61 ng/ml	1,56 – 100,0 ng/ml	10–12 %
endoglin	moč, sérum	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp. (USA)	0,06 ng/ml	0,156– 10,00 ng/ml	10–12 %
thymidinkináza 1	sérum	sendvičová ELISA	LSBio, Inc. (USA)	0,06 pmol/l	0,063 - 4,00 pmol/l	5,3 – 8,6 %
annexin	moč	sendvičová ELISA	Cloud-Clone Corp. (USA)	0,05 ng/ml	0,16 – 10,00 ng/ml	10–12 %
TIMP-1	moč, sérum	sendvičová ELISA	RayBiotech (Velká Británie)	24,69 pg/ml	24,69 – 18 000 pg/ml	10–12 %

SPINK–1 – serin proteázový inhibitor Kazal–type 1; TIMP – tkáňový inhibitor metaloproteináz

5.2.2 Studie 2: Stanovení mindinu

Mindin (spondin–2, M–spondin)

Mindin je protein secernovaný extracelulární matrix, spadá do rodiny F–spondinů. Jeho regulaci zprostředkovává exprese regulačního proteinu Early Growth Response 1 (EGR–1). Vztah mezi expresí EGR–1 a KP byl experimentálně prokázán. U pacientů s klinicky prokázaným KP je EGR–1 downregulován.[136] Koncentrace mindinu jsme měřili u 56 pacientů (průměrný věk 68 let, rozmezí 45–82 let) s klinicky diagnostikovaným KP a u 29 zdravých kontrol (průměrný věk 64 let, rozmezí 55–78 let), bez relevantní urologické anamnézy a s normální hladinou PSA.

Vyšetřovaným materiálem bylo krevní sérum, použili jsme metodu sendvičová ELISA. Využili jsme komerčně dostupný kit výrobce Cusabio, Čína. Analytické parametry kitu: detekční limit 0,78 ng/ml, pracovní rozsah 3,12–200,00 ng/ml, střední variační koeficient (CV) 11 %.

5.2.3 Studie 3: Stanovení thymidinkinázy 1 (TK1) – rozšířená studie

Sérové koncentrace biomarkeru TK1 jsme měřili u 169 pacientů (průměrný věk 62 let, rozmezí 45–82 let) s klinicky diagnostikovaným KP a u 39 zdravých kontrol (průměrný věk 61 let, rozmezí 54–78 let), bez relevantní urologické anamnézy a s normální hladinou PSA.

Vyšetřovaným materiálem bylo krevní sérum, použili jsme metodu sendvičová ELISA. Využili jsme komerčně dostupný kit výrobce LSBio, Inc., USA. Analytické parametry kitu: detekční limit 0,063 pmol/l, pracovní rozsah 0,063 - 4,000 pmol/l, CV 5,3 – 8,6 %.

5.2.4 Studie 4: Stanovení epitopu TK210 u thymidinkinázy 1 (TK1)

Stanovení epitopu TK210 je novou alternativní metodou stanovení TK1. V séru existuje několik forem TK1 s různými molekulovými hmotnostmi a enzymovými aktivitami, což vede k potenciálnímu podhodnocení enzymové aktivity TK1. Velká část sérové TK1 může být u pacientů se solidními tumory enzymaticky deaktivována a nalezena jako multimerní

agregáty. Epitop TK210 však exprimují všechny formy TK1. Tato nová metoda využívá monoklonální protilátky specifické pro epitop TK210, které dle výrobce zlepšují citlivost a specifitu stanovení.[137]

Sérové koncentrace biomarkeru TK-1 jsme měřili u 126 pacientů (průměrný věk 70 let, rozmezí 46–85 let) s klinicky diagnostikovaným KP a u 49 zdravých kontrol (průměrný věk 63 let, rozmezí 54–78 let), bez relevantní urologické anamnézy a s normální hladinou PSA.

Vyšetřovaným materiálem bylo krevní sérum, použili jsme metodu sendvičová ELISA s preinkubací. Využili jsme komerčně dostupný kit výrobce AroCell, Švédsko. Analytické parametry kitu: detekční limit 0,12 ng/ml, pracovní rozsah 0,12 – 20,00 ng/ml a CV 0,9 -5,1 %.

5.3 Statistické metody

Statistická analýza dat byla provedena užitím software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Pro měřené parametry byly počítány základní statistické údaje jako průměr, směrodatná odchylka, rozptyl, medián, mezikvartilové rozpětí, minimum, maximum. U kategorických proměnných byly zkoumány jejich absolutní a relativní četnosti.

Na porovnání distribucí zkoumaných parametrů mezi testovanými skupinami jsme použili neparametrické testy (Wilcoxonův dvouvýběrový test a jeho zobecněná varianta, tzv. Kruskal–Wallist test). Shodu věku mezi zkoumanými skupinami jsme testovali pomocí Two One Sample Test (TOST). Vztahy mezi parametry jsme zkoumali pomocí Spearmanova korelačního koeficientu a graficky byly vyjádřili pomocí lineární regrese.

Statistická významnost byla stanovena na hranici alpha = 5 %.

6. Výsledky

6.1 Studie 1 – Stanovení annexinu, SPINK–1, TIMP, chromograninu A, endoglinu a TK1

V rámci studie 1 jsme měřili koncentrace analytů annexinu, SPINK–1, TIMP, chromograninu A, endoglinu a TK. Koncentrace zmíněných analytů jsou uvedeny v tabulce 3. Signifikantní rozdíly byly nalezeny v sérových koncentraci TK1. Vzhledem k signifikantně vyšším měřeným hodnotám u TK1 jsme výsledky ověřili ve studii 3 na výrazně větším množství pacientů. Výsledky měřených analytů shrnuty jsou v tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky annexin, SPINK–1, TIMP, chromogranin A, endoglin, TK1

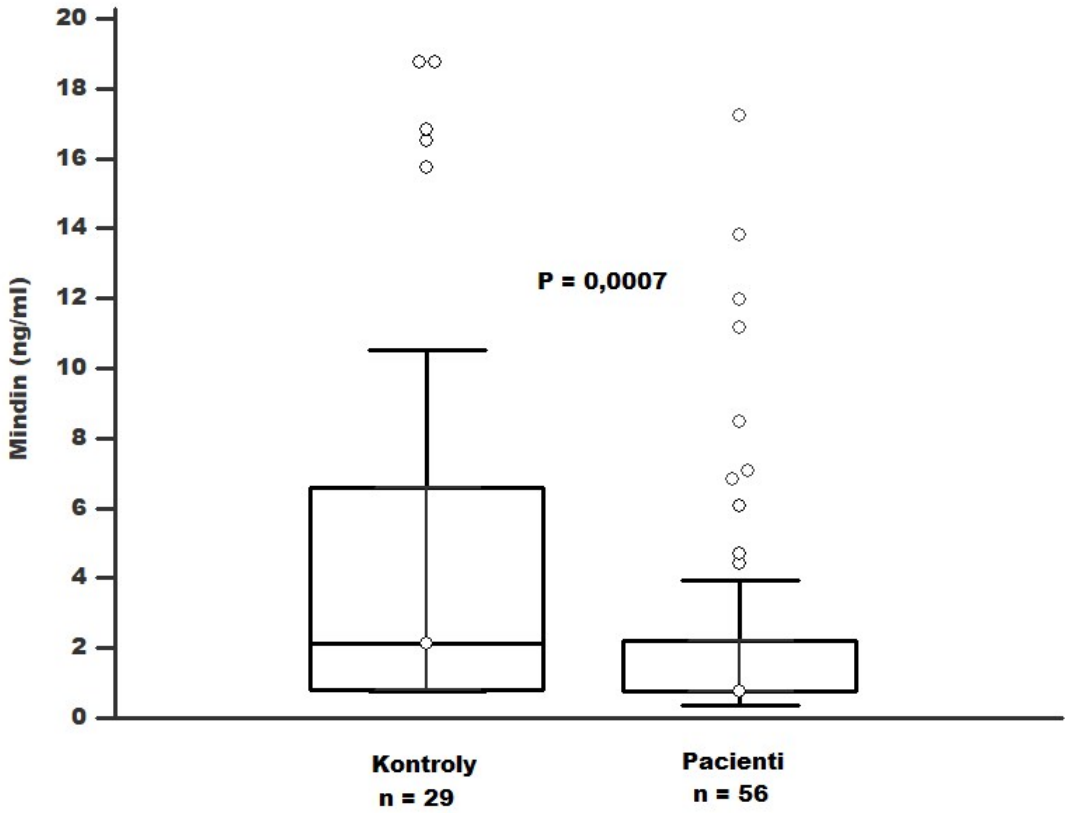
Biomarker	*Kontrolní skupina (n = 30)*	*Pacienti (n = 58)*	*P value*	*AUC*
S-chromogranin; pg/ml ± SD	114,50 ± 41,32	83,88 ± 88,61	0,16	0,59
U-SPINK-1; ng/ml ± SD	1,55 ± 1,72	1,59 ± 2,71	0,66	0,53
U-endoglin; ng/l ± SD	0,40 ± 0,27	0,38 ± 0,45	0,87	0,51
S-endoglin; ng/ml ± SD	0,84 ± 0,42	0,78 ± 0,32	0,91	0,51
U-annexin; ng/ml ± SD	0,18 l ± 1,30	0,18 ± 0,60	0,84	0,51
U-TIMP-1; pg/ml ± SD	13,13 ± 197,40	7,750 ± 87	0,19	0,55
S-TIMP-1; µg/l ± SD	16,90 ± 1,81	17,78 ± 2,46	0,21	0,62
S-TK1; pmol/l ± SD	0,07 ± 0,06	0,20 ± 0,042	< 0,01*	0,79

SPINK–1 – serin proteázový inhibitor Kazal–type 1; TIMP – tkáňový inhibitor metaloproteináz, TK1 – thimidinkináza 1; AUC – plocha pod křivkou; SD – standard deviation (směrodatná odchylka)

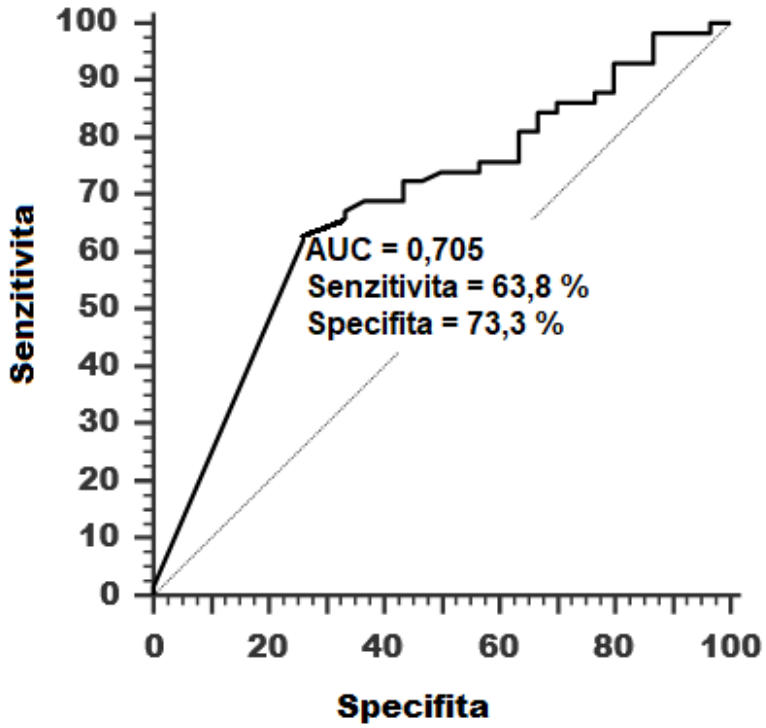
*** statisticky významný rozdíl**

6.2 Studie 2 – Stanovení mindinu

V dalším měření jsme se zaměřili mindin. Jeho sérové hodnoty byly u pacientů s KP signifikantně nižší než u zdravých kontrol (2,12 ng/ml vs. 0,78 ng/ml, p = 0,0007, obrázek 4). Dále jsme jeho diagnostickou účinnost vyjádřili pomocí Receiver Operating Characteristic (ROC) analýzy, kde vypočtená AUC byla 0,71, specificita 73 % a senzitivita 64 % (Obrázek 5).



Obrázek 4: Distribuce hodnot Mindinu v souboru pacientů s karcinomem prostaty a u zdravých kontrol

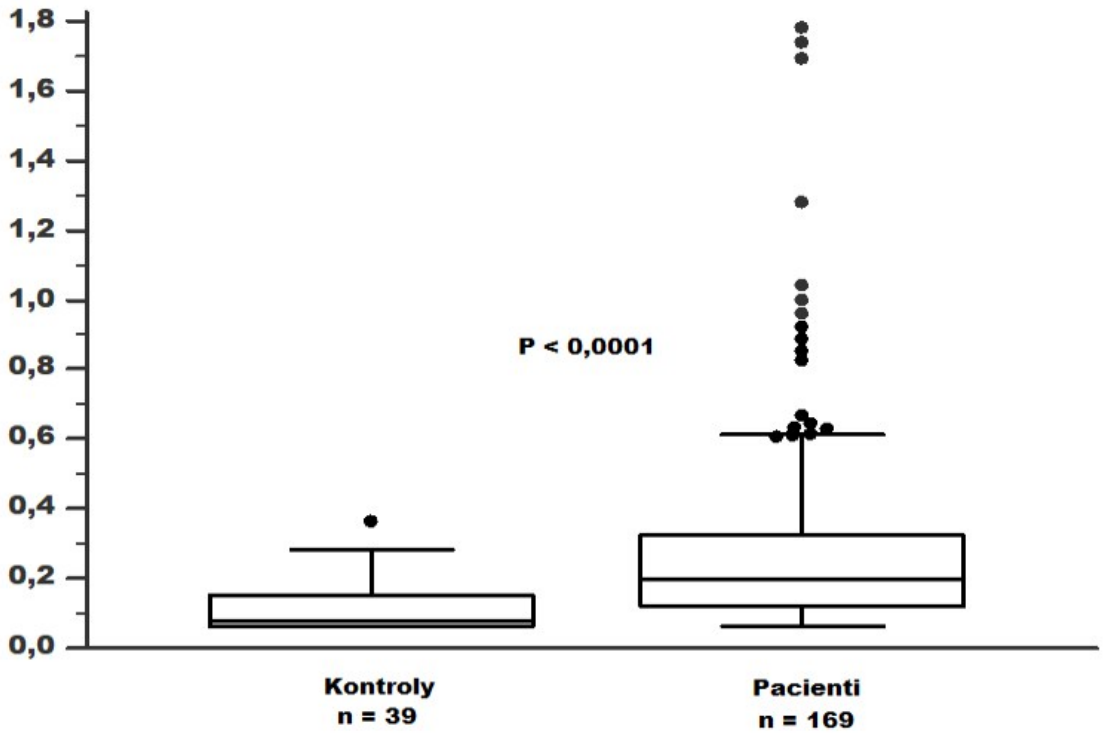


Obrázek 5: Diagnostická účinnost Mindinu

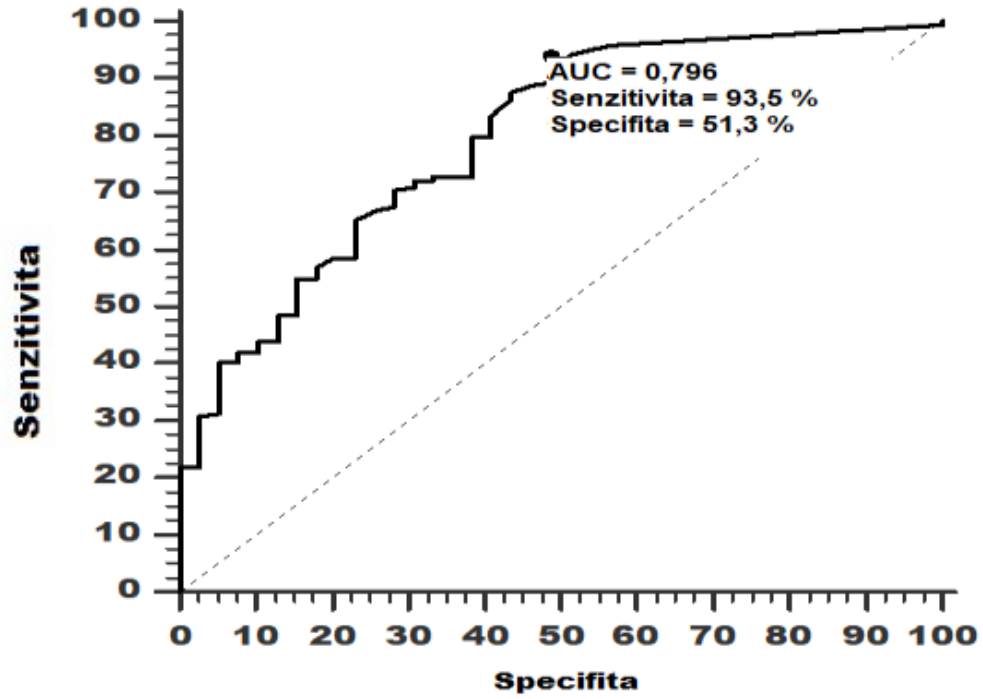
AUC – plocha pod křivkou

6.3 Studie 3 – Stanovení TK1 – rozšířená studie

V třetí studii jsme rozšířili počet pacientů i kontrol a zaměřili se na analyt s nejpřesvědčivějšími výsledky, tedy TK1. Potvrdili jsme signifikantně vyšší hodnoty TK1 u pacientů s KP, viz obrázek 6. Medián sérových hladin TK1 byl stanoven na 0,289 pmol/l (směrodatná odchylka – standard deviation [SD] 0,289; 95 % konfidenční interval [CI] 0,062–1,780), oproti tomu u zdravých kontrol na 0,012 pmol/l (SD 0,074; 95 % CI 0,063–0,364); p<0.001. Dále jsme zhodnotili TK1 denzitu, medián 0,825 (SD 0,902; 95 % CI 0,066–6,538). Diagnostická účinnost TK1 vyjádřená jako AUC byla 0,796 (specificita = 51,3 % a senzitivita = 93,5 %) viz Obrázek 7.



Obrázek 6: Distribuce hodnot Thymidinkinázy 1 v souboru pacientů s karcinomem prostaty a u zdravých kontrol (pmol/l)



Obrázek 7: Diagnostická účinnost Thymidinkinázy 1

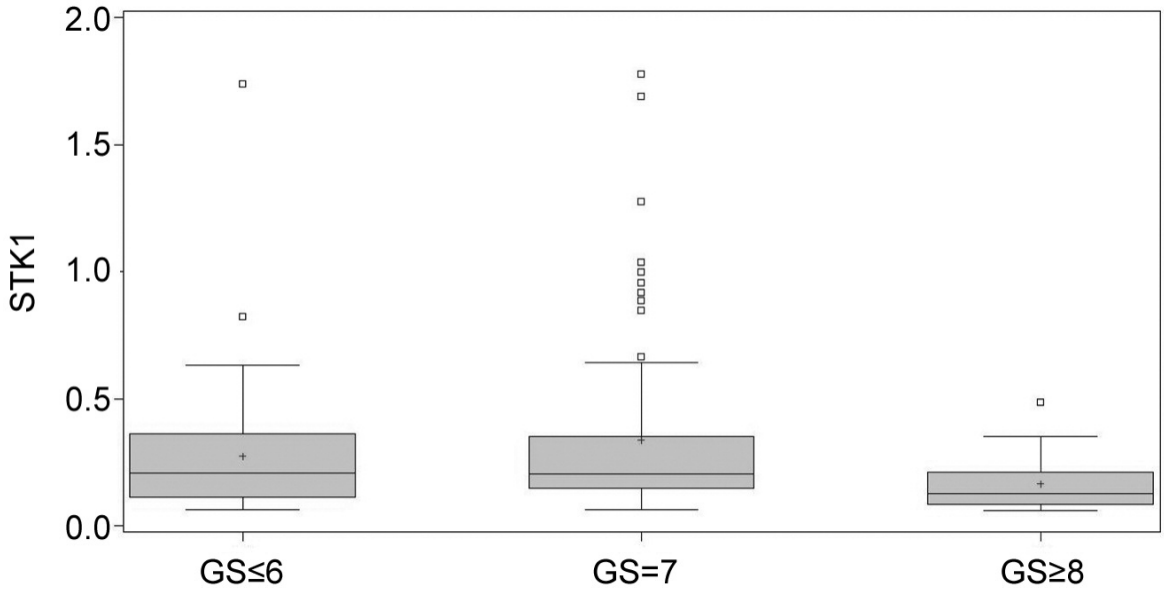
AUC – plocha pod křivkou

Při porovnání pacientů s GS ≤6 vs. 7 vs. ≥8 (p=0,010) jsme nalezli statisticky významné rozdíly (Obrázek 8), stejného výsledku jsme však nedosáhli při srovnání pacientů s GS ≤6 vs. ≥7 (p=1,000). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. Staging neprokázal žádný signifikantní rozdíl při porovnání stadií pT2 vs. pT3a vs. pT3b (p=0,989), ani při porovnání stadií pT2 vs. pT3a+pT3b (p=1,0) (tabulka 6).

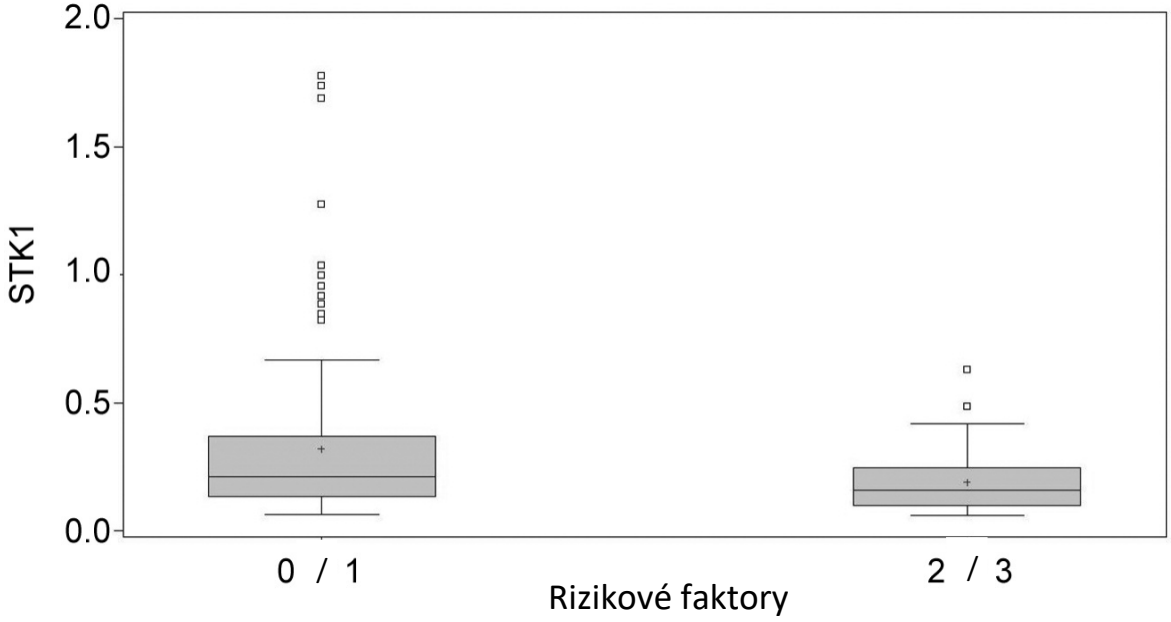
V rámci korelace hodnot TK1 a rizikových faktorů pro adjuvantní radioterapii (aRT), definovanými jako GS 8–10, pT3 a pozitivní chirurgický okraj, jsme zjistili signifikantní rozdíl, p=0,021 (obrázek 10). Nejnižší hladiny TK1 byly u pacientů se všemi třemi rizikovými faktory.

Rozdíl mezi pacienty bez rizikových faktorů a těmi s alespoň jedním rizikovým faktorem nebyl signifikantní (p=0,579). Statisticky významně nižší hladiny STK1 jsme zjistili při porovnání pacientů s žádným nebo jedním a pacientů s dvěma nebo třemi rizikovými faktory (p=0,009) (obrázek 9). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.

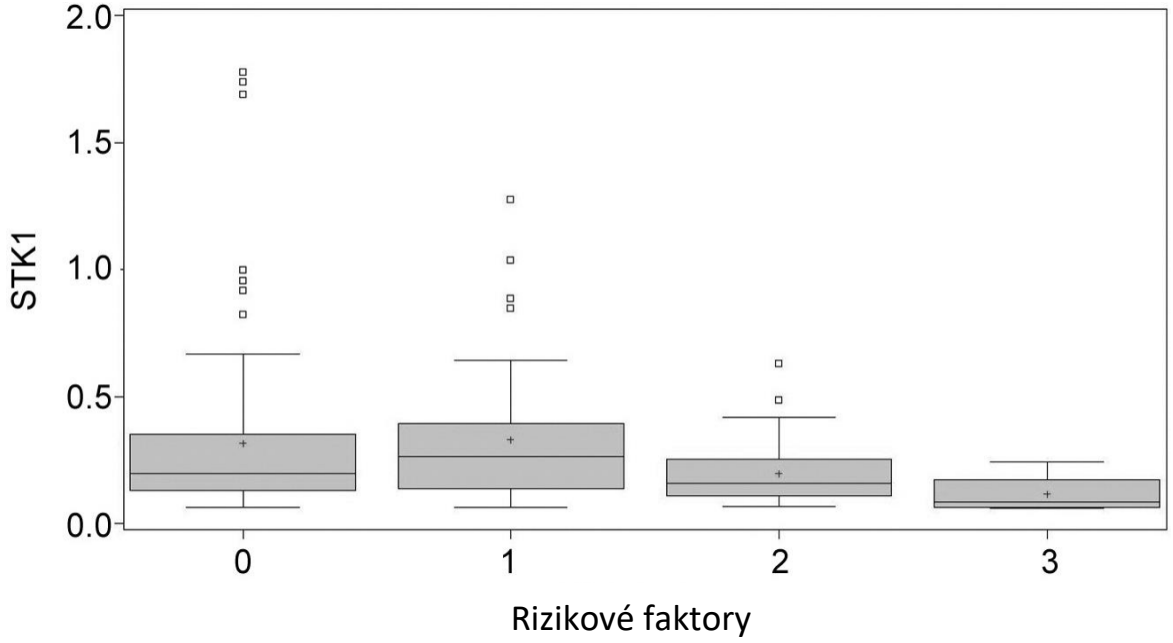
Korelace mezi STK1 a PSA denzitou, hodnotou PSA v době diagnózy ani PHI, či velikostí prostaty měřené pomocí TRUS se statisticky významně nelišily.



Obrázek 8: Korelace mezi Gleasonovým skóre (GS) a sérovou hladinou Thymidinkinázy 1 (STK1) (pmol/l)



Obrázek 9: Korelace mezi počtem rizikových faktorů pro adjuvantní radioterapii (Gleasonovo skóre 8-10, pT3, pozitivní chirurgický okraj) a sérovou hladinou Thymidinkinázy 1 (STK1) (pmol/l)



Obrázek 10: Korelace mezi počtem rizikových faktorů pro adjuvantní radioterapii (Gleasonovo skóre 8-10, pT3, pozitivní chirurgický okraj) a sérovou hladinou Thymidinkinázy 1 (STK1) (pmol/l)

Tabulka 6: Korelace mezi stagingem a hladinami sérové thymidinkinázy 1

Parametr	TK1, pmol / l; medián (SD; min – max)	P-hodnota
GS ≤6	0,210 (0,250; 0,063–1,740)	0,098
GS 7	0,204 (0,340; 0,062 – 1,780)	
GS ≥ 8	0,127 (0,111; 0,062 – 0,490)	
GS ≤6	0,210 (0,250; 0,063 – 1,740)	1,000
GS ≥ 7	0,193 (0,310; 0,062 – 1,780)	
pT2	0,594 (0,862; 0,066-5,235)	0,989
pT3a	0,531 (1,121; 0,134-6,538)	
pT3b	0,715 (0,467; 0,170-1,633)	
pT2	0,594 (0,862; 0,066-5,235)	1,000
pT3a + pT3b	0,535 (0,985; 0,134-6,538)	

TK1 - sérová thymidinkináza 1; SD – standard deviation (směrodatná odchylka); GS - Gleasonovo skóre

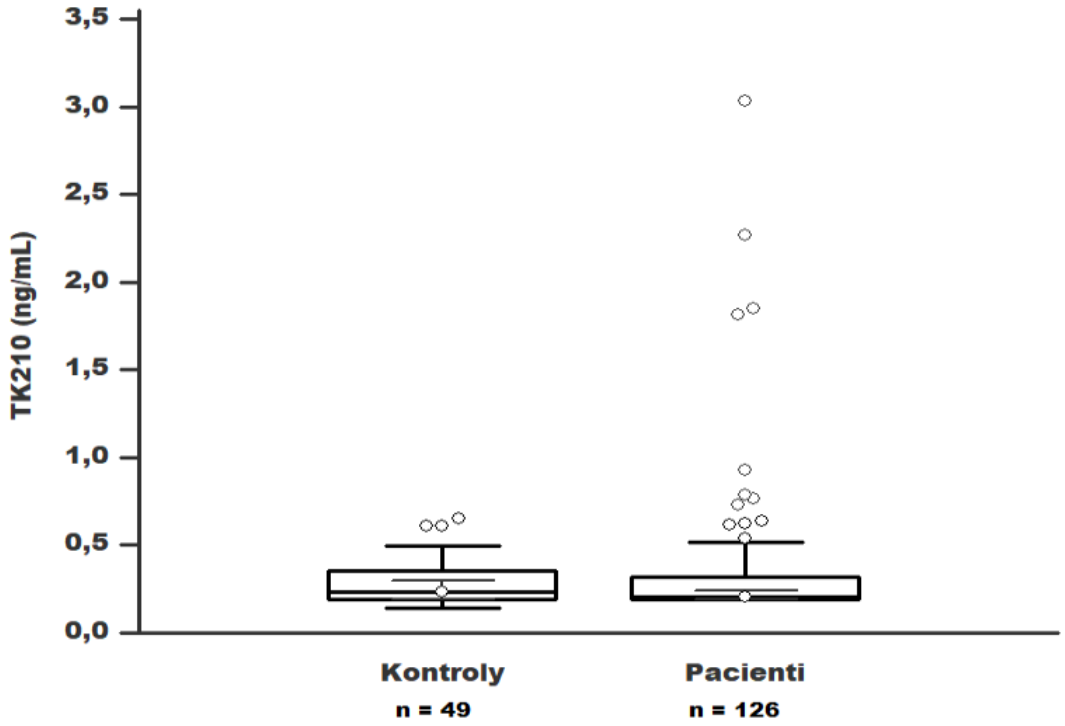
Tabulka 7: Korelace mezi rizikovými faktory pro adjuvantní radioterapii (GS 8–10, pT3, pozitivní chirurgický okraj) a hladinami sérové thymidinkinázy 1

Rizikový faktor	TK1, pmol / l; medián (SD; min - max)	P-hodnota
0	0,196 (0,342; 0,063-1,780)	0,021
1	0,265 (0,271; 0,063-1,278)	
2	0,160 (0,124; 0,067-0,634)	
3	0,084 (0,085; 0,062-0,243)	
0	0,196 (0,342; 0,063-1,780)	0,579
1 nebo 2 nebo 3	0,191 (0,224; 0,062-1,278)	
0	0,196 (0,342; 0,063-1,780)	0,792
2 nebo 3	0,195 (0,226; 0,063-1,278)	
0 nebo 1	0,210 (0,319; 0,063-1,780)	0,009
2 nebo 3	0,158 (0,122; 0,062-0,634)	

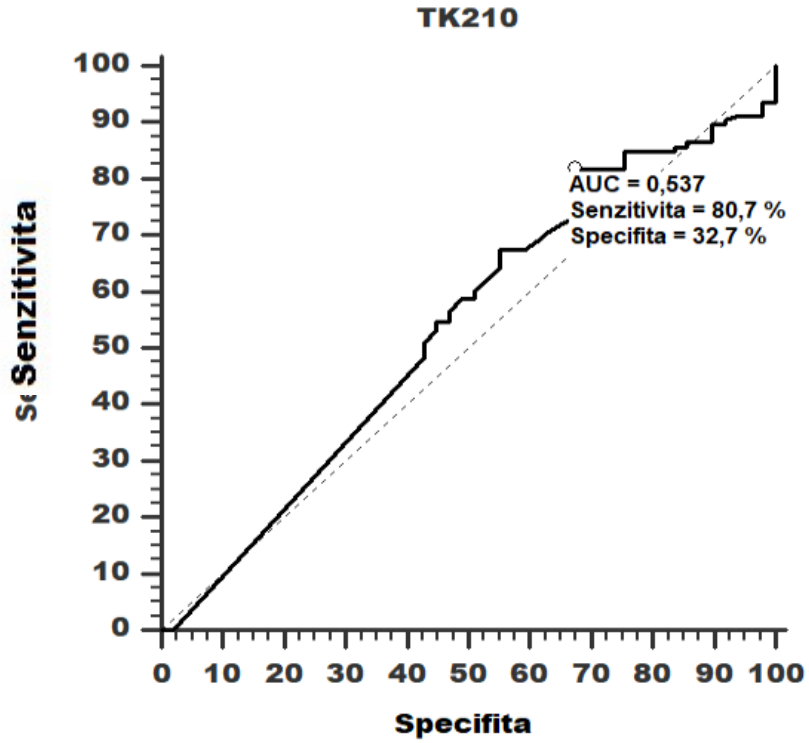
TK1 – sérová thymidinkináza 1; SD – standard deviation (směrodatná odchylka); GS – Gleasonovo skóre

6.4 Studie 4 – stanovení epitopu TK210

Stejně jako u TK1 jsme i u thymidinkinázy epitopu TK210 prokázali zvýšené hodnoty u KP oproti zdravým kontrolám, konkrétně 0,292 ng/mL vs. 0,246 ng/mL, p = 0,6109 (obrázek 11). Dle ROC analýzy byla diagnostická účinnost epitopu TK210 vypočtena jako AUC 0,54 (specificita = 80,7 % a senzitivita = 32,7 %) (obrázek 12).



Obrázek 11: Distribuce hodnot TK210 v souboru pacientů s karcinomem prostaty a u zdravých kontrol



Obrázek 12: Diagnostická účinnost TK210

AUC – plocha pod křivkou

7. Diskuse

Karcinom prostaty je velmi časté onkologické onemocnění, a proto na výzkum nových biomarkerů klademe velký důraz. V tomto textu jsme zdůraznili nedávné pokroky a objevy mezi biomarkery KP.

V posledních letech bylo nalezeno nepřeberné množství nových nadějných markerů KP. I přes euforii vzniklou z těchto poznatků je třeba podotknout, že většina výstupů se zakládá na relativně malých kohortách pacientů a na retrospektivních studiích.

Naprostá většina současných studií, především ty zaměřující se na predikci onemocnění a volbu pacientů k BP, nebere rovněž do úvahy výrazný pokrok v zobrazovacích vyšetřeních, především multiparametrické magnetické rezonanci a PSMA–PET/CT.

Nové biomarkery napomáhají rozlišení mezi agresivní a neagresivní formou KP a k přesnější diagnostice klinicky významného KP. Předpokladem pro zavedení nového markeru do klinické praxe bude kromě jeho efektivity především finanční náročnost, zohlednění invazivity a replikovatelnost metody.

Vzhledem k heterogenitě tohoto onemocnění mohou studie o malém počtu pacientů přinášet nepřesné závěry. Zároveň neexistují ani prospektivní studie srovnávající jednotlivé biomarkery. Další výzkum by měl zohlednit finanční zátěž nových biomarkerů a zda se s jejich pomocí můžeme klinicky řídit, zvolit správného pacienta k biopsii, respektive u prognostických biomarkerů k další léčbě. Ideální marker nemáme ani u aktivního sledování nízkorizikových KP.

V budoucnu se pravděpodobně setkáme s využitím výpočtu z více markerů dohromady, případně dalších klinických dat, jak můžeme vidět i u biomarkerů uvedených výše v textu. Prospektivní multicentrické studie prokázaly užitečnost PHI, 4K a PCA3 skóre ve snížení počtu zbytečných BP u mužů testovaných na PSA a všechny tyto markery byly doporučeny v EAU Guidelines.

Budoucnost biomarkerů je nutno chápat nejen ve zlepšení záchytu všech stadií KP, ale především záchytu signifikantního, potenciálně život ohrožujícího onemocnění a jeho následné odpovídající léčby. Markery nám mohou napomoci v diagnostice a následně i monitoraci léčby, jejího načasování a zvýšení efektivity.

Pro lepšímu uplatnění nových biomarkerů KP jsou nutné další studie, ale dostupné, výše citované publikace ukazují slibné výsledky pro detekci onemocnění i pro rozlišení pacientů s agresivním a neagresivním KP.

V rámci našeho výzkumu jsme provedli rešerši aktuálně zkoumaných markerů pro KP i jiná onkologická onemocnění a vybrali spektrum možných molekul, které by bylo možné měřit z krevního séra užitím metody ELISA a komerčně dostupných ELISA kitů. Konkrétně jsme zvolili annexin, SPINK-1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin a TK1. Všechny tyto markery se ukázaly jako vhodné doplňkové markery pro KP v předchozích studiích. Nejpřesvědčivější výsledky z výše zmíněných vykazoval mindin a především TK1.

Jako metodu volby jsme zvolili imunochemickou analýzu, konkrétně sendvičovou ELISA, jako zástupce neizotopových nekompetitivních metod. Moderní imunoanalýzy jsou jednoduché a plně automatizované. Vykazují vysokou citlivost, přesnost a extrémně nízké detekční limity – viz kapitola 3. Onkomarkery jsou obecně zastoupeny v krevním séru v nízkých koncentracích, proto jsme pro jejich analýzu zvolili právě tuto metodu. K měření jsme využili komerčně dostupné kity, viz kapitola 5.2 pro jejich spolehlivost a snadnou detekci, respektive i replikovatelnost zvolené metody.

V první analýze jsme na základě analýzy ROC posoudili diagnostickou účinnost biomarkerů ve vztahu ke KP. I přes nadějné výsledky ve studované literatuře se ve sledovaném souboru pacientů signifikantní účinnost u měřených markerů (všechny zvolené krom mindinu) nepotvrdila, s výjimkou TK1. Thymidinkináza vykazovala naopak velmi nadějné výsledky s hodnotou AUC 0,79 – tedy nový biomarker by byl teoreticky schopen správně rozpoznat až 79 % pacientů s KP.

Hodnoty AUC pro ostatní biomarkery byly nižší, a to od 0,51 pro endoglin 2 do 0,62 pro TIMP−1, viz tabulka 4 v kapitole č.6. Nepodařilo se nám tedy zopakovat předchozí experimenty. Nízké hodnoty AUC pro ostatní biomarkery mohou být dány náhodným výběrem pacientů s různě závažnými formami onemocnění. Je tedy třeba provést další studie s větším souborem pacientů k přesnějšímu posouzení diagnostické účinnosti zvolených biomarkerů. Výsledky analýzy TK1 jsme publikovali v zahraničním impaktovaném časopise.[138]

Druhá analýza se věnovala stanovení hodnot mindinu v obdobném souboru pacientů s KP. Hladiny mindinu v krevním séru byly signifikantně sníženy u pacientů s KP oproti zdravým kontrolám. Tímto závěrem jsme nepotvrdili některé z předchozích studii, které naopak prezentovaly zvýšené hladiny mindinu u KP.[139, 140]

Naše výsledky však souhlasí s publikovanou studií Wanga et al., zaměřenou na karcinom kolorekta, plic, žaludku, jícnu a prsu, kde byly hodnoty mindinu ve shodě s naším nálezem signifikantně sníženy.[141] Autoři dále uvádějí významnou roli regulačního proteinu EGR–1, který má zásadní význam v regulaci exprese mindinu na transkripční úrovni.

Obdobné výsledky byly navíc publikovány i přímo u KP skupinou Jokerse et al., kde se autorům podařilo prokázat snížené hodnoty u KP oproti BHP a pacientům po RP.[142] Autory změřené hodnoty diagnostické účinnosti mindinu (AUC = 0,760; P <0,0001) byly srovnatelné s naší analýzou (AUC = 0,705; P = 0,0007).

Změřená hladina mindinu v séru nekorelovala s koncentrací PSA, byla však prokázána souvislost s věkem pacientů (p = 0,014). Podobně jako u TK1 byl nalezen signifikantní rozdíl v koncentracích mindinu v závislosti na stagingu dle TNM klasifikace. (p = 0,015 a p = 0,019). Kompletní výsledky analýzy mindinu jsme publikovali v zahraničním impaktovaném časopise.[143] Naše výsledky poukazují na možné využití mindinu jako doplňkového markeru KP, nicméně obdobně jako u TK1 je třeba provést další studie s větším souborem pacientů k přesnějšímu posouzení jeho diagnostické účinnosti.

V třetí analýze jsme srovnávali sérové hladiny TK1 u pacientů s KP, opětovně pomocí metody ELISA s využitím komerčně dostupného kitu. Podařilo se nám ale rozšířit soubor pacientů, respektive kontrol na 169, respektive 39 pacientů, a v tomto souboru dále potvrdit a upřesnit předchozí výsledky pilotního pokusu.

Prokázali jsme významně vyšší koncentrace TK1 u pacientů než u kontrolní skupiny (medián 0,0116 pmol/l vs. 0,2890 pmol/l; p <0,001). Výsledky studie potvrzují naši hypotézu, že vyšší hodnoty TK1 souvisejí s diagnózou KP.

Prezentované výsledky jsou v souladu se studií autorů Li et al., kteří prokázali signifikantně vyšší koncentrace TK1 u pacientů s KP v porovnání s pacienty s BHP a zdravými jedinci.[144] Koncentrace TK1 korelovaly rovněž s GS, kdežto hodnoty PSA nikoli.

Žádnou spojitost mezi koncentrací TK1 a celkovým PSA autoři nenalezli. Naše výsledky rovněž poukazují na souvislost mezi koncentrací TK1 a gradingu KP dle GS.

Lundgren et al. měřili hodnoty TK1 u 36 pacientů, kteří zemřeli na KP a u 294 náhodně vybraných zdravých mužů. Autoři prokázali, že vysoká hladina TK1 může předpovídat úmrtí v souvislosti s KP za 30 let.[145]

Další studie pod vedením Jagarlamudiho srovnávala aktivitu TK1 v séru a jeho koncentraci u pacientů s KP (n=47) s hodnotami u zdravých dárců krve. Výsledky ukázaly, že koncentrace TK1 i její aktivita se významně lišily mezi pacienty s KP a zdravými jedinci.[132]

V naší studii jsme měřili hladinu TK1 u vyššího počtu pacientů s KP než v předchozích studiích. Na rozdíl od předchozích prací jsme zohlednili rovněž rizikové faktory pro aRT po RP (GS 8–10, pT3, pozitivní chirurgický okraj). Tyto mohou být cennou prediktivní kombinací parametrů s klinickým přínosem. Mohli bychom tak přesněji informovat o riziku následné RT po operaci. Naše výsledky potvrzují, že hladiny TK1 jsou významně vyšší u pacientů s KP než u zdravých kontrol. Hodnoty TK1 navíc dle našich výsledků korelují s hodnotami GS a řadou předem definovaných rizikových faktorů pro aRT. TK1 je proto slibným nádorovým markerem KP.

Limitací této části naší práce je, že se nejedná o klinickou studii v pravém slova smyslu, vycházeli jsme spíše z údajů shromážděných během běžné praxe, což může omezovat spolehlivost vyvozených závěrů. Závěry jsme prezentovali v zahraničním impaktovaném periodiku.[146]

Závěrečná, čtvrtá analýza, byla věnována opět TK1, respektive stanovení alternativního epitopu TK210. Dle dostupné literatury je pravděpodobné, že stanovení epitopu TK210 vykazuje vyšší specificitu oproti pouhému změření koncentrace TK1. Naše analýza však tyto výsledky nepotvrdila.

Jagarlamudi et al. ve své práci uvádějí u TK210 hodnotu AUC = 0,67. Dále pak ve spojení s PHI dokonce hodnotu 0,78.[137] V našem měření jsme stanovili pro TK210 výrazně nižší hodnotu AUC = 0,54 a předchozí výsledky nepotvrdili. Hodnoty PHI byly dostupné u pacientů KP, ale ne u kontrolní skupiny. Rozdílné výsledky mohou souviset s rozdílným souborem pacientů v obou studiích.

8. Závěr

I když PSA pravděpodobně zůstane nejpoužívanějším nádorovým markerem KP i v blízké budoucnosti, bude potřeba i dalších diagnostických metod, ať už jednotlivých markerů a jejich kombinací, nomogramů či zobrazovacích metod, zejména z důvodu nedostatečné senzitivity a specificity testu PSA. Potenciální nový marker musí splňovat několik kritérií, mezi nimi například nákladovou efektivitu nebo minimální invazivitu pro pacienta.

V rámci našeho výzkumu jsme provedli rešerši aktuálně zkoumaných markerů KP i jiných onkologických onemocnění a vybrali spektrum možných markerů, které by bylo možné měřit z krevního séra užitím metody ELISA a komerčně dostupných ELISA kitů. Konkrétně jsme zvolili annexin, SPINK–1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin a TK1. Nejpřesvědčivější výsledky z výše zmíněných vykazoval mindin a především TK1.

Moderní imunoanalytické metody jsou jednoduché, snadno proveditelné, relativně finančně dostupné a plně automatizovatelné. Vynikají vysokou citlivostí a přesností s extrémně nízkými detekčními limity. To umožňuje jejich využití pro rutinní analýzy látek s velmi nízkou koncentrací, např. studovaných nádorových markerů.[114]

Námi studované molekuly, a především TK1, mají potenciál výrazně zlepšit diagnostiku KP, samostatně anebo v kombinaci s dalšími markery. Nalezli jsme významné rozdíly v hladině TK1 u pacientů s KP a další progresí s vyšší agresivitou onemocnění. Stanovení hladiny TK1 rovněž dle našich výsledků upřesňuje predikci možné adjuvantní RT po RP.

9. Souhrn

Karcinom prostaty (KP) je velmi časté onkologické onemocnění. V posledních letech bylo nalezeno velké množství nových, nadějných markerů KP v séru, moči i v tkáni. Nové biomarkery napomáhají rozlišení mezi agresivní a neagresivní formou KP a přesnější diagnostice klinicky významného KP. Předpokladem pro zavedení nového markeru do klinické praxe je kromě jeho diagnostické přesnosti především nízká finanční a technická náročnost a minimální invazivita metody. Právě z těchto důvodů zůstávají nadále nejvíce využívanými sérové onkomarkery KP, nejvíce PSA. Budoucnost biomarkerů je nutno chápat nejen ve zlepšení záchytu všech stadií KP, ale především v záchytu signifikantního, potenciálně život ohrožujícího onemocnění a jeho následné odpovídající léčbě. Markery nám mohou napomoci v diagnostice a následně i monitoraci léčby, jejího načasování a efektivity.

V rámci našeho výzkumu jsme se zaměřili na sérové molekuly s potenciálem v diagnostice KP. Provedli jsme analýzy séra až u 169 pacientů a 39 zdravých kontrol u molekul annexin, SPINK–1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin a TK1. Nejpřesvědčivější výsledky z výše zmíněných vykazoval mindin a především TK1.

Analýzu TK1 jsme dále rozšířili o epitop TK210, kde jsme nepotvrdili předchozí závěry zahraničních studií. Naopak se však podařilo potvrdit výsledky analýzy TK1 na větším souboru pacientů než u zahraničních pracích.

Na rozdíl od jiných analýz jsme zohlednili rovněž rizikové faktory pro adjuvantní radioterapii (RT) po radikální prostatektomii (GS 8–10, pT3, pozitivní chirurgický okraj). Tyto mohou být cennou prediktivní kombinací parametrů s klinickým přínosem. Hodnoty TK1 dle našich výsledků korelují s hodnotami GS i rizikovými faktory pro adjuvantní RT. TK1 je proto slibným nádorovým markerem KP.

10. Summary

Prostate cancer (PC) is one of the most diagnosed oncological diseases. In recent years, a large number of promising new markers of PC have been found in serum, urine and tissue. The new biomarkers help to distinguish between aggressive and non-aggressive forms of PC and to diagnose clinically significant PC more accurately. The prerequisites for the introduction of a new marker into clinical practice, besides its diagnostic accuracy, are mainly the low financial and technical requirements and minimal invasiveness of the method. It is for these reasons that serum oncomarkers of PC remain the most widely used, most notably PSA. The future of biomarkers should be understood not only in improving the detection of all stages of PC, but especially in the detection of significant, potentially life-threatening disease and its subsequent appropriate treatment. Markers can help us in the diagnosis and monitoring of treatment, its timing and effectiveness.

In our research, we focused on serum molecules with potential in the diagnosis of PC. We analyzed serum samples from up to 169 patients and 39 healthy controls for annexin, SPINK-1, TIMP, chromogranin A, endoglin, mindin and TK1. Mindin and especially TK1 showed the most convincing results among the above-mentioned molecules.

We further extended the analysis of TK1 to include the TK210 epitope, where we did not confirm previous findings of foreign studies. On the other hand, we were able to confirm the results of TK1 analysis in a larger cohort of patients than in the foreign studies.

Unlike other analyses, we also considered risk factors for adjuvant radiotherapy (RT) after radical prostatectomy (GS 8-10, pT3, positive surgical margin). These may be a valuable predictive combination of parameters with clinical benefit. According to our results, TK1 values correlate with GS values and risk factors for adjuvant RT. Therefore, TK1 is a promising tumor marker of PC.

11. Seznam publikací autora

Řezáč J, Čapoun O, Katolická J, Soukup V. Přehled sérových markerů karcinomu prostaty. Onkologická revue, 2/2023

Rezac J, Hanouskova L, Vesely S, Kotaska K, Kantorova A, Linhartova A, Fiala V, Soukup V, Capoun O. Serum Thymidine Kinase 1 - Potential Prostate Cancer Biomarker: A Clinical Study. Anticancer Res. 2023 Apr;43(4):1675-1680. **(IF 2,44)**

Řezáč J, Čapoun O, Soukup V. Sérové onkomarkery karcinomu prostaty. Ces Urol, 2021 25(4), 236-243

Rezac J, Honsova E, Masek M, Rysava R, Neprasova M, Jancova E, Hruskova Z, Tesar V. Granulomatosis with polyangiitis mimicking cancer: a diagnostic dilemma. J

Nephrol. 2021 Aug 18. **(IF 3,9)**

Řezáč J, Čapoun O, Sobotka R, Kupidlovská L, Lambert L, Hanuš P, Hanuš T. Antibiotická profylaxe u transrektální fúzní biopsie prostaty. Ces Urol, 2021 25(2), 106-111

Dundr P, Bártů M, Hojný J, Michálková R, Hájková N, Stružinská I, Krkavcová E, Hadravský L, Kleissnerová L, Kopejsková J, Hiep BQ, Němejcová K, JakšaR, Čapoun O, **Řezáč J**, Jirsová K, Franková V. HNF1B, EZH2 and ECI2 in prostate carcinoma. Molecular, immunohistochemical and clinico-pathological study. Sci Rep. 2020 Sep 1;10(1):14365. **(IF 4,38)**

Hanousková L, **Řezáč J**, Veselý Š, Průša R, Kotaška K. Thymidine Kinase-1 as Additional Diagnostic Marker of Prostate Cancer. Clin Lab. 2020 Jun 1;66(6). **(IF 1,22)**

Hanousková L, **Řezáč J**, Veselý Š, Průša R, Kotaška K. Diagnostic benefits of mindin as a prostate cancer biomarker: Dijagnostičke prednosti mindina kao biomarkera raka prostate. J Med Biochem. 2020 Jan 10;39(1):108-111. **(IF 1,58)**

Reprodukční medicína (Mladá fronta, 2018); Autor kapitoly Fyziologie mužské reprodukce

Řezáč J, Hrušková Z, Konopásek P, Honsová E, Mašek M, Ryšavá R, Tesař V. Zánětlivý pseudotumor močového měchýře jako projev aktivity u pacientky s granulomatózou s polyangiitidou (Wegenerovou granulomatózou) – méně obvyklá manifestace ANCA-asociované vaskulitidy. Ces Urol, 2014 18(3), 240-245

12. Seznam přednášek autora

2022

Thymidinkináza 1 – statistické výsledky potenciálního markeru karcinomu prostaty, 68. výroční konferencí ČUS ČLS JEP

Priapismus, předatestační kurz – andrologie, Urologická klinika 1.LF UK a VFN

2020

Antibiotická profylaxe u transrektální fúzní biopsie prostaty 66. výroční konferencí ČUS ČLS JEP

2019

Thymidinkináza 1 - nový diagnostický tumormarker karcinomu prostaty? 65. výroční konferencí ČUS ČLS JEP

Primární retroperitoneální fibróza, seminář Urologická klinika 1.LF UK a VFN

2018

Kazuistiky – metastatický uroteliální karcinom, Komplexní novinky v onkourologii

Multimodální léčba metastatického renálního karcinomu, Komplexní novinky v onkourologii

Diagnostika a léčba tumorů močového měchýře, PostESOU

2017

Kazuistiky – komplikace po RCYE, Zimní urologické sympozium

Guidelines – léčba invazivních nádorů močového měchýře, Komplexní novinky v onkourologii

Kazuistika – invazivní tumor močového měchýře, Komplexní novinky v onkourologii

Quality of transurethral resection of bladder in non-muscle-invasive bladder cancer – single site results, Central European Meeting

13. Seznam zkratek

AUA – American Urological Association (AUA)

AUC – Area Under the Curve

aRT – adjuvantní radioterapie

AS – Active Surveillance

BHP – benigní hyperplazie prostaty

BP – biopsie prostaty

CEDIA – klonovaný imunotest dárce enzymu

CLIA – Clinical Laboratory Improvement Amendments

CLIA – chemiluminiscenční imunoanalýza

CMIA – chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích

CTC – cirkulující nádorové buňky

DELFIA – disociačně vylepšený lanthanidový fluorescenční imunologický test

DRE – vyšetření per rektum

EAU – European Association of Urology

EGR–1 – Early Growth Response 1

EIA – enzymová imunoanalýza

ELISA – enzymová imunoanalýza

EMIT – enzymová multiplikovaná imunoanalýza

FDA – Food and Drug Administration

FIA – fluorescenční imunoanalýza

FPIA – fluorescenční polarizační imunoanalýza

fPSA – volné PSA

GPS – Genomic Prostatic Score

GS – gleasonovo skó re

HG – High Grade

hK2 – Human kallikrein-2

ILMA – imunoluminoimunoanlýza

IRMA – imunoradiometrická analýza

ISUP – International Society of Urological Pathology

KP – karcinom prostaty

LG – Low Grade

LIA – luminoimunoanalýza

LOCI – luminiscence založena na přenosu kyslíku

MEIA – mikročásticová enzymová imunoanalýza

MiPS – Mi Prostate Score

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

NCI – National Cancer Institute

PAP – prostatická kyselá fosfatáza

PCA3 – Prostate Cancer Gene 3

PCMT – Prostate Core Mitomic Test

PCR – polymerázová řetězová reakce

PET/CT – pozitronová emisní tomografie/ výpočetní tomografie

PHI – Prostate Health Index

PSA – prostatický specifický antigen

PSA–DT – PSA Doubling Time

PSA–V – PSA velocita

PSMA – prostatický specifický membránový antigen

REA – radioenzymová imunoanalýza

RIA – radioimunoanalýza

RP – radikální prostatektomie

SD – standardní odchylka

TK1 – Thymidinkináza 1

TIMP–1 – Tkáňový inhibitor metaloproteináz

TNM – tumor nodus metastáza

TRACE – časově rozlišená emise zesíleného kryptátu

TRUS – transrektální ultrasonografie

SPINK–1 – Serin proteázový inhibitor Kazal-type 1

WW – Watchful Waiting

4K – skóre čtyř kallikreinů

14. Seznam použité literatury

1 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015; 136(5):E359-86.

2 OECD (2017), Health at a Glance 2017: OECD Indicators, OECD Publishing, Paris.

3 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019; 66: 7–30.

4 Adams J. The case of scirrhous of the prostate gland with corresponding affliction of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis. Lancet 1853; 1: 393.

5 Richie, J.P., Catalona WJ, Ahmann FR et al. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostatespecific antigen and digital rectal examination. Urology, 1993. 42: 365.

6 Klečka, J., Běhounek, P., Hora, M. Současné postavení PSA v diagnostice karcinomu prostaty. Urol. praxi, 9(4), 187-189.

7 Catalona, W.J., Richie JP, Ahmann FR et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. J Urol, 1994. 151: 1283.

8 Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of followup. Lancet 2014; 384: 2027–2035.

9 Dong, F, Kattan MW, Steyerberg EW et al. Validation of pretreatment nomograms for predicting indolent prostate cancer: efficacy in contemporary urological practice. J Urol, 2008. 180: 150.

10 Kelloff GJ, Choyke P, Coffey DS. Challenges in clinical prostate cancer: role of imaging. AJR Am J Roentgenol. 2009; 192:1455–1470.

11 Mazaheri Y, Shukla-Dave A, Muellner A, Hricak H. MRI of the prostate: clinical relevance and emerging applications. J Magn Reson Imaging. 2011; 33:258–274.

12 García Garzón JR, de Arcocha Torres M, Delgado-Bolton R et al.; Oncology Task Force of Spanish Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 68Ga-PSMA PET/CT in prostate cancer. Rev Esp Med Nucl Imagen Mol. 2018; 37(2):130-138.

13 Filella X, Foj L. Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer. Clin Chem Lab Med. 2015; 53(7): 963-973.

14 EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Milan 2023. ISBN 978-94-92671-19-6.

15 Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salaman CR. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. Trends Biotechnol. 2004; 22:411–416.

16 Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. Sci Transl Med. 2012; 4:127rv123.

17 Sawyers CL. The cancer biomarker problem. Nature. 2008; 452:548–552.

18 Lowe FC, Trauzzi SJ. Prostatic acid phosphatase in 1993. Its limited clinical utility. Urol Clin North Am. 1993; 20:589–595.

19 Romero Otero J, Garcia Gomez B, Campos Juanatey F, Touijer KA. Prostate cancer biomarkers: an update. Urol Oncol. 2014; 32:252–260.

20 Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. Nat Rev Cancer. 2008; 8:268–278.

21 Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. Cell Oncol. 2016; 39(2):97-106.

22 Veselý, Š. Současné klinické využití markerů karcinomu prostaty. Onkologie, 2019; 13(2), 78-82.

23 Semjonow, A., Brandt B, Oberpenning F et al. Discordance of assay methods creates pitfalls for the interpretation of prostatespecific antigen values. Prostate Suppl, 1996. 7: 3.

24 Thompson, I.M., Pauler DK, Goodman PJ et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med, 2004. 350: 2239.

25 Arlen, P.M., Bianco F, Dahut WL et al. Prostate Specific Antigen Working Group guidelines on prostate specific antigen doubling time. J Urol, 2008. 179: 2181.

26 Vickers AJ, Savage C, O'Brien MF, et al. Systematic review of pretreatment prostatespecific antigen velocity and doubling timeas predictors for prostate cancer. J Clin Oncol. 2009; 27: 398–403.

27 Bhat NR, Vetter JM, Andriole GL, et al. Magnetic Resonance Imaging-Defined Prostate-Specific Antigen Density Significantly Improves the Risk Prediction for Clinically Significant Prostate Cancer on Biopsy. Urology 2018; 18: 1324–8.

28 Nordström T, Akre O, Aly M, et al. Prostate-specific antigen (PSA) density in the diagnostic algorithm of prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2018; 21(1): 57–63.

29 Christensson A, Bjork T, Nilsson O, et al. Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1 antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. J Urol. 1993; 150:100–105.

30 Stephan, C., Lein M, Jung K et al. The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. Cancer, 1997. 79: 104.

31 Huang, Y., Li ZZ, Huang YL et al. Value of free/total prostate-specific antigen (f/t PSA) ratios for prostate cancer detection in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/mL: A metaanalysis. Medicine (Baltimore), 2018. 97: e0249.

32 Le BV, Griffi n CR, Loeb S, et al. [-2] Proenzyme prostate specific antigen is more accurate than total and free prostate specific antigen in differentiating prostate cancer from benign disease in a prospective prostate cancer screening study. J Urol. 2010; 183: 1355–59.

33 Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, et al. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. Cancer Res. 2000; 60: 756–9.

34 Mikolajczyk SD, Rittenhouse HG. Pro PSA: a more cancer specific form of prostate specific antigen for the early detection of prostate cancer. Keio J Med. 2003; 52, 86–91.

35 Lazzeri M, Abrate A, Lughezzani G, et al. Relationship of chronic histologic prostatic inflammation in biopsy specimens with serum isoform [−2]proPSA (p2PSA), %p2PSA, and prostate health index in men with a total prostate-specific antigen of 4–10 ng/mL and normal digital rectal examination. Urology. 2014; 38:606–612.

36 Lazzeri M, Haese A, Abrate A, et al. Clinical performance of serum prostate specific antigen isoform [−2]proPSA (p2PSA) and its derivatives %p2PSA and the prostate health index (phi) in men with a family history of prostate cancer: results from a multicenter European study, the PROMEtheuS project. BJU Int. 2013; 112:313–321.

37 Bruzzese D, Mazzarella C, Ferro M et al. Prostate health index vs percent free prostate-specific antigen for prostate cancer detection in men with “gray” prostate-specific antigen

levels at first biopsy: systematic review and meta-analysis. Transl. Res. 2014; 164(6), 444–451.

38 Haese A, Graefen M, Steuber T et al. Human glandular kallikrein 2 levels in serum for discrimination of pathologically organconfined from locally-advanced prostate cancer in total PSA-levels below 10 ng/ml. Prostate. 2001; 49(2), 101–109.

39 Gupta A, Roobol MJ, Savage CJ et al. A four-kallikrein panel for the prediction of repeat prostate biopsy: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer screening in Rotterdam, Netherlands. Br. J. Cancer. 2010; 103(5), 708–714.

40 Carlsson, S.V.; Peltola, M.T.; Sjoberg, et al. Can one blood draw replace transrectal ultrasonography-estimated prostate volume to predict prostate cancer risk? BJU Int. 2013; 112, 602–609.

41 Loeb, S., Catalona WJ. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. Ther Adv Urol, 2014. 6: 74.

42 de la Calle, C., Patil D, Wei JT et al. Multicenter Evaluation of the Prostate Health Index to Detect Aggressive Prostate Cancer in Biopsy Naive Men. J Urol, 2015. 194: 65.

43 Catalona, W.J., Partin AW, Sanda MG et al. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. J Urol, 2011. 185: 1650.

44 Parekh, D.J.; Punnen, S.; Sjoberg,; et al. A Multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4K score accurately identifies men with high-grade prostate cancer. Eur. Urol. 2015, 68, 464–470.

45 Nordstrom, T., Vickers A, Assel M et al. Comparison Between the Four-kallikrein Panel and Prostate Health Index for Predicting Prostate Cancer. Eur Urol, 2015. 68: 139.

46 3. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2017. Prostate Cancer Early Detection. Version 1.2018–14 February 2018. Dostupné z: www.nccn.org, Přístup 2.4.2021

47 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004; 116(2), 281–297.

48 Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Fernandez-Serra A, Lopez-Guerrero JA. miRNAs as biomarkers in prostate cancer. Clin. Transl. Oncol. 2012; 14(11), 803–811.

49 Lawrie, C.H.; Gal, S.; Dunlop, H.M.; et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Br. J. Haematol. 2008; 141, 672–675.

50 Witwer, K.W. Circulating microRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. Clin. Chem. 2015; 61, 56–63.

51 Lucarelli G, Ditonno P, Bettocchi C et al. Serum sarcosine is a risk factor for progression and survival in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. Future Oncol. 2013; 9(6), 899–907.

52 Ferro M, Lucarelli G, Bruzzese D et al. Improving the prediction of pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy: the value of prostate cancer antigen 3 (PCA3), prostate health index (phi) and sarcosine. Anticancer Res. 2015; 35(2), 1017–1023.

53 Mihelich, B.L.; Maranville, J.C.; Nolley, R.; et al. Elevated serum microRNA levels associate with absence of high-grade prostate cancer in a retrospective cohort. PLoS ONE. 2015; 10, e0124245.

54 Fradet, Y.; Saad, F.; Aprikian, A.; et al. Upm3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. Urology. 2004; 64, 311–315.

55 Filella, X.; Foj, L.; Milà, M.; et al. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. Tumour Biol. 2013; 34, 1337–1347.

56 https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ prostate_detection.pdf. Přístup 12.1.2024

57 Haese, A.; de la Taille, A.; van Poppel, H.; et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. Eur. Urol. 2008; 54, 1081–1088.

58 Hu, B.; Yang, H.; Yang, H. Diagnostic value of urine prostate cancer antigen 3 test using a cutoff value of 35 μg/L in patients with prostate cancer. Tumour Biol. 2014; 35, 8573–8580.

59 Crawford, E.D.; Rove, K.O.; Trabulsi, E.J.; et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: A prospective study of 1962 cases. J. Urol. 2012; 188, 1726–1731.

60 Merola, R.; Tomao, L.; Antenucci, A.; et al. PCA3 in prostate cancer and tumor aggressiveness detection on 407 high-risk patients: A National Cancer Institute experience. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2015; 34, 15.

61 Foj, L.; Milà, M.; Mengual, L.; et al. Real-time PCR PCA3 assay is a useful test measured in urine to improve prostate cancer detection. Clin. Chim. Acta. 2014; 435, 53–58.

62 Auprich, M., Bjartell A, Chun FK et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. Eur Urol. 2011; 60: 1045.

63 Seisen, T., Rouprêt M, Brault D et al. Accuracy of the prostate health index versus the urinary prostate cancer antigen 3 score to predict overall and significant prostate cancer at initial biopsy. Prostate, 2015; 75: 103.

64 Nicholson, A., Mahon J, Boland A et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of the PROGENSA(R) prostate cancer antigen 3 assay and the Prostate Health Index in the diagnosis of prostate cancer: a systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess. 2015; 19: 1.

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

66 Boström, P.J.; Bjartell, A.S.; Catto, J.W.; et al. Genomic predictors of outcome in prostate cancer. Eur. Urol. 2015; 68, 1033–1044.

67 Leyten, G.H.; Hessels, D.; Jannink, S.A.; et al. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. Eur. Urol. 2014; 65, 534–542.

68 Tomlins, S.A.; Day, J.R.; Lonigro, R.J.; et al. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for individualized prostate cancer risk assessment. Eur. Urol. 2016; 70, 45–53.

69 Stephan, C.; Cammann, H.; Jung, K. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for individualized prostate cancer risk assessment. Eur. Urol. 2015; 68, e106–e107.

70 http://exocarta.org/ přístup 18.10.2023

71 Trams, E.G.; Lauter, C.J.; Salem, N., Jr.; Heine, U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 1981; 645, 63–70.

72 Ge, Q.; Zhou, Y.; Lu, J.; et al. miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. Molecules. 2014; 19, 1568–1575.

73 Taylor, D.D.; Gercel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Gynecol. Oncol. 2008; 110, 13–21.

74 Rabinowits, G.; Gercel-Taylor, C.; Day, J.M.; et al. Exosomal microRNA: A diagnostic marker for lung cancer. Clin. Lung Cancer. 2009; 10, 42–46.

75 Silva, J.; Garcia, V.; Rodriguez, M.; et al. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer. 2012; 51, 409–418.

76 Yeh, Y.Y.; Ozer, H.G.; Lehman, A.M.; et al. Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. Blood. 2015; 125, 3297–3305.

77 O'Driscoll, L. Expanding on exosomes and ectosomes in cancer. N. Engl. J. Med. 2015; 372, 2359–2362.

78 Hosseini-Beheshti, E.; Choi, W.; Weiswald, L.B.; et al. Exosomes confer pro-survival signals to alter the phenotype of prostate cells in their surrounding environment. Oncotarget. 2016;7(12):14639-58.

79 Thery, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr. Protoc. Cell Biol. 2006; 3, 22.

80 Øverbye, A.; Skotland, T.; Koehler, C.J.; et al. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. Oncotarget. 2015; 6, 30357–30376.

81 Dijkstra, S.; Birker, I.L.; Smit, F.P.; et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. J. Urol. 2014, 191, 1132–1138.

82 McKiernan, J.; Donovan, M.J.; O'Neill, V.; et al. A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy. JAMA Oncol. 2016, 2, 882–889.

83 Donovan, M.J.; Noerholm, M.; Bentink, S.; et al. A molecular signature of pca3 and erg exosomal rna from non-dre urine is predictive of initial prostate biopsy result. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2015; 18, 370–375.

84 Ellis, W.J.; Pfitzenmaier, J.; Colli, J.; et al. Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow. Urology. 2003; 61(2):277-81.

85 Bettegowda, C.; Sausen, M.; Leary, R.J.; et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci. Transl. Med. 2014; 6(224):224ra24.

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

87 de Bono, J.S.; Scher, H.I.; Montgomery, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. Clin. Cancer Res. 2008; 14, 6302–6309.

88 Punnoose, E.A.; Ferraldeschi, R.; Szafer-Glusman, E.; et al. Pten loss in circulating tumour cells correlates with pten loss in fresh tumour tissue from castration-resistant prostate cancer patients. Br. J. Cancer. 2015; 113, 1225–1233.

89 Čapoun O, Mikulová V, Jančíková M et al. Prognosis of Castration-resistant Prostate Cancer Patients – Use of the AdnaTest® System for Detection of Circulating Tumor Cells. Anticancer Res. 2016; 36(4):2019-26.

90 Leyten, G.H.; Hessels, D.; Smit, F.P.; et al. Identification of a candidate gene panel for the early diagnosis of prostate cancer. Clin. Cancer Res. 2015; 21, 3061–3070.

91 Van Neste, L.; Hendriks, R.J.; Dijkstra, S.; et al. Detection of high-grade prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score. Eur. Urol. 2016; 70, 740–748.

92 Van Neste, L.; Partin, A.W.; Stewart, et al. Risk score predicts high-grade prostate cancer in DNA-methylation positive, histopathologically negative biopsies. Prostate. 2016; 76, 1078–1087.

93 Partin, A.W.; Van Neste, L.; Klein, E.A.; et al. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. J. Urol. 2014; 192, 1081–1087.

94 Stewart, G.D.; Van Neste, L.; Delvenne, P.; et al. Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: Results of the matloc study. J. Urol. 2013; 189, 1110–1116.

95 Van Den Eeden, S.K.; Lu, R.; Zhang, N.; et al. A biopsy-based 17-gene genomic prostate score as a predictor of metastases and prostate cancer death in surgically treated men with clinically localized disease. Eur. Urol. 2018; 73, 129–138.

96 Klein, E.A.; Cooperberg, M.R.; Magi-Galluzzi,; et al. A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. Eur. Urol. 2014; 66, 550–560.

97 Cullen, J.; Rosner, I.L.; Brand, T.C.;et al. A biopsy-based 17-gene genomic prostate score predicts recurrence after radical prostatectomy and adverse surgical pathology in a racially diverse population of men with clinically lowand intermediate-risk prostate cancer. Eur. Urol. 2015; 68, 123–131.

98 Karnes, R.J.; Bergstralh, E.J.; Davicioni, E.; et al. Validation of a genomic classifier that predicts metastasis following radical prostatectomy in an at risk patient population. J. Urol. 2013; 190, 2047–2053.

99 Mohler, J.L.; Armstrong, A.J.; Bahnson, R.R.; et al. Prostate cancer, version 1.2016. J. Natl. Compreh. Cancer Netw. 2016; 14, 19–30.

100 Erho, N.; Crisan, A.; Vergara, I.A.; et al. Discovery and validation of a prostate cancer genomic classifier that predicts early metastasis following radical prostatectomy. PLoS ONE. 2013; 8, e66855.

101 Klein, E.A.; Haddad, Z.; Yousefi, K.; et al. Decipher genomic classifier measured on prostate biopsy predicts metastasis risk. Urology. 2016; 90, 148–152.

102 Shipitsin, M.; Small, C.; Choudhury, S.; et al. Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. Br. J. Cancer. 2014; 111, 1201–1212.

103 Blume-Jensen, P.; Berman, D.M.; Rimm, et al. Development and clinical validation of an in-situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. Clin. Cancer Res. 2015; 21, 2591–2600.

104 Cuzick J, Swanson GP, Fisher G et al; Transatlantic Prostate Group. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. Lancet Oncol. 2011; 12(3):245-55.

105 Freedland SJ, Gerber L, Reid J, et al. Prognostic utility of cell cycle progression score in men with prostate cancer after primary external beam radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2013; 86(5):848-53.

106 Bishoff JT, Freedland SJ, Gerber L, et al. Prognostic utility of the cell cycle progression score generated from biopsy in men treated with prostatectomy. J Urol. 2014; 192(2):409-14.

107 Frezza, C. The role of mitochondria in the oncogenic signal transduction. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2014; 48, 11–17.

108 Parr, R.L.; Mills, J.; Harbottle, A.; et al. Mitochondria, prostate cancer, and biopsy sampling error. Discov. Med. 2013; 15, 213–220.

109 Robinson, K.; Creed, J.; Reguly, B.; et al. Accurate prediction of repeat prostate biopsy outcomes by a mitochondrial DNA deletion assay. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2010; 13, 126–131.

110 Sartori, D.A.; Chan, D.W. Biomarkers in prostate cancer: What's new? Curr. Opin. Oncol. 2014; 26, 259–264.

111 Eifler, J.B.; Feng, Z.; Lin, B.M.; et al. An updated prostate cancer staging nomogram (partin tables) based on cases from 2006 to 2011. BJU Int. 2013; 111, 22–29.

112 Fujita, K.; Pavlovich, C.P.; Netto, G.J.; et al. Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence cytology. Hum. Pathol. 2009; 40, 924–933.

113 Nickens, K.P.; Ali, A.; Scoggin, T.; et al. Prostate cancer marker panel with single cell sensitivity in urine. Prostate. 2015; 75, 969–975.

114 Karlíková M, Topolčan O. Principy imunoanalytických metod. https://docplayer.cz/26116079-Principy-imunoanalytickych-metod-pro-mediky.html. Přístup 12.9.2023

115 Hořejší, V; Bartůňková, J. Základy imunologie. Praha: Triton, 2017. 6. přepracované vydání.

116 Hanousková, L. Využití imunochemických metod v diagnostice nádorových a degenerativních onemocnění, disertační práce; 2021.

117 https://oid.fnplzen.cz/sites//users/oid/skripta%20Principy%20imunoanalytick%C3%BDch%2 0metod%20%282%29.pdf str 20-21, přístup 12.9.2023

118 Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptidep. 2015; 72, 4-15.

119 Lequin, RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry. 2005; 51(12):2415-8.

120 Bartůňková, J; Paulík, M. Vyšetřovací metody v imunologii. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

121 Crowther, JR. ELISA. Theory and practice. Methods Mol Biol. 1995; 42:1-218.

122 WILD, D et al. The Immunoassay Handbook. Oxford: Elsevier Ltd., 2013. ISBN: 978-0-08097-037-0.

123 Gleason, DF. Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep 1966; 50(3): 125-128.

124 Xin, W, Rhodes, DR, Ingold, C et al. Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression. Am J Pathol. 2003; 162(1):255-61.

125 Tiwari, R, Manzar, N, Bhatia, V et al. Androgen deprivation upregulates SPINK1 expression and potentiates cellular plasticity in prostate cancer. Nat Commun. 2020; 11(1):384.

126 Tomlins, SA, Rhodes, DR, Yu, J et al. The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers. Cancer Cell. 2008; 13(6):519-28.

127 Reis, ST, Viana, NI, Iscaife, A et al. Loss of TIMP-1 immune expression and tumor recurrence in localized prostate cancer. Int Braz J Urol. 2015; 41(6):1088-95.

128 Gong, Y, Chippada-Venkata, UD, Galsky, MD et al. Elevated circulating tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) levels are associated with neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer. Prostate. 2015; 75(6):616-27.

129 Niedworok, C, Tschirdewahn, S, Reis H et al. Serum Chromogranin A as a Complementary Marker for the Prediction of Prostate Cancer-Specific Survival. Pathol Oncol Res. 2017; 23(3):643-650.

130 Szarvas, T, Csizmarik, A, Fazekas et al. Comprehensive analysis of serum chromogranin A and neuron-specific enolase levels in localized and castration-resistant prostate cancer. BJU Int. 2021; 127(1):44-55.

131 Romero, D, O'Neill, C, Terzic, A et al. Endoglin regulates cancer-stromal cell interactions in prostate tumors. Cancer Res. 2011; 71(10):3482-93.

132 Jagarlamudi, KK, Hansson, LO, Eriksson, S: Breast and prostate cancer patients differ significantly in their serum Thymidine kinase 1 (TK1) specific activities compared with those hematological malignancies and blood donors: implications of using serum TK1 as a biomarker. BMC Cancer. 2015; 15:66.

133 Sherley, J, Kelly TJ. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. J Biol Chem. 1988; 263(17):8350-8.

134 Chang ZF and Huang DY: The regulation of thymidine kinase in HL-60 human promyeloleukemia cells. J Biol Chem. 1993; 268(2):1266-71.

135 Gasparri, F, Wang, N, Skog, S et al. Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan assays. Eur J Cell Biol 88(12): 779-785, 2009.

136 Gregg, JL, Brown, KE, Mintz, EM et al. Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. BMC Cancer. 2010; 10:165.

137 Jagarlamudi, KK, Zupan, M, Kumer, K et al. The combination of AroCell TK 210 ELISA with Prostate Health Index or prostate-specific antigen density can improve the

ability to differentiate prostate cancer from noncancerous conditions. Prostate. 2019; 79(8):856-863.

138 Hanousková L, Řezáč J, Veselý Š et al. Thymidine Kinase-1 as Additional Diagnostic Marker of Prostate Cancer. Clin Lab. 2020; 66(6).

139 Lucarelli, G, Rutigliano, M, Bettocchi, C et al. Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. J Urol. 2013; 190(6):2271-7.

140 Qian, X, Li, C, Pang, B et al. Spondin-2 (SPON2), a more prostate-cancer-specific diagnostic biomarker. PLoS One. 2012;7(5):e37225.

141 Wang, LF, Liu, YS, Yang, B et al. The extracellular matrix protein mindin attenuates colon cancer progression by blocking angiogenesis via Egr-1-mediated regulation. Oncogene. 2018; 37(5):601-615.

142 Jokerst, JV, Chen, Z, Xu, L et al. A Magnetic Bead-Based Sensor for the Quantification of Multiple Prostate Cancer Biomarkers. PLoS One. 2015; 10(9):e0139484.

143 Hanousková L, Řezáč J, Veselý Š et al. Diagnostic benefits of mindin as a prostate cancer biomarker: Dijagnostičke prednosti mindina kao biomarkera raka prostate. J Med Biochem. 2020; 39(1):108-111.

144 Li, S, Zhou, J, Wang, Y et al. Serum thymidine kinase 1 is associated with Gleason score of patients with prostate carcinoma. Oncol Lett 16(5): 6171-6180, 2018.

145 Lundgren, PO, Tribukait, B, Kjellman, A et al. Serum thymidine kinase 1 concentration as a predictive biomarker in prostate cancer. Prostate 82(8): 911-916, 2022.

146 Rezac J, Hanouskova, L, Capoun, O. et al. Serum Thymidine Kinase 1 - Potential Prostate Cancer Biomarker: A Clinical Study. Anticancer Res. 2023; 43(4):1675-1680.

15. Seznam příloh

Rezac J, Hanouskova L, Vesely S, Kotaska K, Kantorova A, Linhartova A, Fiala V, Soukup V, Capoun O. Serum Thymidine Kinase 1 - Potential Prostate Cancer Biomarker: A Clinical Study. Anticancer Res. 2023 Apr;43(4):1675-1680. **(IF 2,44)**

Hanousková L, **Řezáč J**, Veselý Š, Průša R, Kotaška K. Thymidine Kinase-1 as Additional Diagnostic Marker of Prostate Cancer. Clin Lab. 2020 Jun 1;66(6). **(IF 1,22)**

Hanousková L, **Řezáč J**, Veselý Š, Průša R, Kotaška K. Diagnostic benefits of mindin as a prostate cancer biomarker: Dijagnostičke prednosti mindina kao biomarkera raka prostate. J Med Biochem. 2020 Jan 10;39(1):108-111. **(IF 1,58)**

ANTICANCER RESEARCH
International Journal of Cancer Research and Treatment
ISSN: 0250-7005

Serum Thymidine Kinase 1 – Potential Prostate Cancer Biomarker: A Clinical Study

JAKUB REZAC[1], LENKA HANOUSKOVA[2], STEPAN VESELY[3], KAREL KOTASKA[2], ALZBETA KANTOROVA[1], ANNA LINHARTOVA[1], VOJTECH FIALA[1], VIKTOR SOUKUP[1] and OTAKAR CAPOUN[1]

[1]Department of Urology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic;
[2]Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Motol University Hospital, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic;
[3]Department of Urology, Motol University Hospital, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Reprinted from
ANTICANCER RESEARCH *43*: 1675-1680 (2023)

ANTICANCER RESEARCH

International Journal of Cancer Research and Treatment

HighWire Press® STANFORD UNIVERSITY

ISSN (print): 0250-7005
ISSN (online): 1791-7530

Editorial Board

P. A. ABRAHAMSSON, *Malmö, Sweden*
B. B. AGGARWAL, *San Diego, CA, USA*
T. AKIMOTO, *Kashiwa, Chiba, Japan*
P. Z. ANASTASIADIS, *Jacksonville, FL, USA*
A. ARGIRIS, *San Antonio, TX, USA*
J. P. ARMAND, *Paris, France*
V. I. AVRAMIS, *Los Angeles, CA, USA*
D.-T. BAU, *Taichung, Taiwan, ROC*
G. BAUER, *Freiburg, Germany*
E. E. BAULIEU, *Le Kremlin-Bicetre, France*
E. J. BENZ, Jr., *Boston, MA, USA*
J.-Y. BLAY, *Lyon, France*
J. BERGH, *Stockholm, Sweden*
F. T. BOSMAN, *Lausanne, Switzerland*
M. BOUVET, *La Jolla, CA, USA*
J. BOYD, *Miami, FL, USA*
G. BROICH, *Monza, Italy*
Ø. S. BRULAND, *Oslo, Norway*
J. M. BUATTI, *Iowa City, IA, USA*
M. CARBONE, *Honolulu, HI, USA*
C. CARLBERG, *Kuopio, Finland*
A. F. CHAMBERS, *London, ON, Canada*
P. CHANDRA, *Frankfurt am Main, Germany*
L. CHENG, *Indianapolis, IN, USA*
J.-G. CHUNG, *Taichung, Taiwan, ROC*
R. CLARKE, *Washington, DC, USA*
A.P. CONLEY, *Houston, TX, USA*
E. DE CLERCQ, *Leuven, Belgium*
E. P. DIAMANDIS, *Toronto, ON, Canada*
G. TH. DIAMANDOPOULOS, *Boston, MA, USA*
L. EGEVAD, *Stockholm, Sweden*
D. W. FELSHER, *Stanford, CA, USA*
H. FU, *Atlanta, GA, USA*
B. FUCHS, *Zurich, Switzerland*
D. FUCHS, *Innsbruck, Austria*
D. FUKUMURA, *Boston, MA, USA*
G. GABBIANI, *Geneva, Switzerland*
R. GANAPATHI, *Charlotte, NC, USA*
A. GIORDANO, *Philadelphia, PA, USA*
M. GNANT, *Vienna, Austria*
R. H. GOLDFARB, *Guilford, CT, USA*
J.S. GREENBERGER, *Pittsburgh, PA, USA*
A. HELLAND, *Oslo, Norway*
L. HELSON, *Quakertown, PA, USA*
R. HENRIKSSON, *Umeå, Sweden*
R. M. HOFFMAN, *San Diego, CA, USA*
P. HOHENBERGER, *Mannheim, Germany*
F. JANKU, *Boston, MA, USA*
S. C. JHANWAR, *New York, NY, USA*
J. V. JOHANNESSEN, *Oslo, Norway*
R. JONES, *London, UK*
B. KAINA, *Mainz, Germany*
D. G. KIEBACK, *Schleswig, Germany*
R. KLAPDOR, *Hamburg, Germany*
K.L. KNUTSON, *Jacksonville, FL, USA*
H. KOBAYASHI, *Bethesda, MD, USA*
S. D. KOTTARIDIS, *Athens, Greece*
G. R. F. KRUEGER, *Köln, Germany*
Pat M. KUMAR, *Manchester, UK*
Shant KUMAR, *Manchester, UK*
O. D. LAERUM, *Bergen, Norway*
F. J. LEJEUNE, *Lausanne, Switzerland*
S. LINDER, *Linköping, Sweden*
D. M. LOPEZ, *Miami, FL, USA*
E. LUNDGREN, *Umeå, Sweden*
Y. MAEHARA, *Fukuoka, Japan*
J. MAHER, *London, UK*
J. MARESCAUX, *Strasbourg, France*
S. S. MARTIN, *Baltimore, MD, USA*
S. MITRA, *Houston, TX, USA*
S. MIYAMOTO, *Fukuoka, Japan*
S. MONCADA, *Manchester, UK*
M. MUELLER, *Villingen-Schwenningen, Germany*
M. NAMIKI, *Kanazawa, Ishikawa, Japan*
K. NILSSON, *Uppsala, Sweden*
S. PATHAK, *Houston, TX, USA*
J.L. PERSSON, *Malmö, Sweden*
G. J. PILKINGTON, *Portsmouth, UK*
C. D. PLATSOUCAS, *Norfolk, VA, USA*
A. POLLIACK, *Jerusalem, Israel*
D. RADES, *Lübeck, Germany*
M. RIGAUD, *Limoges, France*
U. RINGBORG, *Stockholm, Sweden*
M. ROSELLI, *Rome, Italy*
S.T. ROSEN, *Duarte, CA, USA*
M. SCHAUER, *Düsseldorf, Germany*
M. SCHNEIDER, *Wuppertal, Germany*
J. SEHOULI, *Berlin, Germany*
A. SETH, *Toronto, ON, Canada*
G. V. SHERBET, *Newcastle-upon-Tyne, UK*
A. SLOMINSKI, *Birmingham, AL, USA*
G.-I. SOMA, *Kagawa, Japan*
G. S. STEIN, *Burlington, VT, USA*
T. STIGBRAND, *Umeå, Sweden*
T. M. THEOPHANIDES, *Athens, Greece*
P. M. UELAND, *Bergen, Norway*
H. VAN VLIERBERGHE, *Ghent, Belgium*
R. G. VILE, *Rochester, MN, USA*
M. WELLER, *Zurich, Switzerland*
J. WESTERMARCK, *Turku, Finland*
B. WESTERMARK, *Uppsala, Sweden*
Y. YEN, *Taipei, Taiwan, ROC*
M.R.I. YOUNG, *Charleston, SC, USA*

G. J. DELINASIOS, *Athens, Greece*
Managing Editor and
Executive Publisher

J. G. DELINASIOS, *Athens, Greece*
Managing Editor (1981-2016)

Editorial Office: International Institute of Anticancer Research, 1st km Kapandritiou-Kalamou Rd., Kapandriti, P.O. Box 22, Attiki 19014, Greece. Tel / Fax: +30-22950-53389.

U.S. Branch: Anticancer Research USA, Inc., 111 Bay Avenue, Highlands, NJ 07732, USA.

E-mails: Editorial Office: journals@iiar-anticancer.org
Managing Editor: editor@iiar-anticancer.org

ANTICANCER RESEARCH supports: (a) the establishment and the activities of the INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH (IIAR; Kapandriti, Attiki, Greece); and (b) the organization of the International Conferences of Anticancer Research. The IIAR is a member of UICC. For more information about ANTICANCER RESEARCH, IIAR and the Conferences, please visit the IIAR website: www.iiar-anticancer.org

Publication Data: ANTICANCER RESEARCH (AR) is published bimonthly from January 1981 to December 2008 and monthly from January 2009. Each annual volume comprises 12 issues. Annual Author and Subject Indices are included in the last issue of each volume. ANTICANCER RESEARCH Vol. 24 (2004) and onwards appears online with Stanford University HighWire Press from April 2009. All published articles are deposited in PubMed Central.

Copyright: On publication of a manuscript in AR, which is a copyrighted publication, the legal ownership of all published parts of the paper passes from the Author(s) to the Journal.

Annual Subscription Rates 2023 per volume: Institutional subscription US$ 1,898.00 (online) or US$ 2,277.00 (print & online). Personal subscription US$ 897.00 (online) or US$ 1,277.00 (print & online). Prices include rapid delivery and insurance. The complete previous volumes of Anticancer Research (Vol. 1-42, 1981-2022) are available at 50% discount on the above rates.

Subscription Orders: Orders can be placed at agencies, bookstores, or directly with the Publisher. (e-mail: subscriptions@iiar-anticancer.org)

Advertising: All correspondence and rate requests should be addressed to the Editorial Office.

Book Reviews: Recently published books and journals should be sent to the Editorial Office. Reviews will be published within 2-4 months.

Articles in ANTICANCER RESEARCH are regularly indexed in all bibliographic services, including Current Contents Life Sciences and Medical Sciences, Science Citation Index Expanded, Index Medicus, Biological Abstracts, PubMed, PubMed Central, Chemical Abstracts, BIOSIS, Previews, Essential Science Indicators, Excerpta Medica, University of Sheffield Biomedical Information Service, Current Clinical Cancer, AIDS Abstracts, Elsevier Bibliographic Database, EMBASE, Compendex, GEOBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, FLUIDEX, World Textiles, Scopus, Progress in Palliative Care, Cambridge Scientific Abstracts, Cancergram (International Cancer Research Data Bank), MEDLINE, Reference Update - RIS Inc., PASCAL-CNRS, Inpharma-Reactions (Datastar, BRS), CABS, Immunology Abstracts, Telegen Abstracts, Genetics Abstracts, Nutrition Research Newsletter, Dairy Science Abstracts, Current Titles in Dentistry, Inpharma Weekly, BioBase, MedBase, CAB Abstracts/Global Health Databases, Investigational Drugs Database, VINITI Abstracts Journal, Leeds Medical Information, PubsHub, Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC) Data Bases.

Obtaining permission to reuse or reproduce our content: AR has partnered with Copyright Clearance Center (CCC) to make it easy to secure permissions to reuse its content. Please visit www.copyright.com and enter the title that you are requesting permission for in the 'Get Permission' search box. For assistance in placing a permission request, Copyright Clearance Center can be contacted directly at: Copyright Clearance Center, 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA. Phone: +1-978-750-8400. Fax: +1-978-646-8600. E-mail: info@copyright.com.

The Editors and Publishers of ANTICANCER RESEARCH accept no responsibility for the opinions expressed by the contributors or for the content of advertisements appearing therein.

Copyright© 2023, International Institute of Anticancer Research (Dr. George J. Delinasios), All rights reserved.

D.T.P. BY IIAR
PRINTED BY ENTYPO, ATHENS, GREECE. PRINTED ON ACID-FREE PAPER

ANTICANCER RESEARCH *43*: 1675-1680 (2023)
doi:10.21873/anticanres.16319

Serum Thymidine Kinase 1 – Potential Prostate Cancer Biomarker: A Clinical Study

JAKUB REZAC[1], LENKA HANOUSKOVA[2], STEPAN VESELY[3], KAREL KOTASKA[2], ALZBETA KANTOROVA[1], ANNA LINHARTOVA[1], VOJTECH FIALA[1], VIKTOR SOUKUP[1] and OTAKAR CAPOUN[1]

[1]Department of Urology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic;
[2]Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Motol University Hospital, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic;
[3]Department of Urology, Motol University Hospital, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Abstract. *Background/Aim: Serum thymidine kinase 1 (STK1) is a proliferation biomarker that has been used as a diagnostic marker of several malignant diseases. However, there are limited data for prostate cancer (PCa). Patients and Methods: In this study, we retrospectively analysed serum samples from 169 patients with biopsy confirmed PCa, who had been indicated for radical prostatectomy (RP) between 2013-2016. The results were compared with those in serum samples from 39 healthy men. We used commercially available enzymatic immunoassay to determine the levels of STK1. The patients were divided into groups according to the Gleason score (GS) and risk factors for adjuvant radiotherapy (aRT), which were defined as GS 8-10, pT3, and a positive surgical margin. Results: The median serum level of STK1 in PCa patients was 0.289 pmol/l. In the control group, the median value was 0.0116 pmol/l ($p<0.001$). By comparing the patients with GS≤6 vs. 7 vs. ≥8 ($p=0.01$), we found statistically significant differences. In the correlation of STK1 values with risk factors, we found statistically significant differences both in comparison of 0 vs. 1 vs. 2 vs. 3 risk factors ($p=0.021$), as well as ≤1 vs. 2≥ risk factors ($p=0.009$). Conclusion: The levels of STK1 are significantly higher in patients with PCa than those in healthy controls. Furthermore, STK1 values correlate with GS and predefined risk factors for aRT. Therefore, STK1 can be considered as a potential tumour marker of PCa diagnosis and risk stratification.*

Correspondence to: Otakar Capoun, MD, Ph.D., General Faculty Hospital, Ke Karlovu 6, 128 08, Prague, Czech Republic. Tel: +420 242967847, email: otakar.capoun@vfn.cz

Key Words: Prostate cancer, thymidine kinase 1, STK1, serum biomarker.

Prostate cancer (PCa) is the second most common male malignancy, accounting for 14% of all diagnosed cancer cases with the incidence steadily growing (1). Currently, it is the third most common cause of cancer mortality among men, accounting for just over 10% of all cancer-related deaths (2). The prostate-specific antigen (PSA) is currently the most frequently used tumour marker in the early detection of PCa, despite its low specificity and low negative predictive value (3). False positives trigger unnecessary biopsies with a certain rate of complications. Furthermore, PCa represents a wide spectrum of diagnoses, ranging from clinically indolent to aggressive, high-grade cancers. PSA-based screening leads to overdiagnosis and overtreatment (4), escalating the overall cost of treatment. New markers could lead to better differentiation of significant cancer as well as improved monitoring of the disease. Therefore, research for novel cost-effective serum and urine diagnostic biomarkers with higher accuracy is needed.

Although almost one hundred potentially useful urine and serum markers for PCa have been reported, none of these have replaced PSA on its own or in a combination with other tumour markers (3, 5, 6). One of the main cancer characteristics is uncontrolled cell proliferation. Proliferative activity of cancer cells correlates with the aggressiveness of the disease. Predictive markers capable of measuring tumour-cell proliferation are clinically valuable because they may improve chances of early detection of tumour-related diseases, as well as its monitoring during therapy (7). Serum thymidine kinase 1 (STK1) is a proliferation biomarker that has already been used as a diagnostic marker for several malignant diseases (8).

STK1 is a cellular enzyme involved in the salvage pathway of DNA precursor synthesis. It catalyses the conversion of thymidine to deoxythymidine monophosphate, which is further phosphorylated to deoxythymidine di- and triphosphates prior incorporation into DNA (9).

Table I. *The characteristics of the patients and healthy subjects.*

Variable	Patients=169	Controls=39	*p*-Value
STK1, pmol/l; mean (SD; min - max)	0.289 (0.289; 0.062-1.78)	0.012 (0.0742; 0.0625-0.364)	<0.001
STK1 density, pmol/l/ml; mean (SD; min - max)	0.825 (0.902; 0.066-6.538)	X	X
iPSA, ng; mean (SD; min - max)	9.522 (7.929; 1.770-68.75)	X	X
iPSA density, ng/ml; mean (SD; min - max)	0.258 (0.208; 0.039-1.803)	X	X
Age, years; mean (SD; min - max)	64.928 (6.363; 40.9-79.1)	65.923 (5.441; 55-80)	0.475
Gleason score; n (%)			
6	68 (40)	X	X
7	79 (47)	X	X
8 and more	22 (13)	X	X
Stage; n (%)			
Localised (pT2)	110 (65)	X	X
Locally advanced	59 (35)	X	X
Surgical margin; n (%)			
Positive	47 (28)	X	X
Negative	122 (72)	X	X

STK1: Serum thymidine kinase 1; iPSA: prostate-specific antigen at the time of diagnosis; SD: standard deviation.

The activity of STK1 is cell-cycle dependent and shows a different pattern in normal proliferating cells compared with tumour cells. In normal cells, STK1 activity reaches its peak at late G1 phase/early S phase (10-20-fold increase) and is dramatically reduced to undetectable levels by the end of M phase (10, 11). However, STK1 activity may remain elevated in G2 and M phases of the cell cycle in malignant cells (12), most likely due to disordered regulation of transcription and degradation. High levels of STK1 have been observed in proliferating and malignant cells (13, 14).

In our pilot study, we measured increased concentrations of STK1 in patients with PCa (15). Our aim was to confirm these results in a larger study. We believe that STK1 may prove to be a cost-efficient and minimally invasive diagnostic and monitoring tool for PCa.

Patients and Methods

Patient selection. We performed a retrospective analysis of prospectively collected serum samples from 169 patients with PCa scheduled for radical prostatectomy (RP) between 2013-2016. The results were compared with those in the serum from 39 healthy male volunteers, with an average age of 61 years, without relevant urological or oncological medical history, with negative urine bacterial culture and urine cytology, PSA level under 2 μg/l, and negative digital rectal examination. The Institutional Ethics Committee approved the study. All participants gave their written informed consent.

Sample and data collection. Blood was collected from all patients before RP after overnight fasting via puncture of the cubital vein. The blood was then centrifuged for 10 min at 3,000 rpm (1,450 g) and the serum was aliquoted, immediately frozen, and kept at –70˚C until STK1 was analysed. Radical prostatectomy specimens were examined by a specialized pathologist. Tumours were classified according to the tumour, node and metastasis (TNM) classification (16) and graded according to the Gleason score (GS) (17). Healthy volunteers underwent the same blood sampling procedure.

Concentration measurements. For both groups, we measured the STK1 marker level in the serum with the use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), utilizing a commercially available immunoassay technique ELISA kit (LSBio, Inc, Seattle, WA, USA).

The analytical parameters of the kit were as follows: detection limit 0.063 pmol/l and working range 0.063-4.0 pmol/l [intra-assay coefficient of variation (CV)=5.3%/inter-assay CV=8.6%]. Serum PSA levels were measured using the electrochemiluminescence sandwich immunoassay on the Cobas e6000 analyser (Hitachi, High Technology Corp., Tokyo, Japan).

For statistical analysis, the patients were divided into groups in accordance with GS and risk factors for adjuvant radiotherapy (aRT), which were defined as GS 8-10, pT3 or a positive surgical margin.

Statistical analysis. Statistical data analysis was performed using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Basic statistical data such as mean, standard deviation, variance, median, interquartile range, minimum and maximum were calculated for the measured parameters. For categorical variables, their absolute and relative frequencies were examined. Nonparametric tests (Wilcoxon's two-sample test and its generalised variant, the so-called Kruskal–Wallis test) were used to compare the distributions of the examined parameters between the tested groups. We tested the age agreement between the examined groups using Two One Sample Test. The relationships between the parameters were investigated using the Spearman correlation coefficient and were expressed graphically using linear regression. Statistical significance was determined at alpha=5%.

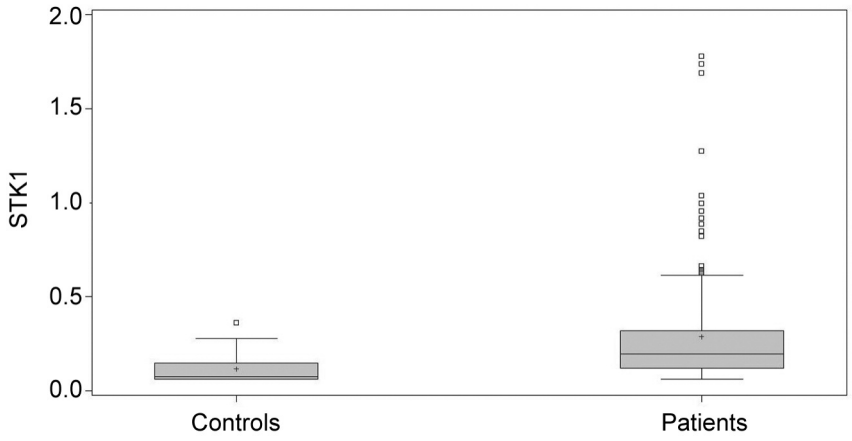


Figure 1. *Levels of serum thymidine kinase 1 (STK1) (pmol/l) in patients with confirmed prostate cancer and healthy controls.*

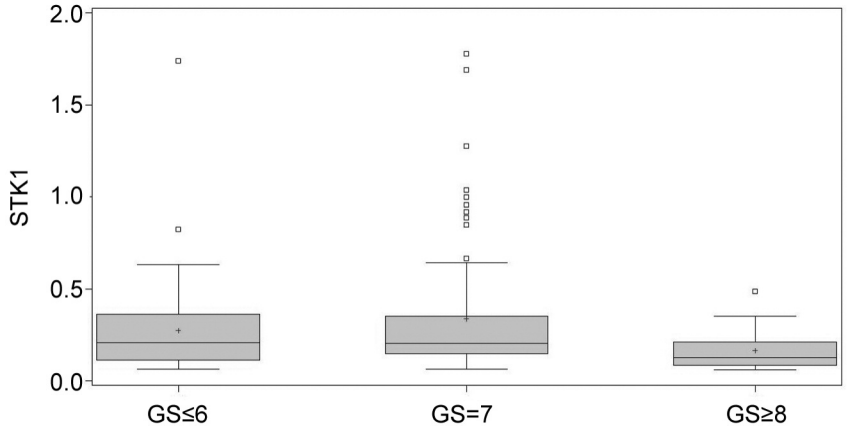


Figure 2. *Correlation between Gleason score and levels of serum thymidine kinase 1 (STK1) (pmol/l).*

Results

The study included 169 patients with PCa aged between 40 and 79 years and 39 healthy subjects aged between 53 and 78 years. The characteristics of the patients and healthy subjects are summarized in Table I.

The serum levels of STK1 in PCa patients were significantly increased as compared to those in the control group of healthy subjects. The median STK1 level detected in PCa patients was 0.289 pmol/l [standard deviation (SD)=0.289; min-max 0.062-1.78], whereas in the control group was 0.012 pmol/l (SD=0.0742; min-max 0.063-0.364) (p<0.001) (Figure 1, Table I).

When comparing patients with GS≤6 *vs.* 7 *vs.* ≥8 (p=0.01) (Figure 2, Table II), we found a statistically significant difference, but not when comparing patients with GS≤6 *vs.* ≥7 (p=1.000). Staging did not show any significant difference neither in the comparison of pT2 *vs.* pT3a *vs.* pT3b (p=0.989), nor in the comparison of pT2 *vs.* pT3a+pT3b (p=1.0) (Table II).

We found a statistically significant correlation of STK1 serum level with risk factors for aRT (GS 8-10, pT3, positive surgical margin), p=0.021 (Figure 3). The lowest levels of STK1 were found in patients with all three risk factors. The difference between patients with no risk factors and to those with at least one risk factor was not significant (p=0.579). Statistically significantly lower levels of STK1 were found when comparing patients with 0 or 1 and patients with 2 or more risk factors (p=0.009) (Table III, Figure 4).

Correlations between STK1 and PSA density, PSA at the time of diagnosis, prostate health index (PHI), and prostate size measured by TRUS were not statistically significantly different.

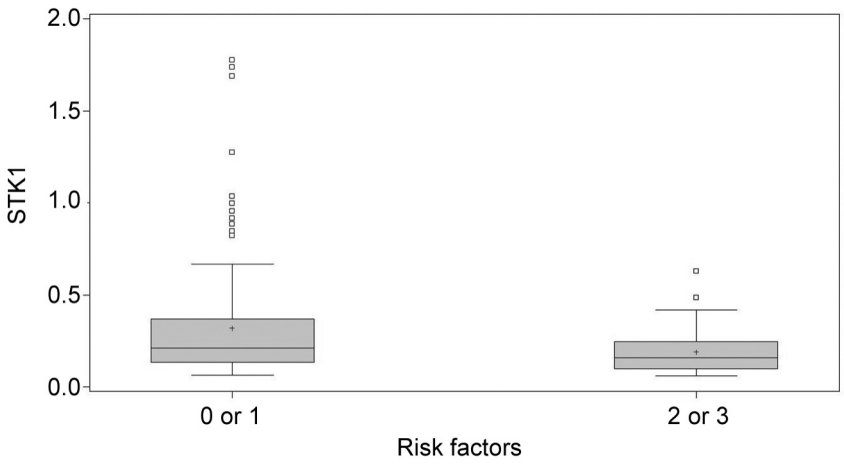


Figure 3. *Correlation between number of risk factors for adjuvant radiotherapy (Gleason score 8-10, pT3, positive surgical margin) and levels of serum thymidine kinase 1 (STK1) (pmol/l).*

Table II. *Correlation between staging and levels of STK1.*

Parameter	STK1, pmol/l; median (SD; min-max)	*p*-Value
GS≤6	0.21 (0.25; 0.063-1.74)	0.098
GS7	0.204 (0.34; 0.062-1.78	
GS≥8	0.127 (0.111; 0.062-0.49)	
GS≤6	0.21 (0.25; 0.063-1.74)	1.0
GS≥7	0.193 (0.31; 0.062-1.78)	
pT2	0.594 (0.862; 0.066-5.235)	0.989
pT3a	0.531 (1.121; 0.134-6.538)	
pT3b	0.715 (0.467; 0.17-1.633)	
pT2	0.594 (0.862; 0.066-5.235)	1
pT3a+pT3b	0.535 (0.985; 0.134-6.538)	

STK1: Serum thymidine kinase 1; SD: standard deviation; GS: Gleason score.

Table III. *Correlation between risk factors for adjuvant radiotherapy (GS 8-10, pT3, positive surgical margin) and levels of STK1.*

Risk factors	STK1, pmol/l; median (SD; min-max)	*p*-Value
0	0.196 (0.342; 0.063-1.78)	0.0211
1	0.265 (0.271; 0.063-1.278)	
2	0.16 (0.124; 0.067-0.634)	
3	0.084 (0.085; 0.062-0.243)	
0	0.196 (0.342; 0.063-1.78)	0.579
1 or 2 or 3	0.191 (0.224; 0.062-1.278)	
0	0.196 (0.342; 0.063-1.78)	0.792
2 or 3	0.195 (0.226; 0.063-1.278)	
0 or 1	0.21 (0.319; 0.063-1.78)	0.009
2 or 3	0.158 (0.122; 0.062-0.634)	

STK1: Serum thymidine kinase 1; GS: Gleason score.

Discussion

We compared serum levels of STK1 in patients with PCa and healthy controls using an enzyme immunoassay method utilising a commercially available kit. We showed that serum levels of STK1 in patients with PCa were significantly higher (median 0.289 pmol/l) than those in the control group (median 0.0116 pmol/l).

While PSA will likely remain the most widely used prostate tumour marker in the near future, the need for other diagnostic methods, either on their own or in combination with other tumour markers, is becoming more and more urgent, in particular because of the sensitivity and specificity of the PSA test. The potential new marker must fulfil several requirements such as cost efficiency, minimal invasiveness and repeatability (18).

The results of our study confirm our hypothesis that higher STK1 level is associated with the diagnosis of PCa. The presented results are in accord with the study of Li *et al.* (19), who demonstrated that STK1 concentration and total PSA were significantly higher in patients with PCa, as compared to patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and healthy individuals [n=123, median 2.5 pmol/l (SD 2.0; min-max 0.2-14.7)]. Furthermore, STK1 concentration was associated with GS, whereas total PSA was not. However, no association was identified between STK1 concentration and total serum PSA. Li *et al.* also indicated the difficulty in differentiating BPH from PCa, *i.e.*, supporting our aim for the identification of markers

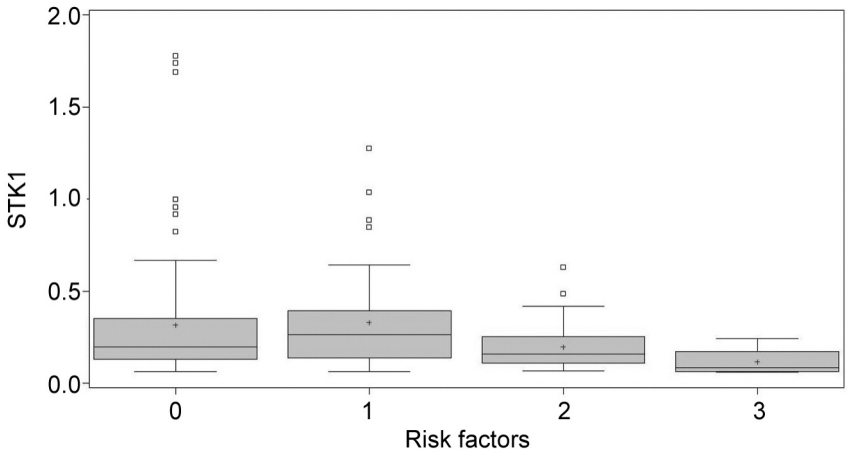


Figure 4. *Correlation between number of risk factors for adjuvant radiotherapy (Gleason score 8-10, pT3, positive surgical margin) and levels of serum thymidine kinase 1 (STK1) (pmol/l).*

to be used in a combination with other molecules. Our results also show the association of STK1 concentrations with the grading of the disease according to GS.

Lundgren *et al.* (20) measured STK1 in 36 patients, who died of PCa [median 0.30 ng/ml (min-max 0.21-0.41)], and in 294 randomly selected healthy men, and showed that high levels of STK1 can predict PCa-related death in 30 years. Another study by Jagarlamudi *et al.* (8) compared STKa (serum thymidine kinase activity) and concentration of STK1 in patients with PCa (n=47) to those of healthy blood donors. The results demonstrated that STKa and STK1 concentration differed significantly between patients with PCa and healthy individuals.

In this study, we measured the levels of STK1 in a higher number of patients with PCa than in previous studies. In addition, unlike others, we added risk factors for aRT after RP (GS 8-10, pT3, positive surgical margin), which may prove as a useful predictive combination of parameters with clinical benefits. Our results confirm that STK1 levels are significantly higher in patients with PCa than in healthy controls. Furthermore, STK1 values correlate with the tumour GS and a number of predefined risk factors for aRT. Therefore, STK1 is a promising tumour marker for PCa. It is important to note that the current study was not a clinical trial following specific criteria, rather, it was based on data collected during routine clinical practice. This may limit the reliability of the conclusions drawn.

In the future, we plan to examine a panel of serum and urine biomarkers which could function as a reliable guidance for PCa diagnosis with higher sensitivity and specificity than PSA. In turn, the number of unnecessary prostate biopsies, which are both invasive and pose significant risks for the patients, will be reduced.

Conflicts of Interest

The Authors have no conflicts of interest to report in relation to this study.

Authors' Contributions

Rezac Jakub drafted the manuscript and prepared the figures. Measurements were performed by Hanouskova Lenka, and Kotaska Karel. Kantorova Alzbeta, Linhartova Anna and Fiala Vojtech edited the manuscript. Supervision was performed by Capoun Otakar, Soukup Viktor, and Vesely Stepan.

Acknowledgements

Supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organisation 00064203 (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic). Supported by the Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organisation 00064165, General University Hospital and the First Faculty of Medicine in Prague.

References

1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A and Bray F: Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin *71(3)*: 209-249, 2021. PMID: 33538338. DOI: 10.3322/caac.21660

2 Health at a Glance 2019: OECD Indicators, 2019. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/sites/ac388762-en/index.html?itemId=/content/component/ac388762-en [Last accessed on August 30, 2022]

3 Filella X and Foj L: Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer. Clin Chem Lab Med *53(7)*: 963-973, 2015. PMID: 25581761. DOI: 10.1515/cclm-2014-0988

4 Dani H and Loeb S: The role of prostate cancer biomarkers in undiagnosed men. Curr Opin Urol *27(3)*: 210-216, 2017. PMID: 28212119. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000384

5 Bratt O and Lilja H: Serum markers in prostate cancer detection. Curr Opin Urol *25(1)*: 59-64, 2015. PMID: 25393274. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000128

6 Shariat SF, Semjonow A, Lilja H, Savage C, Vickers AJ and Bjartell A: Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. Acta Oncol *50(Suppl 1)*: 61-75, 2011. PMID: 21604943. DOI: 10.3109/0284186X.2010.542174

7 He Q, Fornander T, Johansson H, Johansson U, Hu GZ, Rutqvist LE and Skog S: Thymidine kinase 1 in serum predicts increased risk of distant or loco-regional recurrence following surgery in patients with early breast cancer. Anticancer Res *26(6C)*: 4753-4759, 2006. PMID: 17214336.

8 Jagarlamudi KK, Hansson LO and Eriksson S: Breast and prostate cancer patients differ significantly in their serum Thymidine kinase 1 (TK1) specific activities compared with those hematological malignancies and blood donors: implications of using serum TK1 as a biomarker. BMC Cancer *15*: 66, 2015. PMID: 25881026. DOI: 10.1186/s12885-015-1073-8

9 Eriksson S, Munch-Petersen B, Johansson K and Eklund H: Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. Cell Mol Life Sci *59(8)*: 1327-1346, 2002. PMID: 12363036. DOI: 10.1007/s00018-002-8511-x

10 Jagarlamudi KK and Shaw M: Thymidine kinase 1 as a tumor biomarker: technical advances offer new potential to an old biomarker. Biomark Med *12(9)*: 1035-1048, 2018. PMID: 30039979. DOI: 10.2217/bmm-2018-0157

11 Sherley JL and Kelly TJ: Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. J Biol Chem *263(17)*: 8350-8358, 1988. PMID: 3372530.

12 Chang ZF and Huang DY: The regulation of thymidine kinase in HL-60 human promyeloleukemia cells. J Biol Chem *268(2)*: 1266-1271, 1993. PMID: 8419329.

13 He Q, Skog S and Tribukait B: Cell cycle related studies on thymidine kinase and its isoenzymes in Ehrlich ascites tumours. Cell Prolif *24(1)*: 3-14, 1991. PMID: 2009315. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1991.tb01506.x

14 Gasparri F, Wang N, Skog S, Galvani A and Eriksson S: Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan assays. Eur J Cell Biol *88(12)*: 779-785, 2009. PMID: 19726104. DOI: 10.1016/j.ejcb.2009.06.005

15 Hanousková L, Řezáč J, Veselý Š, Průša R and Kotaška K: Thymidine kinase-1 as additional diagnostic marker of prostate cancer. Clin Lab *66(6)*, 2020. PMID: 32538039. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.191026

16 The European Association of Urology (EAU) prostate cancer guidelines, 2022. Available at: https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer [Last accessed on August 30, 2022]

17 Gleason DF: Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep *50(3)*: 125-128, 1966. PMID: 5948714.

18 Biomarkers in cancer: an introductory guide for advocates. Available at: https://cancer.wisc.edu/research/wp-content/uploads/2019/05/Biomarkers-in-Cancer.pdf [Last accessed on December 15, 2022]

19 Li S, Zhou J, Wang Y, Zhang K, Yang J, Zhang X, Wang C, Ma H, Zhou J, He E and Skog S: Serum thymidine kinase 1 is associated with Gleason score of patients with prostate carcinoma. Oncol Lett *16(5)*: 6171-6180, 2018. PMID: 30333882. DOI: 10.3892/ol.2018.9345

20 Lundgren PO, Tribukait B, Kjellman A, Norming U, Jagarlmudi K and Gustafsson O: Serum thymidine kinase 1 concentration as a predictive biomarker in prostate cancer. Prostate *82(8)*: 911-916, 2022. PMID: 35294068. DOI: 10.1002/pros.24335

Received January 14, 2023
Revised January 28, 2023
Accepted January 31, 2023

Instructions for Authors 2023

General Policy. ANTICANCER RESEARCH (AR) will accept original high quality works and reviews on all aspects of experimental and clinical cancer research. The Editorial Policy suggests that priority will be given to papers advancing the understanding of cancer causation, and to papers applying the results of basic research to cancer diagnosis, prognosis, and therapy. Each article should include a concrete conclusion constituting a "new piece of knowledge" backed up by scientific evidence. AR will also accept the following for publication: (a) Abstracts and Proceedings of scientific meetings on cancer, following consideration and approval by the Editorial Board; (b) Announcements of meetings related to cancer research; (c) Short reviews (of approximately 120 words) and announcements of newly received books and journals related to cancer, and (d) Announcements of awards and prizes.

AR provides for the prompt print and online publication of accepted articles, generally within 1-2 months from final acceptance. Manuscripts will be accepted on the understanding that they report original unpublished works in the field of cancer research that are not under consideration for publication by another journal, and that they will not be published again in the same form. All authors should sign a submission letter confirming the approval of their article contents. All material submitted to AR will be subject to peer-review, when appropriate, by two members of the Editorial Board and by one suitable outside referee. All manuscripts submitted to AR are urgently treated with absolute confidence, with access restricted to the Managing Editor, the journal's secretary, the reviewers and the printers.The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style.

The Editors and Publishers of AR accept no responsibility for the contents and opinions expressed by the contributors. Authors should warrant due diligence in the creation and issuance of their work.

AR is a hybrid open-access journal (a subscription journal in which some of the articles are open access). All articles that are published as open access are with gold OA, which means that the final published version is permanently and freely available to anyone. Our open access articles are distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC-ND) 4.0 international license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0).

NIH Open Access Policy. The journal acknowledges that authors of NIH-funded research retain the right to provide a copy of the published manuscript to the NIH four months after publication in ANTICANCER RESEARCH, for public archiving in PubMed Central.

UKRI Open Access Policy. UKRI-funded Authors retain the right to distribute the final published version of their accepted article, such as via an institutional and/or subject repository (e.g. EuropePMC), under a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) licence (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Copyright. Once a manuscript has been published in ANTICANCER RESEARCH, which is a copyrighted publication, the legal ownership of all published parts of the paper has been transferred from the Author(s) to the journal. Material published in the journal may not be reproduced or published elsewhere without the written consent of the Managing Editor or Publisher.

Format. Two types of papers may be submitted: (i) Full papers containing completed original work (without supplementary data), and (ii) review articles concerning fields of recognisable progress. Papers should contain all essential data in order to make the presentation clear. Reasonable economy should be exercised with respect to the number of tables and illustrations used. Papers should be written in clear, concise English. Spelling should follow that given in the "Shorter Oxford English Dictionary".

Manuscripts. Submitted manuscripts exceeding 4 printed pages will be subject to excess page charges. The 4 printed pages correspond approximately to twelve (12) document pages (~250 words per double-spaced typed page in Arial 12), including abstract, text, tables, figures, and references. Excess pages are charged US$ 230.00 each. All manuscripts should be divided into the following sections: (a) *First page* including the title of the presented work [not exceeding fifteen (15) words], full names and full postal addresses of all Authors, name of the Author to whom proofs are to be sent, key words, an abbreviated running title, an indication "review", "clinical", "epidemiological", or "experimental" study, and the date of submission. (Note: The order of the Authors is not necessarily indicative of their contribution to the work. Authors may note their individual contribution(s) in the appropriate section(s) of the presented work or before the Acknowledgements); (b) *Abstract* not exceeding 250 words, organized according to the following headings: Background/Aim – Materials and Methods/Patients and Methods – Results – Conclusion; (c) *Introduction;* (d) *Materials and Methods/Patients and Methods;* (e) *Results;* (f) *Discussion;* (g) *Conflicts of Interest;* (h) *Authors' Contributions;* (i) *Acknowledgements;* (j) *References.* All pages must be numbered consecutively. Footnotes should be avoided. Review articles may follow a different style according to the subject matter and the Author's opinion. Review articles should not exceed 35 pages (approximately 250 words per double-spaced typed page) including all tables, figures, and references.

Figures (graphs and photographs). All figures should appear at the end of the submitted document file. Once a manuscript is accepted all figures should be submitted separately in either jpg, tiff or pdf format and at a minimum resolution of 300 dpi. Graphs must be submitted as pictures made from drawings and must not require any artwork, typesetting, or size modifications. Figures should be prepared at a width of 8 or 17cm with eligible symbols, lettering and numbers. The number of each figure must be indicated. Pages that include color figures are subject to color charges (US$350.00 per page).

Tables. All tables should appear at the end of the submitted document file. Each table may have 2-10 vertical columns. Once a manuscript is accepted, each table should be submitted separately, typed double-spaced. Tables should be numbered with Roman numerals and should include a short title.

References. Authors must assume responsibility for the accuracy of the references used. Citations for the reference sections of submitted works should follow the form below and must be numbered consecutively. In the text, references should be cited by number in parenthesis. Examples: 1 Kenyon J, Liu W and Dalgleish A: Report of objective clinical responses of cancer patients to pharmaceutical-grade synthetic cannabidiol. Anticancer Res *38(10):* 5831-5835, 2018. PMID: 30275207. DOI: 10.21873/anticanres.12924 (PMIDs and DOIs only if applicable). 2 McGuire WL and Chamnes GC: Studies on the oestrogen receptor in breast cancer. In: Receptors for Reproductive Hormones. O' Malley BW, Chamnes GC (eds.). New York, Plenum Publ Corp., pp 113-136, 1973. 3 Global Health Estimates 2015: Disease Burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Geneva, World Health Organisation, 2016. Available at: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index2.html [Last accessed on April 3, 2018]. (The web address should link directly to the cited information and not to a generic webpage).

Nomenclature and Abbreviations. Nomenclature should follow that given in "Chemical Abstracts", "Index Medicus", "Merck Index", "IUPAC -IUB", "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", The CBE Manual for Authors, Editors and Publishers (6th edition, 1994), and MIAME Standard for Microarray Data. Human gene symbols may be obtained from the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (http://www.gene.ucl.ac.uk/). Approved mouse nomenclature may be obtained from http://www.informatics.jax.org/. Standard abbreviations are preferable. If a new abbreviation is used, it must be defined on first usage.

Clinical Trials. Authors of manuscripts describing clinical trials should provide the appropriate clinical trial number in the correct format in the text.

For International Standard Randomised Controlled Trials (ISRCTN) Registry (a not-for-profit organization whose registry is administered by Current Controlled Trials Ltd.) the unique number must be provided in this format: ISRCTNXXXXXXXX (where XXXXXXXX represents the unique number, always prefixed by "ISRCTN"). Please note that there is no space between the prefix "ISRCTN" and the number. Example: ISRCTN47956475.

For Clinicaltrials.gov registered trials, the unique number must be provided in this format: NCTXXXXXXXX (where XXXXXXXX represents the unique number, always prefixed by 'NCT'). Please note that there is no space between the prefix 'NCT' and the number. Example: NCT00001789.

Ethical Policies and Standards. ANTICANCER RESEARCH agrees with and follows the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" established by the International Committee of Medical Journal Editors in 1978 and updated in October 2001 (www.icmje.org). Microarray data analysis should comply with the "Minimum Information About Microarray Experiments (MIAME) standard". Specific guidelines are provided at the "Microarray Gene Expression Data Society" (MGED) website. Presentation of genome sequences should follow the guidelines of the NHGRI Policy on Release of Human Genomic Sequence Data. Research involving human beings must adhere to the principles of the Declaration of Helsinki and Title 45, U.S. Code of Federal Regulations, Part 46, Protection of Human Subjects, effective December 13, 2001. Research involving animals must adhere to the Guiding Principles in the Care and Use of Animals approved by the Council of the American Physiological Society. The use of animals in biomedical research should be under the careful supervision of a person adequately trained in this field and the animals must be treated humanely at all times. Research involving the use of human foetuses, foetal tissue, embryos and embryonic cells should adhere to the U.S. Public Law 103-41, effective December 13, 2001.

Submission of Manuscripts. Please follow the Instructions for Authors regarding the format of your manuscript and references. Manuscripts must be submitted only through our online submission system at: http://www.iiar-submissions.com/login.html. In case a submission is incomplete, the corresponding Author will be notified accordingly. Questions regarding difficulties in using the online submission system should be addressed to: email: journals@iiar-anticancer.org

Galley Proofs. Unless otherwise indicated, galley proofs will be sent to the corresponding Author of the submission. Corrections of galley proofs should be limited to typographical errors. Reprints, PDF files, and/or Open Access may be ordered after the acceptance of the paper. Authors of online open access articles are entitled to a complimentary online subscription to Anticancer Research for the current year and all previous digital content since 2004 (upon request to the Subscriptions Office). Galley proofs should be returned corrected to the Editorial Office by email (iiar@iiar-anticancer.org) within 24 hours.

Erratum. An erratum is published to correct any error(s) that might have been introduced to the article by the publisher during the publication process. Authors who may notice an error in the final published article should contact directly the Editorial Office.

Corrigendum. A corrigendum is published to change a part or to correct any error(s) that might have been introduced by the author(s). Authors should contact our Editorial Office, and our Editor will decide on the appropriate course of action.

Specific information and additional instructions for Authors

1. Anticancer Research (AR) closely follows the new developments in all fields of experimental and clinical cancer research by (a) inviting reviews on topics of immediate importance and substantial progress in the last three years, and (b) providing the highest priority for rapid publication to manuscripts presenting original results judged to be of exceptional value. Theoretical papers will only be considered and accepted if they bear a significant impact or formulate existing knowledge for the benefit of research progress.

2. Anticancer Research will consider the publication of conference proceedings and/or abstracts provided that the material submitted fulfils the quality requirements and instructions of the journal, following the regular review process by two suitable referees.

3. An acknowledgement of receipt, including the article number, title and date of receipt is sent to the corresponding author of each manuscript upon receipt. If this receipt is not received within 5 days from submission, the author should contact the Editorial Office to ensure that the manuscript (or the receipt) was not lost in the mail or during electronic submission.

4. Each manuscript submitted to AR is sent for peer-review (single-blind) in confidence to two-three suitable referees with the request to return the manuscript with their comments to the Editorial Office within 12 days from receipt. If reviewers need a longer time or wish to send the manuscript to another expert, the manuscript may be returned to the Editorial Office with a delay. All manuscripts submitted to AR, are treated in confidence, without access to any person other than the Managing Editor, the journal's secretary, the reviewers and the printers.

5. All accepted manuscripts are carefully corrected in style and language, if necessary, to make presentation clear. (There is no fee for this service). Every effort is made (a) to maintain the personal style of the author's writing and (b) to avoid change of meaning. Authors will be requested to examine carefully manuscripts which have undergone language correction at the pre-proof or proof stage.

6. Authors should pay attention to the following points when writing an article for AR:
   - The Instructions to Authors must be followed in every detail.
   - The presentation of the experimental methods should be clear and complete in every detail facilitating reproducibility by other scientists. • The presentation of results should be simple and straightforward in style. Results and Discussion should not be combined into one section. • Results given in figures should not be repeated in tables.
   - Photographs should be clear with high contrast, presenting the actual observation described in the legend and in the text. Each legend should provide a complete description, being self-explanatory, including technique of preparation, information about the specimen and magnification.
   - Statistical analysis should be elaborated wherever it is necessary. Simplification of presentation by giving only numerical or % values should be avoided.
   - Fidelity of the techniques and reproducibility of the results, should be points of particular importance in the discussion section. Authors are advised to check the correctness of their methods and results carefully before writing an article. Probable or dubious explanations should be avoided.
   - Authors should not cite results submitted for publication in the reference section. Such results may be described briefly in the text with a note in parenthesis (submitted for publication by… authors, year).
   - References. Each article should address, list and discuss the entire spectrum of current publications relevant to its field.
   - By following these instructions, Authors will facilitate a more rapid review and processing of their manuscripts and will provide the readers with concise and useful papers.

7. Following review and acceptance, a manuscript is examined in language and style, and galley proofs are rapidly prepared. Second proofs are not sent unless required.

8. Authors should correct their galley proofs very carefully and preferably twice. An additional correction by a colleague always proves to be useful. Particular attention should be paid to chemical formulas, mathematical equations, symbols, medical nomenclature etc. Any system of correction marks can be used in a clear manner, preferably in red. Additions or clarifications are allowed provided that they improve the presentation but do not bring new results (no fee).

9. All Authors will be asked to supply author contribution and conflict of interest forms.

10. Articles submitted to AR may be rejected without review if:
    - they do not fall within the journal's policy.
    - they do not follow the instructions for authors.
    - language is unclear.
    - results are not sufficient to support a final conclusion.
    - results are not objectively based on valid experiments.
    - they repeat results already published by the same or other authors before the submission to AR.
    - plagiarism is detected by plagiarism screening services.

    (Rejection rate (2022): 71%).

11. Authors who wish to prepare a review should contact the Managing Editor of the journal in order to get confirmation of interest in the particular topic of the review. The expression of interest by the Managing Editor does not necessarily imply acceptance of the review by the journal.

12. Authors may inquire information about the status of their manuscript(s) by calling the Editorial Office at +30-22950-53389, Monday to Friday 9.00-16.00 (Athens time), or by sending an e-mail to journals@iiar-anticancer.org

13. Authors who wish to organize and edit a special issue on a particular topic should contact the Managing Editor.

14. Authors, Editors and Publishers of books are welcome to submit their books for immediate review in AR. There is no fee for this service.

(This text is a combination of advice and suggestions contributed by Editors, Authors, Readers and the Managing Editor of AR).

Copyright© 2023 – International Institute of Anticancer Research (G.J. Delinasios). All rights reserved (including those of translation into other languages). No part of this journal may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, microfilming, recording or otherwise, without written permission from the Publisher.

Clin. Lab. 2020;66:1045-1049
©Copyright

ORIGINAL ARTICLE

Thymidine Kinase-1 as Additional Diagnostic Marker of Prostate Cancer

Lenka Hanousková [1], Jakub Řezáč [2], Štěpán Veselý [2], Richard Průša [1], Karel Kotaška [1]

[1] *Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Charles University, Second Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic*
[2] *Department of Urology, Charles University, Second Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic*

SUMMARY

Background: **Thymidine kinase-1 (TK-1) is associated with proliferation and malignancy and has been extensively studied as a diagnostic biomarker for a variety of tumors, but there are limited data for prostate cancer.**
Methods: **TK-1 concentrations in serum were measured in 59 patients with prostate cancer (mean age 68 years) and in the control group of 28 healthy men (mean age 63 years) using commercially available enzymatic immuno-assay (LSBio, Inc., Seattle, WA, USA). The patients were divided with respect to the severity of the disease into two groups according to the European Association of Urology (EAU) guidelines (Stage 1, 2 - less severe tumors, stage 3 - severe tumors).**
Results: **Serum thymidine kinase-1 concentrations were significantly elevated in the group of the patients with prostate cancer compared to the healthy individuals (0.204 pmol/L vs. 0.072 pmol/L, with $p < 0.0001$). Diagnostic efficiency of serum TK-1 concentrations was 0.792 with the specificity of 53.6% and sensitivity of 94.9%. Patients with less severe tumors (Stage 1, 2) and severe tumors (Stage 3) had significantly increased levels of TK-1 as well ($p < 0.0001$). Combination of TK-1 and PSA investigation in patients with PCa improve the diagnostic validity of TK-1 (AUC = 0.87).**
Conclusions: **Concentrations of thymidine kinase 1 are increased in all patients with prostate cancer and even more in patients with severe prostate cancer. Thymidine kinase 1 appears to be a promising additional diagnostic marker promising in patients with prostate cancer.**
(Clin. Lab. 2020;66:1045-1049. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2019.191026)

Correspondence:
Karel Kotaška
Department of Medical Chemistry and
Clinical Biochemistry
2nd Faculty of Medicine
Charles University
University Hospital Motol
V Úvalu 84
150 06 Prague 5
Czech Republic
Email: kotaska@email.cz

Manuscript accepted November 27, 2019

KEY WORDS

prostate cancer, thymidine kinase-1

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one the most frequent malignancy of men and the third most common cause of death in Czech Republic men [1]. Currently, prostate-specific antigen (PSA) is the most widely used conventional serum marker including serum free PSA and fPSA/tPSA ratio. PSA velocity, PSA density, [-2] proPSA, and prostate health index (PHI) improve specificity, but values of these biomarkers might be affected by many processes [1,2]. Despite all of these markers, 100% conclusively precise diagnostic test for PCa has not yet been introduced. Thymidine kinase is an en-

zyme, a phosphotransferase (a kinase): 2'-deoxythymidine kinase, ATP-thymidine 5'-phosphotransferase. It is present in two forms in mammalian cells, TK-1 and TK-2. Two human TK genes encode two isoenzymes. The first form, TK-1, is located on chromosome 17q-25.3. TK-1 is present in the cytoplasm of cells and TK-1 is dependent on cell cycle. The second form is mitochondrial enzyme TK-2. This form is located on chromosome 16q21 and is cell cycle-independent [3,4]. TK-1 has been extensively studied as a diagnostic biomark-er for a variety of cancer types, because TK-1 is the biomarker of proliferation and is involved in the pathway of DNA precursor synthesis [5-7]. TK-1 has been expressed in proliferating and malignant cells [6,8]. Elevated TK-1 activities or concentrations have been found in many tumors including gastric, ovary, cervical, esophageal, lung, prostate, and breast cancers [9].
The aim of our study was to investigate serum levels of TK-1 as a potential diagnostic biomarker in patients with prostate cancer.

MATERIALS AND METHODS

The serum samples of patients with prostate cancer were obtained in the morning before prostatectomy. The cancer diagnosis was performed by histological examination of tumor specimens obtained by prostate resection. The samples of patients and healthy individuals were aliquoted and frozen immediately and kept at -70°C until TK-1 was analyzed. Serum concentrations of TK-1 were measured in 59 patients (mean age 68, range 45 - 82 years) with prostate cancer, and the con-trol group consisting of 28 healthy men (mean age 63 years, range 54 - 78 years) with non-malignant etiology of the disease including benign prostate hyperplasia. All subjects were informed about the project and signed an informed consent. The characteristics of the patients and healthy subjects are summarized in Table 1. Serum TK-1 levels were assayed using a commercially available immunoassay ELISA kit (LSBio, Inc., Seattle, WA, USA). The analytical parameters of the kit were: detection limit 0.063 pmol/L and working range 0.063 -4.0 pmol/L (intra-assay CV = 5.3%/inter-assay CV = 8.6%). Serum PSA levels were assayed using the electrochemiluminescence sandwich immunoassay on the Cobas e6000 analyzer (Hitachi, High Technology Corp., Tokyo, Japan). The patients were previously clinically investigated and classified according the TNM classification [3]. For further investigation, the patients were divided into two groups according to the severity of the disease. The first group consisted of patients with less severe tumors (Stage 1 and 2), and the second group consisted of patients with severe tumors (Stage 3).

Statistical analysis

The differences between the subgroups were tested for the statistical significance by the nonparametric Mann-Whitney test. A value of $p < 0.005$ was considered statistically significant. Receiving operating curve (ROC) analysis was used to examine the diagnostic efficiency. Analysis of variance was used to evaluate the correlation of TK-1 levels with age and PSA levels. The statistical software MedCalc version: 18.02.01 (Ostende, Belgium) was used for the statistical analysis.

RESULTS

The serum levels of thymidine kinase-1 in patients with prostate cancer were significantly increased compared with the control group of healthy men (median = 0.204 pmol/L vs. median = 0.072 pmol/L, $p < 0.0001$, Mann-Whitney test, Figure 1). Diagnostic efficiency of serum TK-1 expressed as AUC calculated from the ROC analysis was 0.792 (specificity = 53.6% and sensitivity = 94.9%) (Figure 2). The serum levels of TK-1 in patients with pT1, 2 and pT3 stages were significantly increased compared with the control group ($p < 0.0001$ and $p = 0.0026$, respectively, one-way analysis of variance) (Figure 3). The AUC for the combination of TK-1 and PSA is higher than those for the individual TK-1 (AUC = 0.87 vs. AUC = 0.79, $p = 0.19$) (Figure 4).

DISCUSSION

The results of the pilot study confirmed the relevant role of TK-1 in the prostate cancer diagnosis.
We proved that the serum levels of TK-1 were significantly increased in the patients with prostate cancer compared with the healthy individuals. These results correlate with results of other studies [6,8]. These findings correlated with the results previously published in study of Jagarlamundi et al. [6] with AUC = 0.88, sensitivity = 0.64, and specificity = 0.96. The presented study showed very good diagnostic efficiency of serum TK-1 values (AUC = 0.79, with specificity 54% and sensitivity 95%). The differences in AUC found in our study and in study of Jagarlamundi et al. are not significant ($p = 0.14$).
These results show that investigation of serum TK-1 levels indicate that the determination of TK-1 concentration in serum might be a useful test even for the screening of individuals for prostate cancer risk. Recent publications mentioned the investigation of catalytic activity of TK-1 with respect to the tumor proliferation and progression; nevertheless, the diagnostic power of the TK-1 concentration seems to be higher than for the TK-1 catalytic activity. TK-1 concentrations show greater sensitivity for the solid tumors and show more consistent TK-1 values in different disease types [7]. We found significant differences between serum TK-1 concentrations in control group of healthy individuals and patients according to the pT1 and 2, and pT3 clinical stages ($p < 0.0001$ and $p = 0.0026$, respectively). These results correlate with the fact, that TK-1 expres-

Table 1. Characteristics of patients and healthy subjects.

	Control group (n = 28)	Patients (n = 59)	p-value
Mean age (range)	64 (55 - 78)	68 (45 - 82)	-
S-TK-1 (pmol/L)	0.072 (0.063 - 0.364)	0.204 (0.063 - 1.40)	< 0.0001
PSA (µg/L)	1.25 (0.29 - 2.34)	7.32 (3.02 - 19.27)	< 0.0001

Age expressed as mean (min - max); concentrations S-Thymidine kinase-1 and PSA are expressed as median (min - max), p-value is calculated with the Mann-Whitney test.

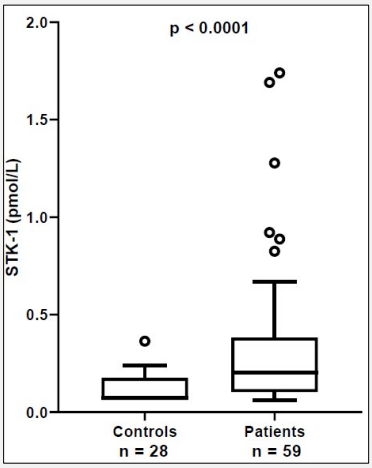


Figure 1. Serum TK-1 levels in healthy individuals and patients with prostate cancer (pmol/L).

Results are expressed as box-and-whisker plots with medians (IQR, 25th - 75th percentiles).

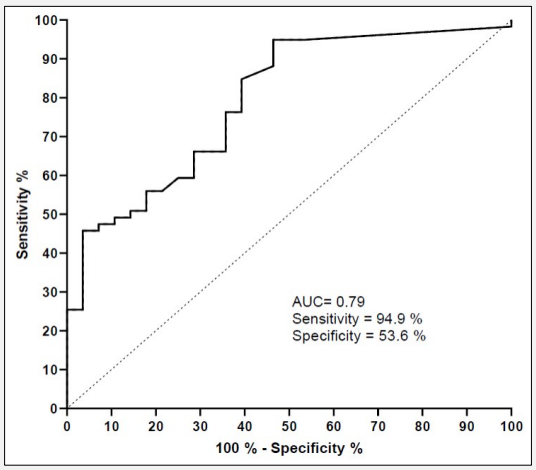


Figure 2. Diagnostic efficiency of TK-1.

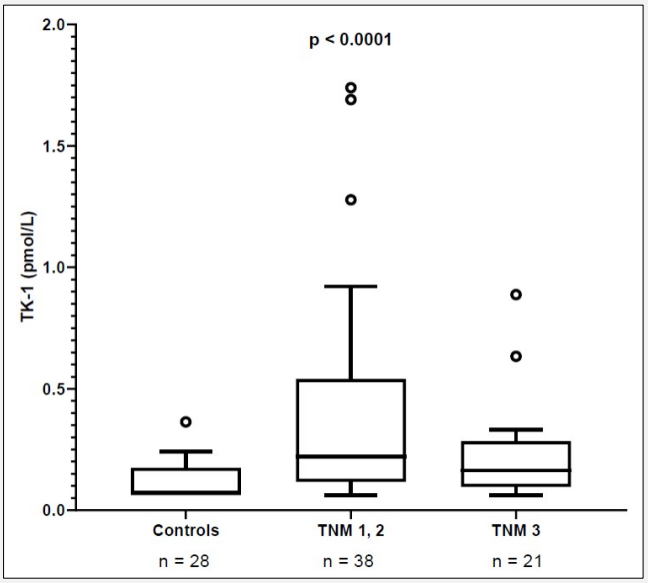


Figure 3. Serum TK-1 levels in patients with less severe and severe prostate cancer tumors.

Results are expressed as box-and-whisker plots with medians (IQR, 25th - 75th percentiles).

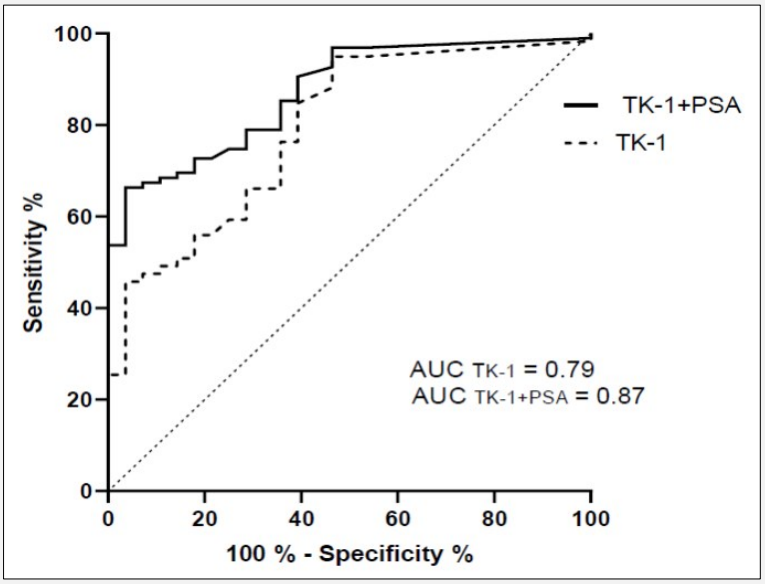


Figure 4. The diagnostic performance of TK-1 and PSA in patients with CaP.

sion is mostly associated with tumor proliferation. Recent publications also show the association of TK-1 concentrations with the grading of the disease according to the Gleason score (GS). We found significant differences between control group of healthy individuals and patients with GS = 5 + 6 and GS = 7 ($p = 0.002$ and $p < 0.0001$, respectively) as well. The results of our study were consistent with those published by Jagarlamudi et al. and Li et al. [6,8], which demonstrated that TK-1 levels correlate with the Gleason score. We also found that serum TK-1 levels are not significantly associated with PSA levels and age ($p = 0.41$, analysis of variance). We also confirmed that the AUC for the combination of TK-1 and PSA is higher than for the individual TK-1 (AUC = 0.87 vs. AUC = 0.79, $p = 0.19$). This finding lead to the opinion, that the combination of S-TK-1 and PSA investigation in patients with PCa improved the diagnostic validity of TK-1.

We also investigated other possible prostate cancer biomarkers (endoglin, TIMP-1, SPINK-1, chromogranin A and annexin A3), but none of them showed significant diagnostic power compared to TK-1 (AUC varied from 0.51 to 0.62). Our previous study confirmed that investigation of mindin levels in serum seems to be relevant for the diagnosis of prostate cancer. The concentrations of mindin in patients with prostate cancer are significantly decreased compared with the control group with AUC = 0.70 and are also correlated with the Gleason score and the staging of the cancer [10].

The presented study is just a pilot study, and our results need to be confirmed with a larger number of samples. It is important to emphasize, that TK-1 concentrations are assay dependent.

CONCLUSION

Concentrations of thymidine kinase-1 in serum are increased in patients with prostate cancer. They are not significantly related to the age and PSA levels. TK-1 appears to be a promising additional diagnostic marker useful in the diagnosis of prostate cancer.

Acknowledgment:
Supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic).

Declaration of Interest:
The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

References:

1. Geryk E, Dítě P, Kozel J, et al. Other primary neoplasm in patients with prostate cancer in comparison of its incidence, mortality and prevalence. Onkologie 2010;4(2):89-94. https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/02/08.pdf

2. Ayyildiz SN, Ayyildiz A. PSA, PSA derivatives, proPSA and prostate health index in the diagnosis of prostate cancer. Turk J Urol 2014;40(2):82-8 (PMID: 26328156).

3. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol 2008;53(1):68-80 (PMID: 17920184).

4. Aufderklamm S, Todenhofer T, Gakis G, et al. Thymidine kinase and cancer monitoring. Cancer Lett 2012;316(1):6-10 (PMID: 22 068047).

5. Karlstrom AR, Neumuller M, Gronowitz JS, Kallander CF: Molecular forms in human serum of enzymes synthesizing DNA precursors and DNA. Mol Cell Biochem 1990;92(1):23-35 (PMID: 2155379).

6. Jagarlamudi KK, Hansson LO, Eriksson S. Breast and prostate cancer patients differ significantly in their serum Thymidine kinase 1 (TK1) specific activities compared with those hematological malignancies and blood donors: implications of using serum TK1 as a biomarker. BMC Cancer 2015;15:66 (PMID: 258810 26).

7. Jagarlamudi KK, Shaw M. Thymidine kinase 1 as a tumor biomarker: technical advances offer new potential to an old biomarker. Biomark Med 2018, 12(9):1035-48 (PMID: 30039979).

8. Li S, Zhou J, Wang Y, Zhang K, et al. Serum thymidine kinase 1 is associated with Gleason score of patients with prostate carcino-ma. Oncol Lett 2018;16(5):6171-80 (PMID: 30333882).

9. Xiang Y, Zeng H, Liu X, et al. Thymidine kinase 1 as a diagnos-tic tumor marker is of moderate value in cancer patients: A meta-analysis. Biomed Rep 2013;1(4):629-37 (PMID: 24648999).

10. Hanouskova L, Řezáč J, Veselý Š,et al. Diagnostic benefits of mindin as a prostate cancer biomarker. Journal of Medical Biochemistry 2019 (Ahead of Print). https://content.sciendo.com/view/journals/jomb/ahead-of-print/article-10.2478-jomb-2019-0008.xml

View publication stats

sciendo

J Med Biochem 2019; 38 DOI: 10.2478/jomb-2019-0008

UDK 577.1 : 61 ISSN 1452-8258

J Med Biochem 38: 1–4, 2019

Short Communication
Kratko saop{tenje

DIAGNOSTIC BENEFITS OF MINDIN AS A PROSTATE CANCER BIOMARKER
DIJAGNOSTI^KE PREDNOSTI MINDINA KAO BIOMARKERA RAKA PROSTATE

Lenka Hanousková[1], Jakub Řezá~[2], [těpán Veselý[2], Richard Prů{a[1], Karel Kota{ka[1]

[1]Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Charles University, Second Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic
[2]Department of Urology, Charles University Second Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Summary

Background: It has been shown that decreased expression and activity of extracellular matrix protein mindin correlate with various types of cancers including breast, colon and lung cancers. The aim of the presented study was to investigate the serum mindin levels in prostate cancer.
Methods: Mindin concentrations in serum were measured in 56 patients with prostate cancer (mean age 68 years) and in control group of 29 healthy men (mean age 64 years) using commercially available enzymatic immunoassay (Cusabio, WuHan, China). The patients were divided with respect to the severity of the disease into two groups according to the EAU guidelines (stage 1, 2 – less severe tumours, stage 3, 4 – severe tumours).
Results: Serum mindin concentrations were significantly elevated in the group of healthy individuals unlike in the patients with prostate cancer (2.12 ng/mL vs 0.78 ng/mL, with P=0.0007, AUC=0.705). Patients with less severe tumours (stage 1, 2) and severe tumours (stage 3, 4) had significantly decreased levels of S-mindin as well (P=0.0037), although the difference in serum mindin concentrations between the patients with less severe and severe tumours was not significant.
Conclusions: Concentrations of mindin were decreased in patients with prostate cancer and reduced in patients with less severe prostate cancer as well. Mindin appears to be a promising diagnostic marker useful in the diagnosis of prostate cancer.

Keywords: mindin, prostate cancer, biomarker

Kratak sadr`aj

Uvod: Pokazalo se da je smanjena ekspresija i aktivnost ekstracelularnog proteinskog matriksa mindina korelira sa razli~itim tipovima raka, uklju~uju}i rak dojke, debelog creva i plu}a. Cilj prikazane studije je bio da se ispita serumski nivo mindina kod karcinoma prostate.
Metode: Koncentracije mindina u serumu su merene kod 56 bolesnika sa karcinomom prostate (srednja starost 68 godina) i u kontrolnoj grupi od 29 zdravih mu{karaca (srednja starost 64 godine) kori{}enjem komercijalno dostupnog enzimskog testa (Cusabio, VuHan, Kina). Pacijenti su prema te`ini bolesti podeljeni u dve grupe prema EAU smernicama (faza 1, 2 – manje te{ki tumori, faza 3, 4 – te{ki tumori).
Rezultati: Koncentracije serumskog mindina bile su zna~ajno povi{ene u grupi zdravih pojedinaca, za razliku od pacijenata sa rakom prostate (2,12 ng/mL u odnosu na 0,78 ng/mL, sa P=0,0007, AUC=0,705). Pacijenti sa manje ozbiljnim tumorima (faza 1, 2) i te{kim tumorima (faza 3, 4) imali su i zna~ajno sni`ene nivoe S-mindina (P=0,0037), iako razlika u koncentracijama mindina u serumu izme u pacijenata sa manje te{kim i ozbiljnim tumori nije bila zna~ajna.
Zaklju~ak: Koncentracije mindina su smanjene kod pacijenata sa rakom prostate, a smanjene su i kod pacijenata sa manje te{kim oblikom raka prostate. Izgleda da je mindin obe}avaju}i dijagnosti~ki marker i da je koristan u dijagnostici raka prostate.

Klju~ne re~i: mindin, rak prostate, biomarker

Address for correspondence:
Karel Kota{ka
Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry
2nd Faculty of Medicine, Charles University
University Hospital Motol
V Uvalu 84
150 06 Prague 5

List of abbreviations: AUC, Area under the curve; CV, Coefficient of variation; EAU, European Association of Urology; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; IQR, interquartile range; Pca, prostate carcinoma; PHI, prostate health index; PSA, Prostate-specific antigen; PSADT, Prostate-specific antigen doubling time; ROC, Receiver operating characteristics.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is one the most frequently diagnosed tumours of men and the third most common cause of cancer death of Czech men (1). Currently, the only biomarker in wide clinical use for the diagnosis and prognosis of prostate cancer is the prostate-specific antigen (PSA). Other markers useful for the diagnostics of prostate cancer are free PSA and Free/Total PSA ratio, complexed PSA, pro PSA - 2proPSA and Prostate Health Index (PHI). Total PSA, % fPSA, f/tPSA, and other PSA derivatives, PSAD, PSA velocity, PSADT, age-specific PSA do not decrease the number of unnecessary biopsies performed for diagnostic purposes. Despite all of these markers, a 100% conclusively precise diagnostic test for PCa has not been introduced yet (2).

PSA can be detected in the serum of a blood sample and is considered to be currently the most useful tumour marker (3). PSA can be used for prostate cancer screening and monitoring of the response to the treatment. PSA seems to be useful for the detection of prostate cancer of the men whose total PSA concentration in the 4–10 mg/L range (4). Investigation of the serum PSA levels does not have a direct correlation with increasing grade and stage of prostate cancer (5). 20 % of patients have PSA levels less than 4 mg/L, 25 % of the patients have PSA levels in the interval of 4–10 mg/L. Moreover, some aggressive forms of prostate cancer can be PSA negative (6). Due to the limitations of PSA as a biomarker, there is still a need for new biomarkers that can be used as prognostic indicators of prostate cancer for effective differentiation between indolent and aggressive disease (7).

Mindin, also called spondin 2, is an extracellular matrix protein which is encoded by the SPO2 gene located in the chromosome 4p16.3. Spondin 2 belongs to the F-spondin family of secreted extracellular matrix proteins. The members of F-spondin family have three domains: FS1 (for F-spondin), FS, and thrombospondin type 1 repeats. Mindin exerts a broad spectrum of effects on the innate immune system and its role in cancer is currently investigated (8). Recently, mindin is mentioned as a candidate biomarker for prostate cancer diagnosis (9).

The study aimed to investigate serum levels of mindin as a potential diagnostic biomarker in patients with prostate cancer.

Materials and Methods

Serum samples of patients with prostate cancer were obtained in the morning before prostatectomy. The cancer diagnosis was performed by histological examination of tumour specimens obtained by prostate resection. The samples of patients and healthy individuals were frozen immediately, aliquoted and kept at -70 °C until mindin was analyzed. Serum concentrations of mindin were measured in 56 patients (mean age 68 years, range 45–82 years) with prostate cancer, and in the control group consisting of 29 healthy men (mean age 64 years, range 55–78 years). Informed consent was obtained for all of the individuals included in the study. The characteristics of the patients and healthy subjects are summarized in *Table I*.

Serum mindin levels were assayed using commercially available immunoassay technique ELISA kit (Cusabio, WuHan, China). The analytic characteristics of the diagnostic kit were as follows: detection limit 0.78 ng/mL and working range 3.12–200 ng/mL, with a mean coefficient of variation (CV)=11%. The patients were previously clinically investigated and classified according to the European Association of Urology (EAU) guidelines (10). For further investigation, the patients were divided into two groups according to the severity of the disease. The first group consisted of patients with less severe tumours (stages 1 and 2), the second group consisted of patients with severe tumours (stages 3 and 4).

Results

Differences between subgroups were tested for statistical significance by the nonparametric Mann-Whitney test. The value of $P<0.005$ was considered statistically significant. Receiving operation analysis (ROC) was used to investigate the diagnostic efficiency. The analysis of variance was used to evaluate the relationship of mindin levels with the age and PSA levels. Statistical software MedCalc version: 18.02.01 (Ostende, Belgium) was used for statistical analysis.

Serum levels of mindin in patients with prostate cancer were significantly decreased in the control group expressed as medians (2.12 ng/mL vs 0.78 ng/ml, P=0.0007, Mann-Whitney test, *Figure 1*). Diagnostic efficiency of serum mindin expressed as AUC calculated from the ROC analysis was 0.705 (specificity=73 % and sensitivity=64 %) (*Figure 2*). Serum levels of mindin in patients with less severe tumours (stages 1 and 2) and severe tumours (stages 3 and 4) were significantly decreased compared with the control group as well. (P=0.0037, One-way analysis of variance, *Figure 3*).

Discussion

The results of the pilot study confirm the relevant role of mindin in the prostate cancer diagnosis. We proved that the serum levels of mindin were significantly decreased in patients with prostate cancer compared with healthy individuals. These results differ from the results of other studies showing elevated mindin levels in patients with prostate cancer

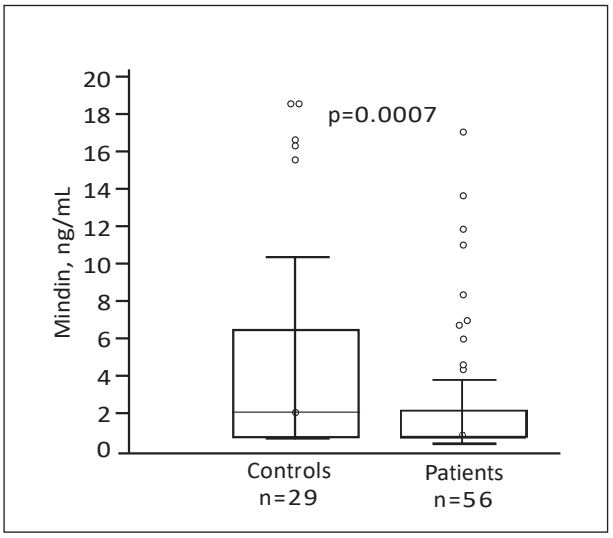


Figure 1 Serum mindin levels in healthy individuals and patients with prostate cancer.
Results are expressed as Box-and-whisker plots with medians (IQR 25. – 75. percentile).

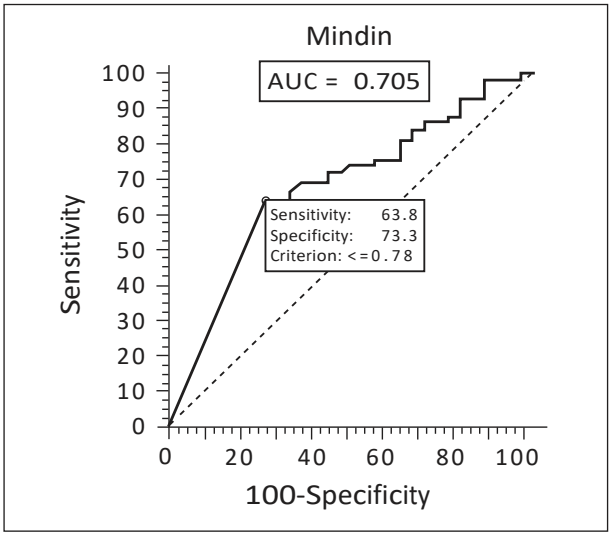


Figure 2 Diagnostic efficiency of mindin.

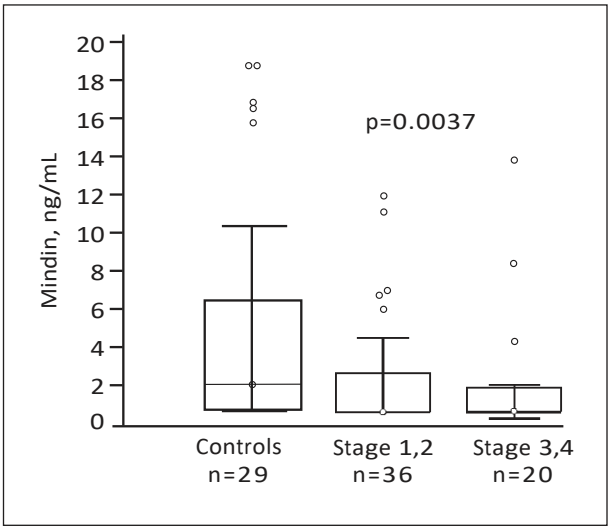


Figure 3 Serum mindin levels in patients with less severe and severe prostate cancer tumours.
Results are expressed as Box-and-whisker plots with medians (IQR 25. – 75. percentile)
Stage 1, 2 – patients with less severe tumours
Stage 3, 4 – patients with severe tumours

(11, 12, 14). Presented results are in concordance with the study of Wang et al. (8) showing significantly decreased serum mindin in tumour lesions of patients compared with adjacent control tissues by colon, lung, gastric, oesophageal, and breast cancer. Wang et al. (8) mentioned an important role of EGR-1, which directly regulates mindin expression at the transcriptional level, and this regulates both mindin mRNA and protein expression in vitro to further define EGR-1 mediated regulation of mindin expression. The relationship between EGR-1 expression and prostate cancer was previously mentioned. Gregg et al. showed that EGR-1 is downregulated in patients with prostate carcinoma according to their clinical considerations (18 of 20 patients in pT2 and pT3 clinical stages showed normal or downregulated EGR-1 expression) (12). Contrary to the previously mentioned reports of Wang et al. (8) and Gregg et al. (12), studies of other authors showed that in patients with prostate cancer EGR-1 stimulates tumour cell growth and its expression level increases with the degree of malignancy (11, 13). This seems to be specific to the prostate tumour cells because, in mammary and lung tumours as well as most normal tissues, EGR-1 expression is low. This contradictory findings regarding EGR-1 expression confirmed the bivalent role of EGR-1 either as a tumour suppressor or oncogene with respect to EGR-1 regulation and the degree of the malignancy.

Our results show good diagnostic sensitivity of mindin with AUC of 0.705. We prove that serum mindin levels are not dependent on the PSA levels, and the age (P=0.42, analysis of variance). The serum levels of mindin differ in patients with prostate cancer. We found significant differences between serum mindin concentrations related to the staging of cancer. The patients with less severe tumours belonging to stages 1 and 2 had lower serum mindin level than patients with severe tumours stages 3 and 4 as shown in *Figure 3*. These results correlate with the results found in other cancer types presented by Wang et al., (8) who presented decreased levels in patients with less severe tumours belonging to stages 1 and 2. In our study, the difference between patients in stages 1 and 2 and 3 and 4 is not significant.

The presented study is a pilot study, and thus the results need to be confirmed on a large number of samples. Various enzymatic immunoassays used for

mindin evaluation show discrepant results, as indicated in the presented study and the study of Wang et al. (8) with similar results, which are different from the study of Luccarelli et al. (14). This finding seems to indicate that the concentrations of mindin in patients with prostate cancer are assay dependent.

The concentration of mindin is decreased in patients with prostate cancer. Mindin concentration is not related to the age and PSA levels. Mindin appears to be a promising diagnostic marker useful in the diagnosis of prostate cancer.

Acknowledgements. Supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic).

Conflict of interest statement

The authors stated that they have no conflicts of interest regarding the publication of this article.

References

1. Geryk E, Dítě P, Kozel J, [tampach R, Kubí~ek P, Odehnal J: Other primary neoplasm in patients with prostate cancer in comparison of its incidence, mortality and prevalence. Onkologie 2010, 4(2): 89–94.
2. Ayyildiz SN, Ayyildiz A: PSA, PSA derivatives, proPSA and prostate health index in the diagnosis of prostate cancer. Turk J Urol 2014, 40(2): 82–88.
3. Bickers B, Aukim-Hastie C: New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer—the post PSA era. Anticancer Res 2009, 29(8): 3289–98.
4. Buhmeida A, Pyrhonen S, Laato M, Collan Y: Prognostic factors in prostate cancer. Diagn Pathol 2006, 1:4.
5. Shariat SF, Canto EI, Kattan MW, Slawin KM: Beyond prostate-specific antigen: new serologic biomarkers for improved diagnosis and management of prostate cancer. Rev Urol 2004, 6(2): 58–72.
6. Pryor MB, Schellhammer PF: The pursuit of prostate cancer in patients with a rising prostate-specific antigen and multiple negative transrectal ultrasound-guided prostate biopsies. Clin Prostate Cancer 2002, 1(3): 172–6.
7. Jeli} M, Mandi} A, Kladar N, Sudji J, Bo`in B, Srdjenovi} B. Lipid Peroxidation, Antioxidative Defense and Level of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine in Cervical Cancer Patients. J Med Biochem 2018; 37: 336–45.
8. Wang LF, Liu YS, Yang B, Li P, Cheng XS, Xiao CX, Liu JJ, Li S, Ren JL, Guleng B: The extracellular matrix protein mindin attenuates colon cancer progression by blocking angiogenesis via Egr-1-mediated regulation. Oncogene 2018, 37(5): 601–15.
9. Qian X, Li C, Pang B, Xue M, Wang J, Zhou J: Spondin-2 (SPON2), a more prostate-cancer-specific diagnostic biomarker. PLoS One 2012, 7(5): e37225.
10. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F: EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol 2008, 53(1): 68–80.
11. Gitenay D, Baron VT: Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy? Future Oncol 2009, 5(7): 993–1003.
12. Gregg JL, Brown KE, Mintz EM, Piontkivska H, Fraizer GC: Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. BMC Cancer 2010 10:165.
13. Parra E, Ortega A, Saenz L: Down-regulation of Egr-1 by siRNA inhibits growth of human prostate carcinoma cell line PC-3. Oncol Rep 2009, 22(6): 1513–8.
14. Lucarelli G, Rutigliano M, Bettocchi C, Palazzo S, Vavallo A, Galleggiante V, Trabucco S, Di Clemente D, Selvaggi FP, Battaglia M et al.: Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. J Urol 2013, 190(6): 2271–7.

Received: February 4, 2019

Accepted: February 20, 2019