

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**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**

Jakub Řezáč

Praha, 2024

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Experimentální chirurgie na *Urologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole*.

Školitel: *doc. MUDr. Otakar Čapoun, Ph.D., FEBU, Urologická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice*

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Experimentální chirurgie dne v odhod.
Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

Prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc., I. chirurgická klinika – břišní, hrudní a úrazové chirurgie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice

Děkan fakulty: *prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.*

Tato práce vznikla za podpory grantu 00064203 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

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 trvajících 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	7
2. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	8
3. METODIKA.....	11
3.1 Charakteristika souboru pacientů a odběru vzorků.....	11
3.2 Výběr onkomarkerů a charakteristika metod	11
3.2.1 Studie 1: Stanovení annexinu, SPINK–1, TIMP, chromograninu A, endoglinu a TK1	12
3.2.2 Studie 2: Stanovení mindinu.....	15
3.2.3 Studie 3: Stanovení thymidinkinázy 1 (TK1) – rozšířená studie.....	16
3.2.4 Studie 4: Stanovení epitopu TK210 u thymidinkinázy 1 (TK1)	16
3.3 Statistické metody	17
4. VÝSLEDKY	18
4.1 Studie 1 – Stanovení annexinu, SPINK–1, TIMP, chromograninu A, endoglinu a TK1.....	18
4.2 Studie 2 – Stanovení mindinu	19
4.3 Studie 3 – Stanovení TK1 – rozšířená studie	20
4.4 Studie 4 – stanovení epitopu TK210.....	22
5. DISKUSE	22
6. ZÁVĚR.....	26
7. SOUHRN.....	27
8. SUMMARY	28
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	29
10. PUBLIKAČNÍ AKTIVITA DOKTORANDA	31
10.1. Publikační aktivita doktoranda, která je podkladem disertace	31
10.2. Publikační aktivita doktoranda bez přímého vztahu k tématu disertace	32

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

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.⁴ Zlom v diagnostice představoval rok 1970 a objevení glykoproteinového enzymu prostatického specifického antigenu (PSA). 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),

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 nepřetržité množství studií hledajících tento „ideální“ onkomarker.

Předkládaná disertační práce je zaměřena na nové potenciální markery KP a na využití imunoanalytických metod, konkrétně sendvičového enzymově vázaného imunisorbentního testu (enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA). Ačkoli je dnes známa asi stovka potenciálních sérových a močových markerů KP, žádnému z nich se dosud nepodařilo nahradit PSA.⁵

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. HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

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. V poslední době se objevila řada nových biomarkerů KP, některé jsou velmi nadějně, 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 specifitu. Vzhledem k přesvědčivým výsledkům analýzy TK1 jsme jako závěrečný cíl zvolili ověření právě této hypotézy. Měřeními 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 specifitu 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.

3. METODIKA

3.1 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 $\mu\text{g/l}$ 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 1. 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.

3.2 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.

Tabulka 1: 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 – iničiální prostatický specifický antigen; SD – standard deviation (směrodatná odchylka)

3.2.1 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.⁶

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).⁷ V případě KP byla popsána nadměrná exprese SPINK-1 oproti BHP.⁸

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.⁹ Dle klinických studií byly nalezeny zvýšené hladiny TIMP-1 v nádorových tkáních včetně KP.¹⁰

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.¹¹ Neuroendokrinní a malobuněčná varianta KP je obtížně zjištělná a souvisí s horší prognózou.¹²

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.¹³

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.¹⁴ 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.¹⁵ 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.¹⁶ Vysoké hladiny TK1 byly pozorovány v proliferujících a maligních buňkách.¹⁷

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 2.

Tabulka 2: 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 %
TK1	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, TK1 – thimidinkináza 1

3.2.2 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.¹⁸ 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 %.

3.2.3 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 %.

3.2.4 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.¹⁹

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 %.

3.3 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 $\alpha = 5 \%$.

4. VÝSLEDKY

4.1 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.

Tabulka 3: Výsledky annexin, SPINK–1, TIMP, chromogranin A, endoglin, TK1

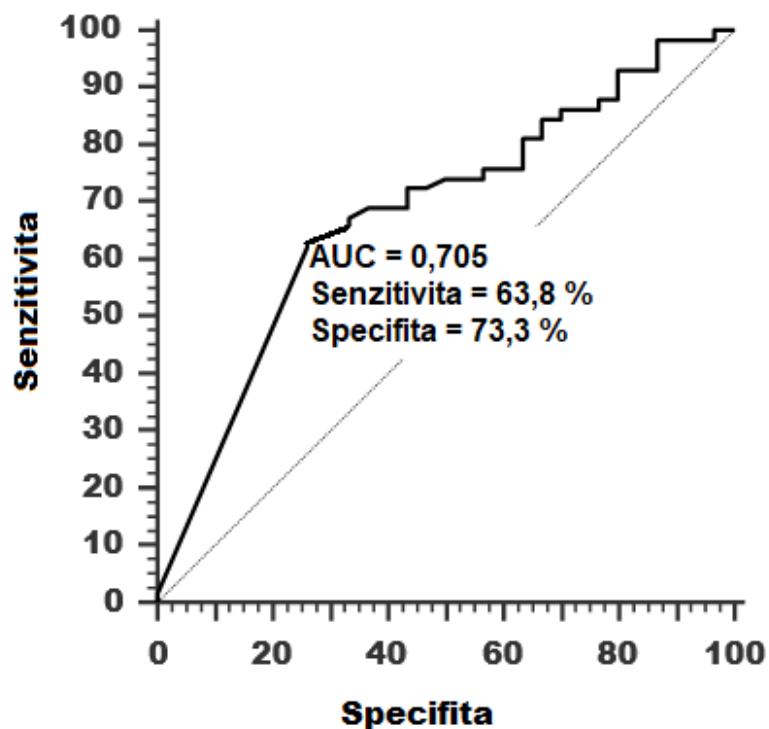
Biomarker	Kontrolní skupina (n = 30)	Pacienti (n = 58)	P value	AUC
S-chromogranin; pg/ml ± SD	114,50 ± 41,32	83,88 ± 88,61	0,16	0,59
U-SPINK-1; ng/ml ± SD	1,55 ± 1,72	1,59 ± 2,71	0,66	0,53
U-endoglin; ng/l ± SD	0,40 ± 0,27	0,38 ± 0,45	0,87	0,51
S-endoglin; ng/ml ± SD	0,84 ± 0,42	0,78 ± 0,32	0,91	0,51
U-annexin; ng/ml ± SD	0,18 ± 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

4.2 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, $p = 0,0007$). Dále jsme jeho diagnostickou účinnost vyjádřili pomocí Receiver Operating Characteristic (ROC) analýzy, kde vypočtená AUC byla 0,71, specifita 73 % a senzitivita 64 % (Obrázek 1).

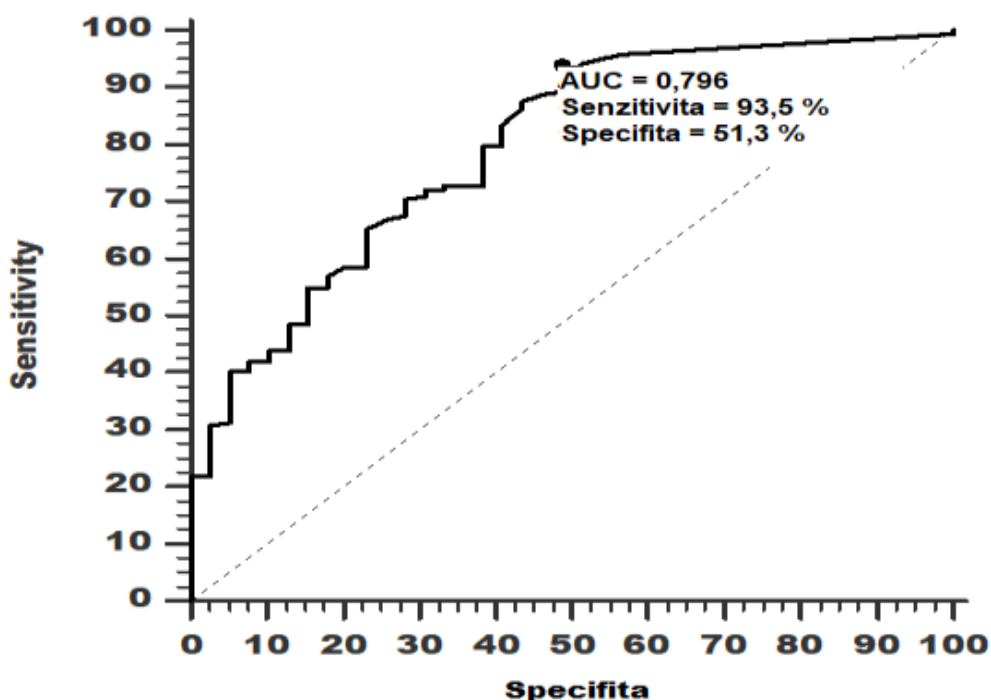


Obrázek 1: Diagnostická účinnost Mindinu

AUC – plocha pod křivkou

4.3 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. 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 (specifita = 51,3 % a senzitivita = 93,5 %) viz Obrázek 2.



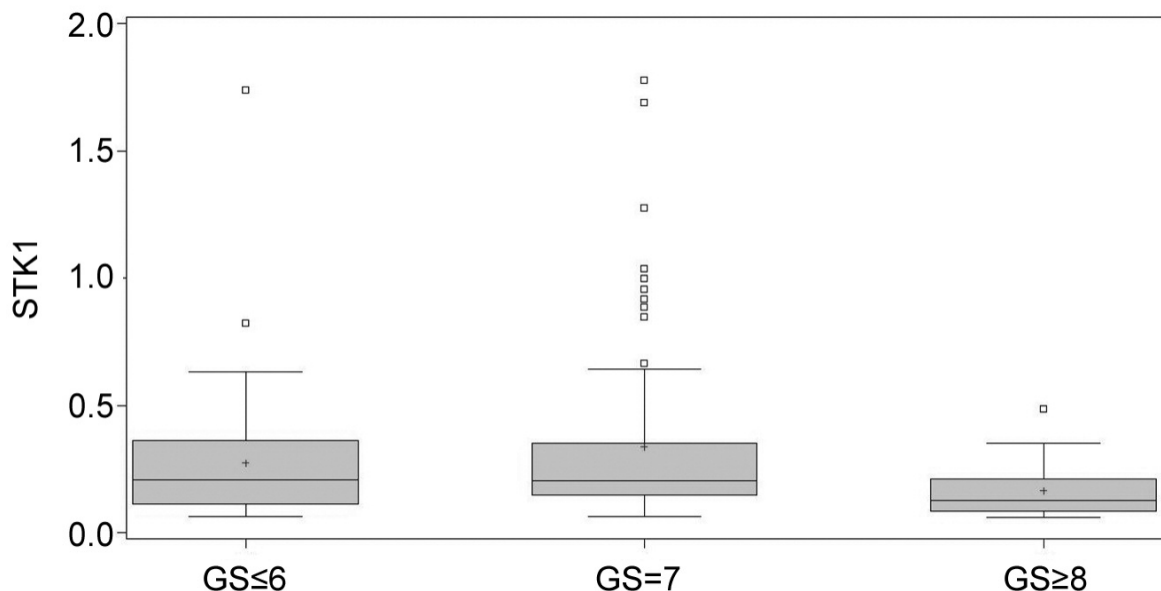
Obrázek 2: Diagnostická účinnost Thymidinkinázy 1

AUC – plocha pod křivkou

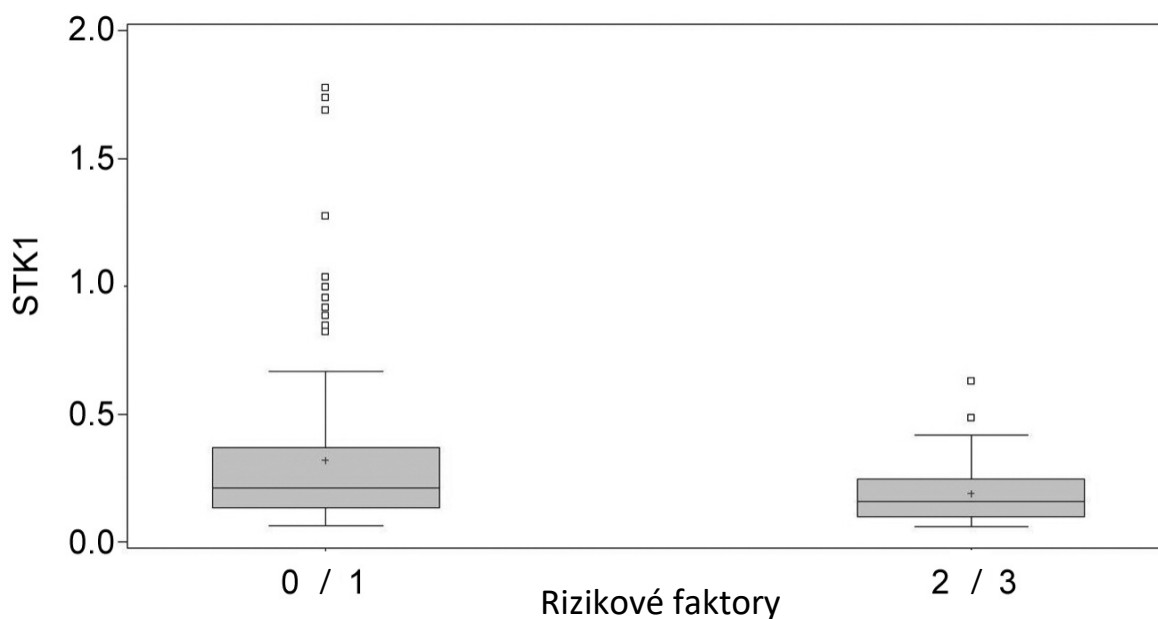
Při porovnání pacientů s GS ≤ 6 vs. 7 vs. ≥ 8 ($p=0,010$) jsme našli statisticky významné rozdíly (Obrázek 3), stejného výsledku jsme však nedosáhli při srovnání pacientů s GS ≤ 6 vs. ≥ 7 ($p=1,000$). Staging neprokázal žádný signifikantní rozdíl při porovnání stadií pT2 vs. pT3a vs. pT3b ($p=0,989$), ani při porovnání stadií pT2 vs. pT3a+pT3b ($p=1,0$). 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, $p=0,021$. Nejnížší 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 4). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.

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



Obrázek 3: Korelace mezi Gleasonovým skóre (GS) a sérovou hladinou Thymidinkinázy 1 (STK1) (pmol/l)



Obrázek 4: Korelace mezi počtem rizikových faktorů pro adjuvantní radioterapii (Gleasonovo skóre 8-10, pT3, pozitivní chirurgický okraj) a sérovou hladinou Thymidinkinázy 1 (STK1) (pmol/l)

4.4 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, $p = 0,6109$. Dle ROC analýzy byla diagnostická účinnost epitopu TK210 vypočtena jako AUC 0,54 (specifická = 80,7 % a senzitivita = 32,7 %)

5. 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 nepřehledné 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.

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 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.

V první analýze jsme na základě analýzy ROC posoudili diagnostickou účinnost biomarkerů ve vztahu ke KP. I přes nadějně 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 nadějně 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. 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.

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 studií, které naopak prezentovaly zvýšené hladiny mindinu u KP.^{20, 21}

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.²² 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.²³ 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). 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.²⁴ 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.

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.

Závěrečná, čtvrtá analýza, byla věnována opět TK1, respektive stanovení alternativního epitopu TK210. Dle dostupné literatury je pravděpodobné, že stanovení epitopu TK210 vykazuje vyšší specifitu 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 0,78.¹⁹ 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.

6. 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 specifity 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.

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.

7. 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 zachytu všech stadií KP, ale především v zachytu 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. Nejpersvědčivější 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.

8. 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.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- 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 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.
- 5 Filella X, Foj L. Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2015; 53(7): 963-973.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 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.

- 12 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.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 Sherley, J, Kelly TJ. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem.* 1988; 263(17):8350-8.
- 16 Chang ZF and Huang DY: The regulation of thymidine kinase in HL-60 human promyeloleukemia cells. *J Biol Chem.* 1993; 268(2):1266-71.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 Qian, X, Li, C, Pang, B et al. Spondin-2 (SPON2), a more prostate-cancer-specific diagnostic biomarker. *PLoS One.* 2012;7(5):e37225.
- 22 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.

23 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.

24 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.

10. PUBLIKAČNÍ AKTIVITA DOKTORANDA

10.1. Publikační aktivita doktoranda, která je podkladem disertace

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

2. **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)**

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

4. 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)**

5. 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)**

10.2. Publikační aktivita doktoranda bez přímého vztahu k tématu disertace

1. **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)**
2. **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.
3. 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)**
4. **Řezáč J**, Hrušková Z, Konopásek P, Honsová E, Mašek M, Ryšavá R, Tesar 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.

