

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Ústav klinické a molekulární patologie

Mgr. Zlata Hušková

Biomarkery, tekutá biopsie a studium steroidních derivátů u karcinomu prostaty

Dizertační práce

Školitel: Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.

Studijní obor: Lékařská biologie

Olomouc 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou dizertační práci vypracovala samostatně v průběhu doktorského studia pod vedením Mgr. Jany Steigerové, Ph.D. s použitím citované literatury uvedené v závěru práce.

Klinická data potřebná pro provedené studie byla získána ve spolupráci s Urologickou klinikou (MUDr. Milan Král, Ph.D.) a Onkologickou klinikou (MUDr. Hana Študentová, Ph.D.) Fakultní nemocnice Olomouc.

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Lékařská biologie na Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, s podporou projektů Ministerstva zdravotnictví ČR (15-28628A a NU20-03-00201) a interních grantů Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Mgr. Zlata Hušková

Poděkování

Za dokončení své dizertační práce bych chtěla touto cestou poděkovat všem lidem, kteří mají podíl na jejím úspěšném dokončení. Ze všeho nejvíce děkuji mé školitelce dizertační práce Mgr. Janě Steigerové, Ph.D. za podporu, pomoc a důvěru a také za vstřícný přístup, trpělivost, ochotu, rady a neustálý optimismus. Dále také děkuji doc. Mgr. Janu Bouchalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a poskytnuté konzultace. Poděkování patří také prof. MUDr. Zdeňku Kolářovi, CSc., který provedl histopatologické vyšetření vzorků. Za provedení statistických analýz děkuji Mgr. Janě Vrbkové, Ph.D.

Poděkování patří také celému kolektivu Ústavu klinické a molekulární patologie za umožnění zpracování tématu mé dizertační práce na tomto pracovišti a mimo jiné také za vstřícnost a praktické rady.

Poděkovat bych v neposlední řadě chtěla i mojí rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

Obsah

1.	Úvod.....	9
1.1	Prostata, fyziologie a její hlavní funkce.....	11
1.2	Benigní hyperplazie prostaty.....	13
1.3	Karcinom prostaty.....	15
1.3.1	Epidemiologie, prevalence, incidence a mortalita karcinomu prostaty.....	15
1.3.2	Rizikové faktory.....	18
1.3.3	Diagnostika karcinomu prostaty.....	18
1.3.3.1	Digitální rektální vyšetření.....	18
1.3.3.2	Prostatický specifický antigen.....	18
1.3.3.3	Transrektální ultrasonografie.....	21
1.3.3.4	Histopatologické vyšetření.....	21
1.3.4	Klinická stádia karcinomu prostaty.....	22
1.3.5	TNM klasifikace.....	23
1.3.6	Gleason skóre.....	24
1.4	Tekutá biopsie.....	24
1.4.1	Cirkulující nádorové buňky.....	26
1.4.2	Volné nádorové nukleové kyseliny.....	29
1.4.3	Exozomy.....	30
1.5	Biomarkery u karcinomu prostaty.....	31
1.5.1	Močové biomarkery u karcinomu prostaty.....	33
1.6	Steroidní receptory.....	38
1.6.1	Androgenový receptor.....	39
1.7	Léčba karcinomu prostaty.....	43
1.7.1	Lokalizovaný karcinom prostaty.....	44
1.7.2	Karcinom prostaty s biochemickým relapsem.....	45
1.7.3	Nemetastatický CRPC a pokročilý metastatický karcinom prostaty.....	47
1.7.4	Kastračně rezistentní karcinom prostaty.....	48
1.8	Srdeční glykosidy.....	49
1.8.1	Chemická struktura srdeční glykosidů.....	50
1.8.2	Biologická aktivita kardioglykosidů.....	52
1.8.3	Protinádorová aktivita srdečních glykosidů.....	53

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	55
2. Močové markery	56
2.1 Materiál a metody	56
2.1.1 Výběr pacientů	56
2.1.2 Izolace RNA z moči.....	57
2.1.3 Reverzní transkripce.....	57
2.1.4 Kvantitativní real-time PCR.....	58
2.1.5 Ředění LNCaP a leukocytů.....	60
2.1.6 Statistická analýza.....	60
2.2 Výsledky	60
2.2.1 Preamplifikace u močových markerů.....	60
2.2.2 Korelace močových markerů s transkripty rakoviny prostaty.....	61
2.2.3 Močové markery a rozlišení karcinomu prostaty od benigní hyperplazie	62
2.2.4 Kombinovaný model a procento volného PSA u podskupiny pacientů.....	63
2.2.5 Zánět prostaty.....	66
2.2.6 Detekce počtu leukocytů a nádorových buněk v moči.....	67
3. Tekutá biopsie u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty	69
3.1 Materiál a metody	69
3.1.1 Pacientské vzorky.....	69
3.1.2 Zpracování krevní plazmy.....	70
3.1.3 Izolace cirkulujících nádorových buněk z krve.....	70
3.1.4 Izolace nukleových kyselin z krevní plazmy	70
3.1.5 Izolace nukleových kyselin z cirkulujících nádorových buněk.....	71
3.1.6 Analýza exprese zájmových genů.....	71
3.1.7 Statistické zpracování dat.....	72
3.2 Výsledky	72
3.2.1 Expese studovaných genů z plazmy a cirkulujících nádorových buněk.....	72
3.2.2 Expese a vzájemná korelace studovaných genů	72
3.2.3 Vzájemný vztah studovaných genů a klinicky významných parametrů	74
4. Účinek steroidních derivátů srdečních glykosidů na prostatické buněčné linie.....	77
4.1 Materiál a metody	77
4.1.1 Chemický materiál	77
4.1.2 Kultivace buněk	78
4.1.3 Test cytotoxicity testovaných látek.....	79
4.1.4 Kultivace 3D modelových systému.....	80
4.1.5 Analýza buněčného cyklu	80

4.1.6	Imunocytochemická fluorescenční detekce steroidních receptorů.....	81
4.1.7	Inkorporace bromodeoxyuridinu.....	82
4.1.8	Western blot analýza.....	82
4.1.9	Statistické zpracování dat.....	85
4.2	Výsledky.....	85
4.2.1	Vliv derivátů odvozených od oleandrigeninů na buněčnou viabilitu.....	85
4.2.2	Účinek vybraného derivátu na kultivaci 3D modelových systémů.....	87
4.2.3	Analýza buněčného cyklu.....	88
4.2.4	Inkorporace BrdU.....	89
4.2.5	Vliv adrostanového derivátu na expresi proteinů buněčného cyklu a apoptózy.....	90
4.2.6	Vliv adrostanového derivátu na expresi receptorů pro steroidní hormony.....	91
5.	Diskuze.....	95
6.	Závěr.....	105
7.	Summary.....	105
8.	Seznam použitých zkratk.....	109
9.	Původní vědecké publikace uveřejněné v časopise s IF.....	113
10.	Seznam použité literatury.....	115

1. Úvod

Definitivní diagnóza karcinomu prostaty (CaP) je založena na výsledcích biopsie prostaty, která může způsobovat komplikace, včetně hospitalizace, krvácení, sepse a bolesti, proto je důležité snížit počet zbytečně provedených biopsií. Kromě markerů ze séra, mohou také močové biomarkery pomoci urologům při rozhodování o diagnóze a prognóze. Dříve byl úspěšně analyzován marker PCA3 v kombinaci s AMACR, EZH2, MSMB a TRPM8. Cílem této práce bylo mimo jiné zjistit, zda další markery mohou zlepšit odlišení pacientů s benigní hyperplazií prostaty od těch s karcinomem. Tato studie se tedy zaměřila na ověření a vylepšení již zavedeného močového testu (quadruplex AMACR, PCA3, MSMB, TRPM8, EZH2 s normalizací na KLK3). A dále na validaci metody ve větší kohortě pacientů se sérovým PSA 2,5-10 ng/ml a testování dalších vybraných klinických parametrů, včetně zánětu, procenta volného PSA v séru, zánětu v benigní tkáni prostaty a panelu kandidátních močových transkriptů. Hlavní výhodou močových biomarkerů je jejich neinvazivní charakter a schopnost detekovat multifokální karcinom prostaty.

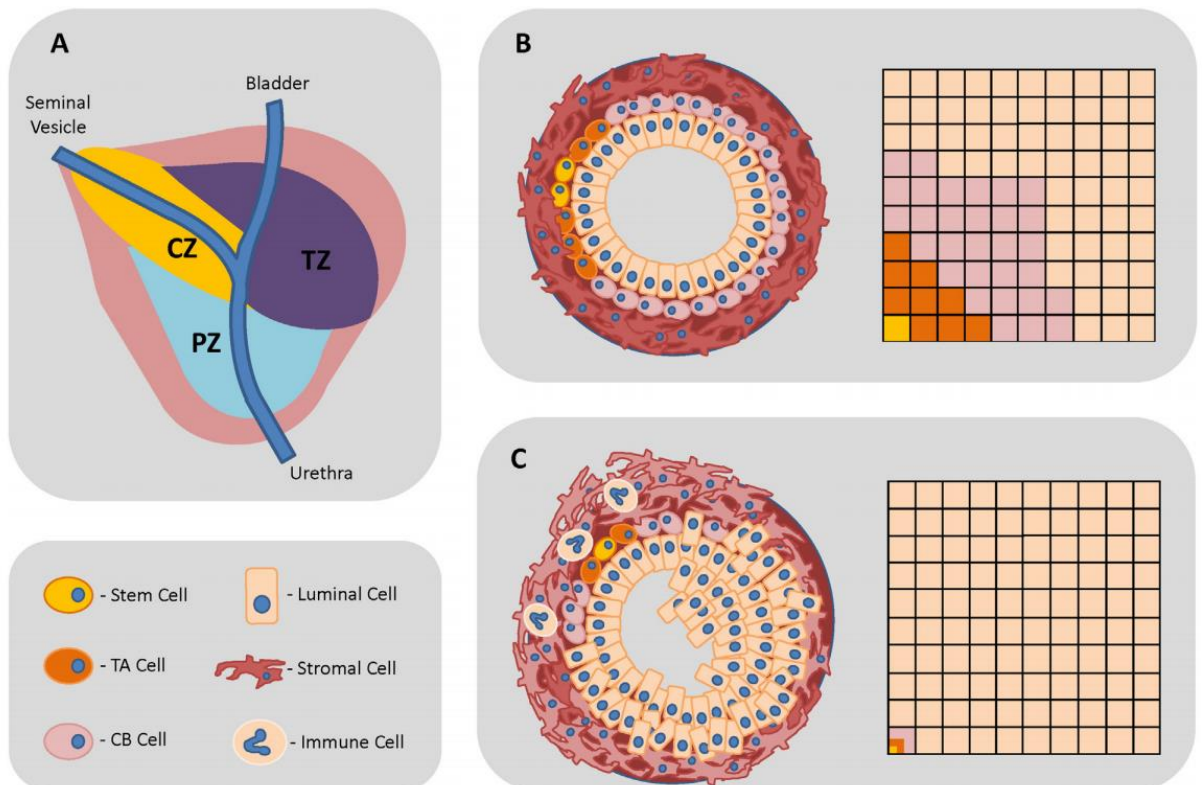
Tekutá biopsie z periferní krve patří mezi nejnovější a šetrnější přístupy k získávání informací o nádoru, protože krev obsahuje nejen krevní buňky, ale také cirkulující nádorové buňky, fragmenty buněk a také molekuly volných nukleových kyselin. Mezi výhody této metody patří častý odběr vzorků, detekce mutací v buňkách z různých oblastí nádoru i metastáz, monitorování vývoje onemocnění a léčby, predikce odpovědi na léčbu, zahájení včasné léčby nebo určení molekulárního relapsu, neinvazivita, rychlost, efektivnost a snadná opakovatelnost. Tekutá biopsie má také jisté nevýhody, jako je nízké množství cirkulujících nádorových buněk i cirkulující nádorové DNA ve vzorku nebo odlišné hladiny CTC u různých pacientů. Dalším cílem této práce byla izolace nukleových kyselin z krve z cirkulujících nádorových buněk a plazmy pacientů s pokročilým karcinomem prostaty, analýza exprese vybraných genů a zhodnocení klinického významu provedených analýz.

Srdeční glykosidy jsou látky tradičně používané jako léčiva v terapii srdečního selhání a srdečních arytmií. Jedná se o přírodní látky ze skupiny kardioglykosidů, jejichž hlavním zdrojem jsou rostliny rodu náprstníků. Je známa protinádorová aktivita srdečních glykosidů, které jsou schopné inhibovat proliferaci buněk a spustit buněčnou smrt nádorových buněk aktivací apoptotických či autofagických signálních drah, produkcí volných kyslíkových radikálů nebo zástavou buněčného cyklu. Některé formy

kardioglykosidů mohou inhibovat proliferaci a indukci apoptózy nádorových buněk prostaty v koncentracích použitelných v klinické praxi. V poslední době jsou hledány nové deriváty odvozené od těchto steroidních sloučenin, které by byly schopné inhibovat proliferaci a metastáze nádorových buněk. Cílem této části dizertační práce bylo u prostatických nádorových buněčných linií studování vlivu steroidních derivátů srdečních glykosidů na buněčnou viabilitu a kultivaci 3D modelových systémů, na expresi proteinů zapojených do buněčného cyklu a apoptózy a na expresi receptorů pro steroidní hormony.

1.1 Prostata, fyziologie a její hlavní funkce

Prostata neboli předstojná žláza je svalově žláznatý mužský orgán, kterým prochází močová trubice a je umístěný pod močovým měchýřem. Má velikost vlašského ořechu a váží okolo 20 g. Spodní část se označuje jako apex, horní báze naléhá na močový měchýř. Histologicky je tvořena z pěti laloků a to pravý, levý, horní, spodní a střední, které později srůstají a splynou. Skládá se ze tří zón; centrální, tranzitorní a periferní (Obrázek 1A). Centrální zóna (CZ) obsahuje duktální kanálek směřující ze semenného vaku do místa, kde se setkává se sestupnou močovou trubicí, obsahuje submukózní žlázy a zabírá zhruba 25 % velikosti prostaty. Periferní zóna (PZ), která se nachází v zadní části žlázy a je největší oblastí (65 % celé prostaty), obklopuje centrální a tranzitorní zónu, obsahuje 30-50 tuboalveolárních žláz a je místem nejčastějšího vzniku prostatické intraepiteliální neoplazie (PIN) a nádorů prostaty (70 %). Přechodná zóna neboli tranzitorní (TZ) je přímo pod močovým měchýřem a obklopuje přechodnou močovou trubicí, v tomto místě nejčastěji vzniká benigní hyperplazie. Na povrchu prostaty se nachází vazivový obal (Packer *et al.*, 2016).

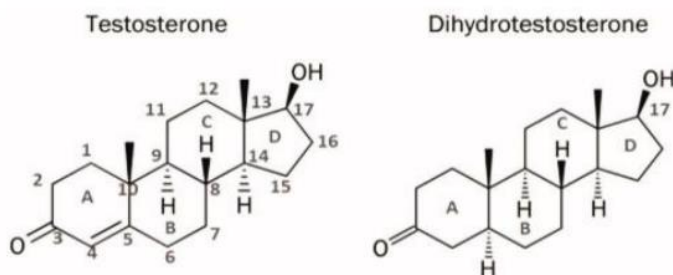


Obrázek 1: Anatomie lidské prostaty a stavba epitelálních buněk. **A)** Prostata se skládá ze 3 odlišných zón; PZ=periferní zóna, CZ=centrální zóna, TZ=tranzitorní zóna, dále

se zde nachází močový měchýř, močová trubice, semenné vajíčky. **B)** Schematické znázornění normálního prostatického acinu; epitelální dvojvrstva bazálních a luminálních buněk obklopená fibromuskulárním stroma. Relativní obsah různých epitelálních buněk v normální prostatě jsou shrnuty graficky; buňky luminální (60 %), bazální (40 %) a kmenové buňky, které tvoří ~ 1 % celkového epitelu. **C)** Buněčné složení nádorového acinu. Rakovina mění procenta epitelálních buněk; luminální buňky tvoří >99 % nádorů a odhaduje se, že bazální kmenové nádorové buňky tvoří 0,1 % nádorových epitelálních buněk (převzato z Packer *et al.*, 2016).

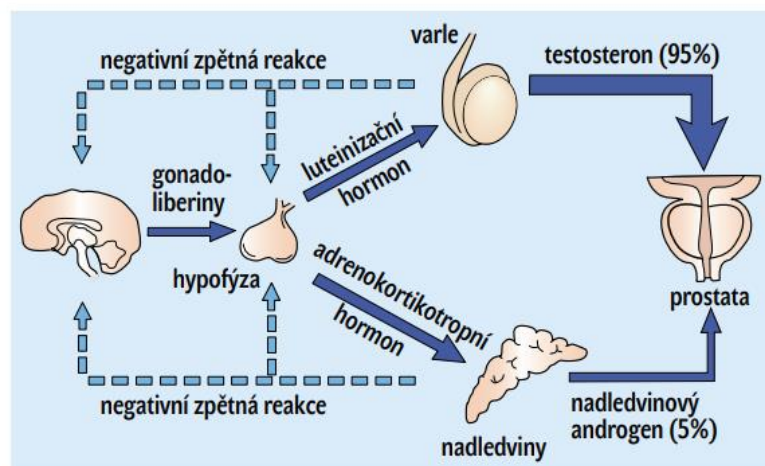
Na buněčné úrovni (Obrázek 1B) je prostata tvořena jednou vrstvou buněk luminálních, které jsou sekreční a produkují prostatický specifický antigen (PSA) a jiné látky, obsahují androgenové receptory a jejich činnost a přežití závisí na androgenech. Druhou vrstvou tvoří bazální buňky, které neobsahují androgenový receptor a nepodléhají tím stimulačnímu vlivu androgenů, tyto buňky jsou obklopeny bazální membránou. Lumen žlázek je vyplněn sekretem s alkalickou povahou. Mohou zde být přítomny také neuroendokrinní buňky, které parakrinní sekrecí produkují různé látky např. neuropeptidy synaptofyzin a chromatogranin A, nachází se zde také kmenové buňky a tranzitorně rozšířené buňky (TA). Kolem se nachází fibromuskulární stroma tvořené fibroblasty a buňkami hladké svaloviny (Frame *et al.*, 2011; Maitland *et al.*, 2013; Packer *et al.*, 2016).

Hlavní funkcí prostaty jako žlázy s vnitřní sekrecí je produkce sekretu, který se při ejakulaci mísí se spermatem a tvoří 15-30 % ejakulátu. Sekret je bezbarvý, má typický zápach, pH 6,4 a obsahuje PSA, který zkapalňuje ejakulát. Obsahuje také polyaminy spermin a spermidin, kyselinu citronovou, kyselou fosfatázu, zinek, prostaglandiny, proteázy a další. Hlavní úlohou sekretu je ochrana spermií v kyselém prostředí pochvy, dále jejich výživa a zvýšení pohyblivosti při oplodnění vajíčka.



Obrázek 2: Chemická struktura testosteronu a dihydrotestosteronu (převzato z Tan *et al.*, 2015).

Funkce prostaty je řízena hormonálně androgeny (Obrázek 2). Testosteron, jehož struktura je zobrazena na Obrázku 2, je steroidní hormon ze skupiny androgenů, patří mezi anabolické steroidy a jedná se o mužský pohlavní hormon, který je zodpovědný za vývoj primárních a sekundárních mužských pohlavních orgánů, v krvi je v 98 % vázán na bílkoviny krevní plazmy globulin vázající pohlavní hormony (SHGB) a v menší míře na albuminy. V největší míře je produkován Leydigovými buňkami ve varlatech a méně pak v kůře nadledvin. Hladina testosteronu produkovaného varlaty je regulována hypofyzárním gonadotropin luteinizačním hormonem (LH), jehož sekreci řídí hormon uvolňující luteinizační hormon (LHRH) produkovaný v hypotalamu. Malé množství slabých androgenů (dihydroepiandrosteron a androstendion) produkovaných kůrou nadledvin je pod kontrolou adrenokortikotropního hormonu (ACTH). V cílových orgánech pomocí enzymu 5 α -reduktázy dochází na 5. uhlíku k redukci testosteronu na biologicky aktivnější dihydrotestosteron (DHT, Obrázek 3), který je spoluzodpovědný za správnou funkci prostaty, zvýšenou syntézu proteinů a buněčnou proliferaci (Matoušková, 2004).

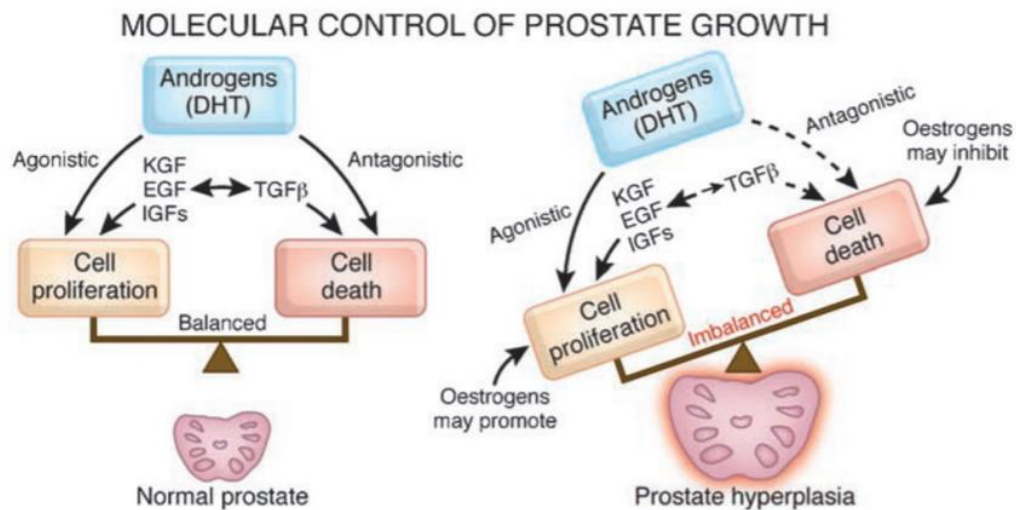


Obrázek 3: Produkce pohlavních hormonů. Hormony hypotalamu, hypofýzy a varlat ovlivňující tkáň prostaty a jejich vzájemné vztahy (převzato z Matoušková, 2004).

1.2 Benigní hyperplazie prostaty

U mužů se stoupajícím věkem může docházet ke zbytnění prostaty. Jedná se o namnožení žlázek i stromatu v prostatě a tvorbu různě velkých uzlů v přechodné zóně. Uzly mohou komprimovat uretru a způsobit její stenózu, případně obstrukci. Příčinou vzniku benigní hyperplazie (BPH) jsou změny hladin androgenů a estrogenů

a jejich působení na buněčnou proliferaci a apoptózu (Obrázek 4). Hladina testosteronu u starších mužů klesá, kdežto hladina estrogenů naopak mírně stoupá. Se zvyšujícím se věkem také dochází k horšímu odbourávání DHT, což má za následek zvýšenou koncentraci a v prostatickém stromatu tedy dochází při zmnožených receptorech k vazbě DHT ve zvýšené míře a tím k růstové stimulaci prostaty a vyšší proliferaci buněk hladké svaloviny a epitelálních buněk (Rennie *et al.*, 1988).



Obrázek 4: Molekulární kontrola růstu prostaty. Rovnováha mezi stimulačními a inhibičními růstovými faktory, které se podílejí na buněčné homeostáze v prostatě. Jsou zde ukázány příslušné role androgenů, testosteronu a dihydrotestosteronu (DHT). Pravý obrázek ilustruje nerovnováhu a abnormální růst benigní hyperplazie prostaty (BPH) (převzato z Roehrborn, 2008).

Mezi časté příznaky spojené se zvětšenou prostatou patří fyzická limitace vyprazdňování, urgentní mikce, inkontinence, časté močení v noci (nykturie), nucení na časté močení s pocitem neúplného vyprázdnění, slabý přerušovaný proud malého objemu moči v krátkých intervalech (polakisurie), krev v moči (hematurie). Vlivem obstrukce močové trubice dochází k městnání moči v močovém měchýři a může se projevit zánět ledvin, ledvinové kameny, zánět močového měchýře, reflux moči apod. (Aaron *et al.*, 2016).

Vyšetření BPH se provádí fyzikální (per rectum), laboratorní z krve (PSA <4 ng/ml) nebo moči (sediment, kultivace) a také pomocí zobrazovacích metod (ultrasonografie). Léčba BPH se volí pomocí medikamentů jako například fytoterapie, alfablokátorů (alfalytika), inhibitory 5 α -reduktázy, antimuskarinika. Fytoterapie využívá

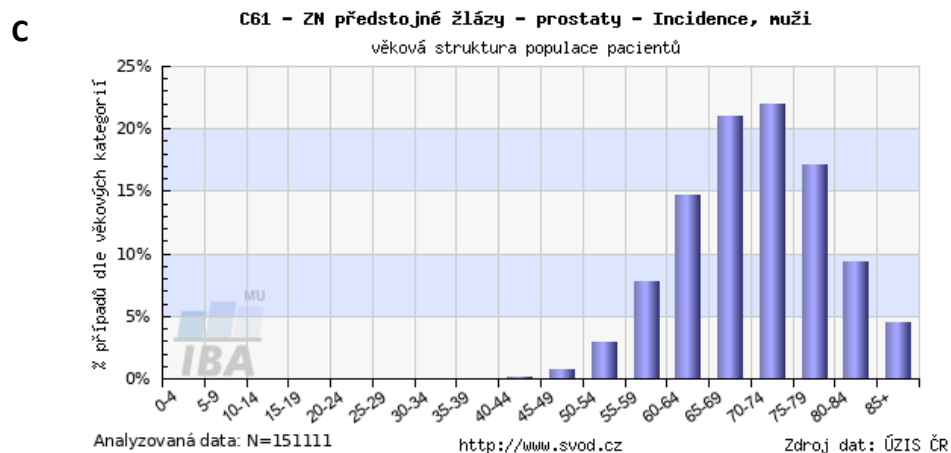
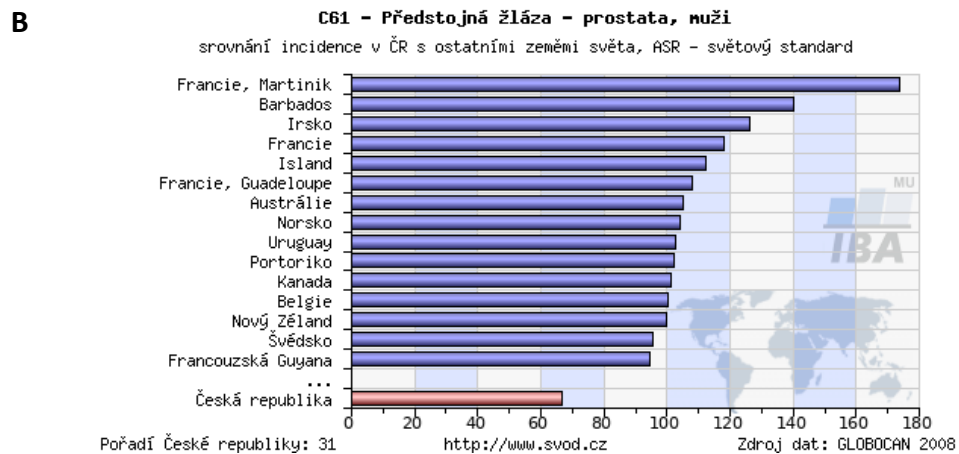
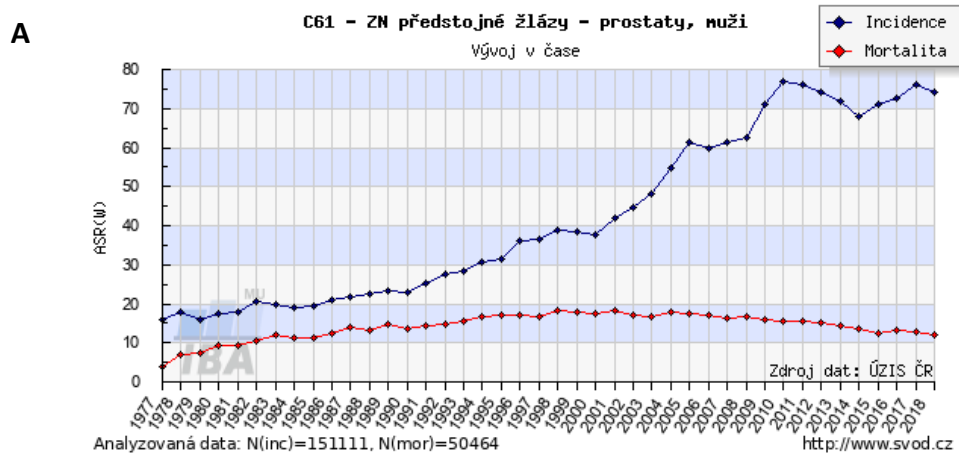
extrakty z léčivých rostlin (kořeny, semena, kůra). Účinky mohou být protizánětlivé, antiandrogenní apod. Používají se např. extrakty z trpasličí palmy, z kůry africké švestky, kořene kopřivy dvoudomé, semen tykve nebo vrbovka malokvětá. Alfablokátoři jsou nejužívanější léky pro BPH. Kontrakce hladké svaloviny je zprostředkována alfa-1-adrenoreceptory, což vede k oslabenému proudu moči. Jako alfablokátoři se používají alfalytika a antagonisté alfa-1-adrenoreceptorů, které blokují navázání endogenně uvolněného noradrenalinu na alfa-1-adrenoreceptory v buňkách hladké svaloviny prostaty a tím dochází k redukci tonu prostaty a následně poklesu obstrukce. Inhibitory 5 α -reduktázy zamezují přeměně biologicky méně aktivního testosteronu na dihydrotestosteron (Andriole *et al.*, 2004). Enzym 5 α -reduktáza má dvě izofomy (I v extraprostatické tkáni - kůže, játra a II v prostatě). Komerčně dostupné léčivo Finasterid inhibuje izofomu II a Dutasterid inhibuje obě izofomy. Touto léčbou dochází ke zmenšení objemu prostaty, snížení hladin DHT v séru i prostatě a také k poklesu PSA (Marberger *et al.*, 2006). Antimuskarinika (anticholinergika) antagonizují účinky acetylcholinu na muskarinových receptorech hladké svaloviny. Inhibicí nebo snížením stimulace muskarinových receptorů má za následek snížení kontrakcí hladké svaloviny (Kaplan *et al.*, 2011). Po selhání farmakologické léčby se nasazuje léčba chirurgická, při které se odstraní pouze zvětšená část prostaty v oblasti tranzitorní zóny přístupem přes uretru, nikoli celá prostata jako při radikální prostatektomii. Při objemu prostaty nad 80 ml se volí otevřená operace, do 80 ml je provedena laparoskopie. Mezi minimálně invazivní (alternativní) postupy se řadí transuretrální termoterapie, kdy mikrovlnná energie přispívá ke vzniku koagulační nekrózy tkáně, působení tepla vede k apoptóze buněk a denervaci α -receptorů a snížení svalového tonu. Laserové metody využívají elektromagnetické záření k navození hluboké koagulační nekrózy (denaturace proteinů s následnou nekrózou a resorpcí, což vede ke zmenšení objemu tkáně) a vaporizaci tkání (přímé odstranění tkáně vypařením) (Lukeš *et al.*, 2006).

1.3 Karcinom prostaty

1.3.1 Epidemiologie, prevalence, incidence a mortalita karcinomu prostaty

Karcinom prostaty je nádorové onemocnění postihující muže, kde incidence stoupá s věkem. Jedná se o jedno z nejčastějších nádorových onemocnění u mužů a jednu z nejčastějších příčin úmrtí na onkologické onemocnění u nás i ve světě. Česká republika

je ve srovnání celosvětové incidence na 31. místě. V posledních letech incidence onemocnění stoupá, ale úmrtnost mírně klesá. Nejvyšší výskyt onemocnění je ve věku 60-80 let (Obrázek 5A-C).



Obrázek 5: A) Incidence (přepočítána na 100 tis. obyvatel) a mortalita karcinomu prostaty, B) srovnání incidence v České republice a ostatních zemích světa, C) procentuální zastoupení věkových kategorií u mužů s karcinomem prostaty v ČR (převzato z www.svod.cz).

Většina onkologických onemocnění obecně je způsobena vícečetnými mutacemi genů, ke kterým dochází v průběhu stárnutí buněk (působením fyzikálních, chemických či biologických mutagenů) a zpravidla současně na několika stupních. K těmto změnám dochází běžně v každé buňce, avšak ne každá taková změna musí zákonitě vést k maligní transformaci. Pokud reparační procesy (buněčné či na úrovni organismu) nejsou schopny eliminovat vzniklé nádorové buňky, rozbíhá se kaskáda neregulovatelného růstu a dělení nádorových buněk, v nichž bývá mj. potlačen proces apoptózy. Pokud však k takovým změnám genetické informace dojde v zárodečné buňce, přechází informace i na přímé potomky. Pro tento způsob přenosu onemocnění je charakteristické, že se v rodinách vyskytují některá onemocnění s vyšší frekvencí, časnějším nástupem, bilaterálním či multifokálním postižením, případně agresivnějším průběhem než v běžné populaci. Kromě mutačních teorií je velký důraz kladen i na teorii kmenových buněk, které se nepochybně podílejí na patogenezi (nejen nádorových) chorob (Král *et al.*, 2010).

Z praktického hlediska lze karcinomy prostaty rozdělit do tří skupin: hereditární, familiární a sporadický. Z celkového počtu karcinomů prostaty se odhaduje, že ve více jak 85 % jde o sporadické formy. Jako „sporadický“ je definován karcinom u muže s negativní rodinnou anamnézou, jako „familiární karcinom“ je označován při postižení dvou či více mužů v rodině a „hereditární karcinom“ představuje postižení tří a více mužů v rodině, ve třech následujících generacích či postižení dvou mužů ve věku do 55 let. Segregační analýzy u pacientů se sporadickým a familiárním karcinomem odhalily, že se v drtivé většině familiárních karcinomů jedná o autozomálně dominantní typ dědičnosti a pouze v malém procentu o dědičnost recesivní či vázanou na chromozom X (Valeri *et al.*, 2003).

Z počátku je onemocnění bezpříznakové, u lokálních nádorů se můžou objevit podobné příznaky jako u BPH například obtížné močení, močení v noci, časté nucení provázené vymočením malého množství moči, akutní retence moči, hematurie apod. Během generalizovaného onemocnění se vyskytuje bolest u kostních metastáz, paréza dolních končetin, nechutenství, hubnutí, slabost, patologické zlomeniny atd.

Karcinom prostaty nejčastěji metastázuje do kostí, konkrétně do bederní páteře (obratle, žebra), pánve, proximálních konců stehenních kostí, kde mohou způsobovat patologické zlomeniny, poškození míchy nebo poruchu krve tvorby. Dále se mohou metastázy vyskytovat u plic, jater, ledvin, nadledvin, močového měchýře, semenných váčků a lymfatických uzlin pánve.

Vznik karcinomu prostaty je dlouhodobý proces, který může trvat řadu let a předchází mu buněčné změny, dále proliferativní zánětlivá atrofie (PIA) a prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN), která se jako prekanceróza může objevit 15-20 let před vývojem rakoviny.

Rakovina prostaty je charakterizována lumbální hyperproliferací, ztrátou bazální vrstvy, rozpadem bazální membrány, infiltrací imunitních buněk a stromální reaktivitou (Packer *et al.*, 2016). Buněčné složení nádorového acinu je uvedeno na Obrázku 1C.

1.3.2 Rizikové faktory

Je všeobecně známo, že karcinom prostaty představuje hormonálně závislý typ nádoru s různým stupněm diferenciací buněk za současné změny jejich původní funkce. Jedná se o onemocnění, u kterého dosud nebyla zjištěna jednoznačná a přesvědčivá příčina. Mezi příčiny vzniku nemoci patří věk, strava (příjem živočišných tuků, alkoholu), obezita, kouření, etnika, podstoupení vazektomie, medikace statinů, nesteroidních protizánětlivých preparátů, sexuální aktivita, dědičnost či genetické faktory (Sampson *et al.*, 2013). Na pomezí faktorů zevního prostředí a faktorů genetických stojí androgeny, estrogeny, inzulin, IGF (insulin-like growth factor) a další hormony, jejichž hladiny mohou kolísat dle genetických predispozic jedinců a vnějších okolností (hormonální substituce, obezita, komorbidita).

1.3.3 Diagnostika karcinomu prostaty

1.3.3.1 Digitální rektální vyšetření

Digitální rektální vyšetření (DRE) a stanovení PSA je prováděno u mužů nad 50 let jako preventivní screeningové vyšetření prostaty každé dva roky. Jedná se o per rektum vyšetření prostaty pohmatem, kdy lékař hodnotí zvětšení objemu prostaty, elasticitu tkáně a změny její konzistence, symetrii, ohraničení žlázy, hladkost povrchu, pohyblivost vůči okolí apod. Je to metoda prvního záchytu onemocnění, ale má svoje limity. Pohmatem přes konečník se obsáhne pouze 1/3 prostaty a není možné zachytit tumory menší než 0,2 ml.

1.3.3.2 Prostatický specifický antigen

Prostatický specifický antigen (PSA) je glykoprotein o velikosti 33 kDa. Má aktivitu neutrální serinové proteázy, která je sekretována lumenálními buňkami do prostatických žlázových vývodů a semenné plazmy. Jako proteolytický enzym

je zodpovědný za zkapalnění spermatu a tím za zvýšenou pohyblivost spermií. Gen pro lidský kalikrein 3 (hK3) se nachází na 19. chromozomu, kde se nachází i geny pro kalikrein 1 a 2 (hK1 a hK2). Molekula je tvořena 1 uhlíkovým řetězcem navázaným na aminoskupinu kyseliny asparagové a 237 aminokyselinami. PSA může být ve formě volné nebo vázané, dohromady tvoří celkové PSA (tPSA). V krvi je PSA v 95 % navázaný na α 1-antichymotrypsin a v malé míře na α 2-makroglobulin, který je ovšem nedetekovatelný. Volný PSA není vázaný na krevní bílkoviny a má několik izoform, mezi které patří proPSA (proenzymová forma PSA), benigní PSA (bPSA) a intaktní PSA (iPSA). PSA představuje orgánově specifický marker, nikoli nádorově specifický. Pro stanovení sérového PSA se používají imunochemické metody, mezi které patří enzymoimunoanalýza, fluoroimunoanalýza a luminiscenční analýza.

Prahová hodnota PSA v séru se uvádí 2,5-3 ng/ml. Hladiny PSA pod touto prahovou hodnotou většinou značí zdravou prostatu nebo BPH, naopak hodnoty nad 10 ng/ml mohou signalizovat přítomnost tumoru. Jako šedá zóna se označuje rozmezí PSA 4-10 ng/ml, kdy je obtížné rozlišit karcinom od BPH. U 20-30 % karcinomů prostaty může být PSA <4 ng/ml a u 5 % dokonce <2 ng/ml, existují také případy BPH s PSA >10 ng/ml. Ke zvýšení sérových hladin PSA dochází po narušení bazální membrány epitelových buněk prostaty a zvýšené prostupnosti bazální membrány oddělující epitelální buňky od lumen kapilár. Jeho hladina může být v krvi zvýšena v důsledku nádorového onemocnění, ale také při zánětu (bakteriální prostatitida), traumatech prostaty, po masáži prostaty během digitálního rektálního vyšetření (DRE), po análním sexu, po jízdě na kole apod. Oesterling *et al.* uvádějí, že sérové koncentrace všech tří forem PSA (volný, vázaný a celkový PSA) jsou závislé na věku pacienta a se zvyšujícím se věkem hladina PSA mírně stoupá, proto se hodnotí též věkově specifická referenční pásma pro volný a vázaný PSA (Oesterling *et al.*, 1995) (Tabulka 1). Senzitivita PSA je ve vztahu k detekci karcinomu prostaty uváděna mezi 68-80 % a specificita mezi 49-90 % (Hradil *et al.*, 2014). Za účelem zvýšení senzitivity a specificity byly do praxe uvedeny níže uvedené proměnné PSA.

Tabulka 1: Věkově specifický PSA

<i>Věk (let)</i>	<i>PSA (ng/ml)</i>
< 50	2,5
< 60	3,5
< 70	4,5
> 70	6,5

Procento volného PSA

Poměr volného (%free PSA) a celkového PSA (f/tPSA) může přispět k rozlišení BPH od karcinomu u pacientů s negativním vyšetřením per rektum, kteří mají PSA v šedé zóně (4-10 ng/ml) a zároveň umožňuje eliminovat řadu zbytečných biopsií prostaty. Hladina volného PSA je přímo úměrná velikosti prostaty a souvisí s objemem prostaty během vývoje BPH. Hodnoty mohou být maligní (0-15 %), hraniční (15-20 %) a benigní (>20 %).

PSA denzita

PSA denzita (PSAD) je podíl celkové hodnoty PSA (ng/ml) a objemu celé prostaty (cm³) stanoveného pomocí transrektální ultrasonografie, kde hraniční hodnota je 0,15 ng/ml. PSA denzita tranzitorní zóny (PSAD-TZ) je podíl celkové hodnoty PSA a objemu tranzitorní zóny prostaty, kde hraniční hodnota je 0,36 ng/ml. Je lepší hodnotit denzitu než hladinu PSA u mužů s předchozí negativní biopsií.

Index zdravé prostaty

Jedná se o kombinaci 3 krevních testů, která může předpovědět vyšší riziko výskytu karcinomu prostaty. Index zdravé prostaty (PHI) je 3x více specifický než PSA a může přispívat k rozlišení high-grade tumorů od low-grade nebo negativní biopsie. Při hodnotách <30 je riziko karcinomu nízké, 30-40 střední riziko a při hodnotách >40 je riziko vysoké. Tento test je nezávislý na věku, pozitivně koreluje s Gleason skóre (více v kap. 1.3.6) a pomůže stanovit hranici, kdy provést biopsii.

Vzorec: $[-2] \text{proPSA}/\text{fPSA} * \sqrt{\text{tPSA}}$

PSA velocita

Změna celkového PSA v čase je přímo závislá na objemu prostaty nebo tumoru. Pomáhá upřesnit indikaci k biopsii, pokud tPSA je nízké. Hraniční hodnota byla stanovena na 0,75 ng/ml/rok.

Doubling time

Je čas potřebný ke zdvojnásobení sérové hladiny PSA (dny, týdny, měsíce, roky).

Vzorec: $(\text{PSA}_1 \times \text{časový interval})/(\text{PSA}_2 - \text{PSA}_1)$

4K skóre

Panel 4 kalikreinů hK2, intaktní PSA, volné PSA a celkové PSA přispívá k redukci počtu biopsií založených na indolentních karcinomech prostaty, může snižovat počet zbytečných biopsií a zlepšit rozlišení high-grade tumorů.

1.3.3.3 Transrektální ultrasonografie

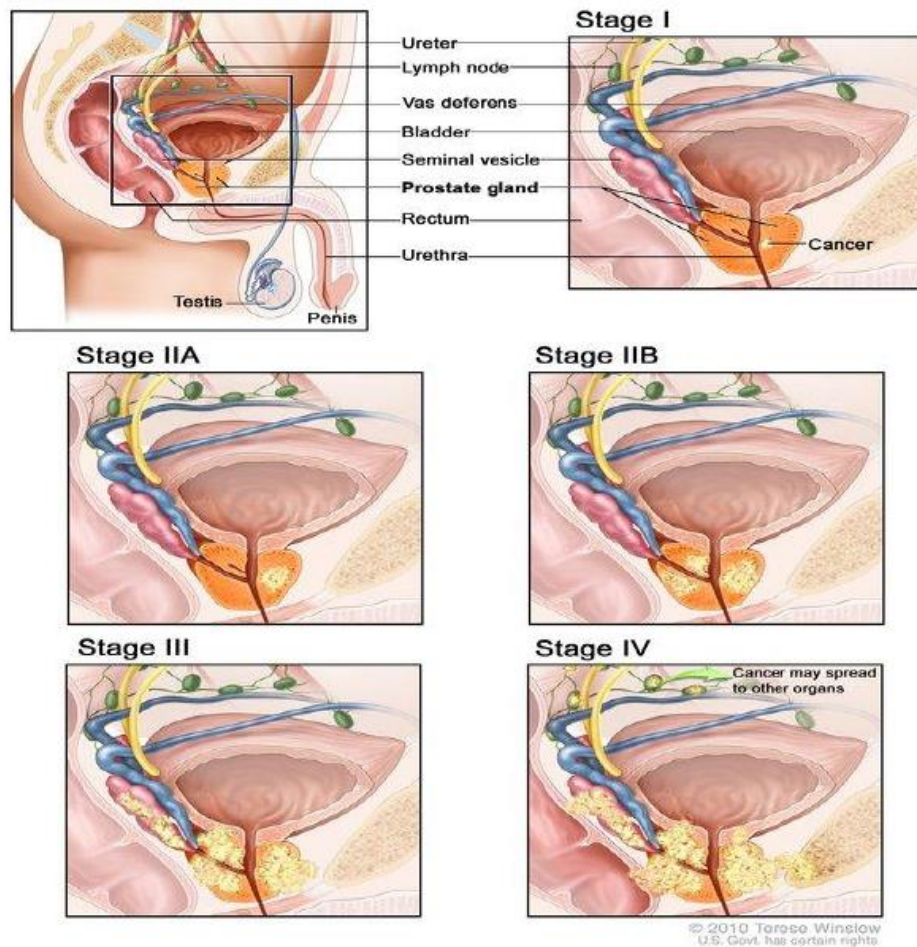
Transrektální ultrasonografie (TRUS) je metoda černobílého zobrazení, která pomáhá sledovat prorůstání nádoru přes vazivové pouzdro, stanovit objem a velikost orgánu, identifikovat léze podezřelé z malignit a vizualizovat prostatu během biopsie. Pro vysoké procento nesprávně pozitivních nálezů a nízkou specifitu se ovšem nedá použít pro primární diagnostiku nebo screening.

1.3.3.4 Histopatologické vyšetření

Biopsie je invazivní diagnostická metoda odběru histologických vzorků přes konečník pod zobrazením TRUS. Nejčastěji se provádí 12 vpichů v cíleně suspektním místě nebo se odebírají vzorky z celé prostaty. Biopsie je indikována při vyšetření per rectum a nálezu tvrdého ložiska, elevaci hladin PSA >4 ng/ml nebo histologickém nálezu z biopsie. Během biopsie je podávána lokální anestezie a antibiotická profylaxe jako prevence infekce. Rebiopsie je prováděna při negativním histologickém výsledku nebo progredujícím PSA. Biopsii můžeme rozdělit na standardní přes konečník s využitím ultrazvuku, perineální přes hráz pomocí speciální ultrazvukové sondy, dále biopsii vedenou skrz močovou trubici nebo fúzní perineální biopsii, která je nejmodernější a jedná se o spojení ultrazvuku a magnetické rezonance (NMR). Komplikace spojené s biopsií mohou být krvácení do konečníku, moči nebo spermatu, horečka, zánět prostaty nebo nadvarlete či močová retence.

Pro zobrazení kostních metastáz se používá scintigrafie skeletu. Výpočetní tomografie (CT) zobrazuje metastázy pánevních lymfatických uzlin a pomocí NMR se upřesňuje velikost tumoru a jeho šíření do měkkých tkání.

1.3.4 Klinická stádia karcinomu prostaty



Obrázek 6: Klinická stádia karcinomu prostaty (převzato z © 2010 Terese Winslow, U.S. Govt. has certain rights).

Nádory prostaty mohou být lokalizované, lokálně pokročilé, metastatické a hormonálně nezávislé tzv. kastračně rezistentní karcinomy prostaty (CRPC). Klinická stádia karcinomu prostatu (Obrázek 6 a Tabulka 2) jsou 4 a určují se pomocí prostatického specifického antigenu (PSA), TNM klasifikace (Tabulka 3) a Gleason skóre (Obrázek 7).

Tabulka 2: Klinická stádia karcinomu prostaty (American Joint Committee on Cancer (AJCC) stage grouping, 2010 edition, převzato z Cheng et al., 2012).

Stage	T	N	M	PSA (ng/ml)	Gleason score
I	T1a-c	NO	M0	<10	≤ 6
	T2a	NO	M0	<10	≤ 6
	T1-2a	NO	M0	X	X
IIA	T1a-c	NO	M0	<20	7
	T1a-c	NO	M0	≥10 and <20	≤ 6
	T2a	NO	M0	<20	7
	T2b	NO	M0	<20	≤ 7
IIB	T2b	NO	M0	X	X
	T2c	NO	M0	Any PSA	Any Gleason
	T1-2	NO	M0	≥20	Any Gleason
III	T1-2	NO	M0	Any PSA	≥8
	T3a-b	NO	M0	Any PSA	Any Gleason
IV	T4	NO	M0	Any PSA	Any Gleason
	Any T	N1	M0	Any PSA	Any Gleason
	Any T	Any N	M1	Any PSA	Any Gleason

1.3.5 TNM klasifikace

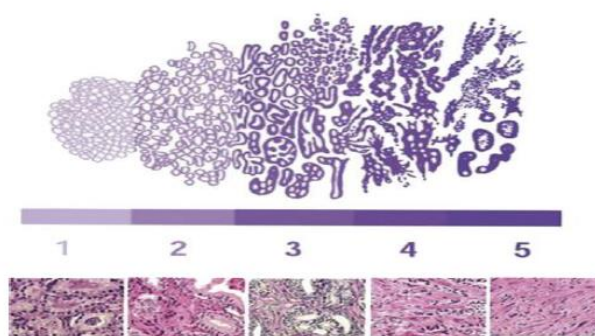
TNM klasifikace udává rozsah onemocnění neboli stádium (staging) nádoru.

Tabulka 3: Klasifikace nádorů prostaty podle TNM systému hodnocení a kritéria pro zařazení CaP do jednotlivých skupin (převzato a upraveno z Aus et al., 2003).

Klasifikační skupina	Kritéria pro zařazení do klasifikační skupiny
T1	tumor nehmateľný, nezobraziteľný
T1a	histologický nález v ≤5 % resekované tkáně
T1b	histologický nález v >5 % resekované tkáně
T1c	nález z punkční biopsie
T2	tumor omezen na prostatu
T2a	≤ polovina jednoho laloku
T2b	> polovina jednoho laloku
T2c	oba laloky
T3	šíření tumoru přes pouzdro prostaty
T3a	extrakapsulární šíření
T3b	invaze do semenného vaku
T4	infiltrace do okolních struktur
N1	přítomnost metastázy v regionální mízní uzlině
M1	přítomnost metastázy v mízní uzlině jiné než regionální
M1a	metastáza v kosti
M1b	metastáza v kosti
M1c	jiná lokalizace metastáz

1.3.6 Gleason skóre

Gleason skóre (GS) určuje architekturu nádorových prostatických žláz a stupeň žláznové diferenciace v bioptických vzorcích. Po blokování, nakrájení a nabarvení vzorků tumoru pomocí barvení hematoxylin/eosinem určuje patolog pod světelným mikroskopem nejčastější a druhý nejčastější stupeň diferenciace. Součet dvou nejčastějších stupňů udává Gleason skóre (např. 3+4=GS7). Stupňů diferenciace je celkem pět (Obrázek 7). Nádory mohou být dobře diferenciované a nízké rizikové (GS ≤6), středně diferenciované a středně rizikové (GS=7) nebo špatně diferenciované vysoce rizikové karcinomy (GS 8-10).

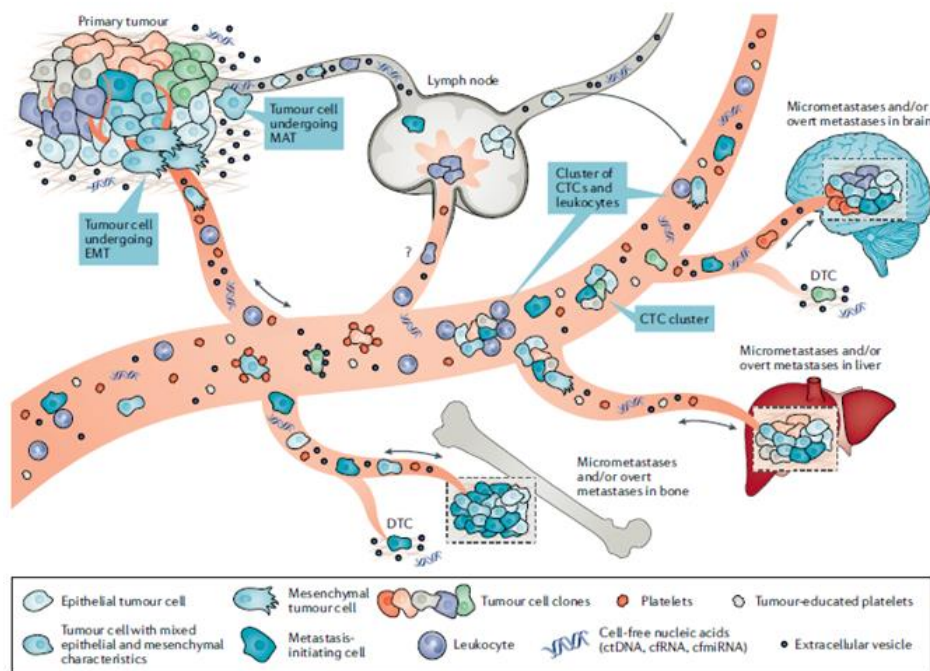


Obrázek 7: Gleason skóre (převzato z Harnden *et al.*, 2007).

1.4 Tekutá biopsie

Zvyšující se znalosti o patogenezi nádorového onemocnění přinášejí větší pozornost biomarkerům, které by zlepšily diagnostiku, prognózu a predikci. U nádorů jsou stále standardním způsobem získávány diagnostické vzorky z tkáňové biopsie, která je pro pacienty invazivní. Pokud je nádor heterogenní, nemusí být při biopsii v odebraném vzorku všechny maligní klonové populace obsaženy (Kubacková *et al.*, 2017). Tekutá biopsie z periferní krve patří mezi nejnovější a šetrnější přístupy k získávání informací o nádoru, protože krev obsahuje nejen krevní buňky, ale také cirkulující nádorové buňky (CTC), různé fragmenty buněk, molekuly DNA a RNA, malé váčky exozomy (Mithraprabhu *et al.*, 2017). Vyšetřování cirkulujících nádorových elementů v periferní krvi onkologických pacientů prožívá v posledních letech bouřlivý rozvoj. Tento postup nachází klinické využití zejména v oblasti molekulárního profilování prediktorů odpovědi či rezistence za účelem racionální volby léčby a dále v oblasti sledování dynamiky onemocnění, efektu zvolené léčby a časného záchytu progresu. Mezi výhody této metody

patří častý odběr vzorků, detekce mutací v buňkách z různých oblastí nádoru i metastáz, monitorování vývoje onemocnění a léčby, predikce odpovědi na léčbu, zahájení včasné léčby nebo určení molekulárního relapsu, neinvazivita, rychlost, efektivnost a snadná opakovatelnost (Mitra *et al.*, 2012). Tekutá biopsie má na druhou stranu i jisté nevýhody, mezi něž patří např. nízké množství cirkulujících nádorových buněk, nízké množství cirkulující nádorové DNA ve vzorku, odlišné hladiny CTC u různých pacientů a s tím související nutné ověření v rámci velkých studií (Kubackzová *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).



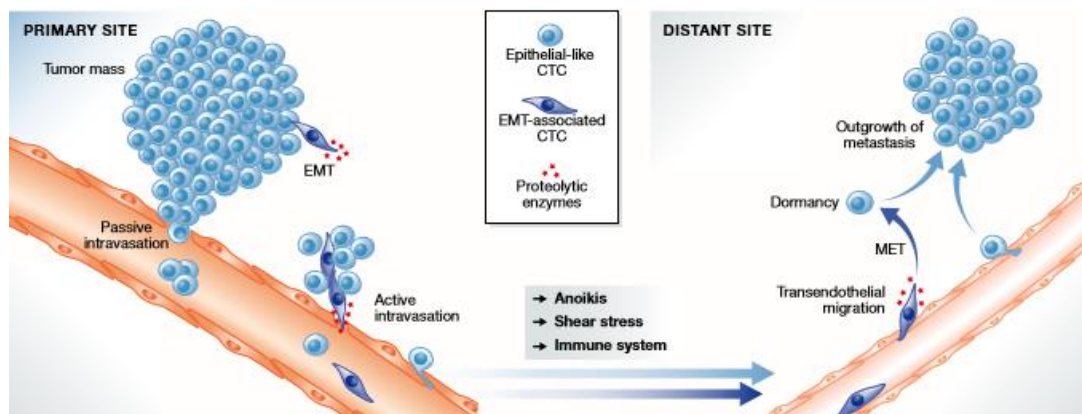
Obrázek 8: Biologie šíření nádorových buněk v krvi a jejich progresu až po tvorbu metastáz (převzato z Keller *et al.*, 2019). cfmiRNA, cell-free mikroRNA; cfRNA, cell-free RNA; ctDNA, cirkulující nádorová DNA.

Rozmanitost molekulárních mechanismů vedoucích k šíření nádorů se odráží v přítomnosti CTC v krvi. Na Obrázku 8 je ukázána biologie šíření nádorových buněk v krvi vedoucí k tvorbě metastáz nádoru. Mezi místa, z nichž nádorové buňky vstupují do krve, patří primární nádory, lymfatické uzliny a metastázy. Mezi molekulární mechanismy zapojené do invaze nádorových buněk patří epiteliálně mezenchymální tranzice (EMT), mezenchymálně améboidní přechod (MAT), jednotlivá nebo kolektivní migrace buněk. Extravazace do vzdálených míst (např. do kostí, plic, mozku nebo jater) a schopnost kolonizovat tato místa se mezi CTC liší. Diseminované nádorové buňky

(DTC) a nádorové buňky odvozené od mikrometastáz se mohou vrátit zpět do krevního řečiště. Do jaké míry tato „recirkulace“ přispívá k dalšímu metastatickému šíření nebo dokonce i lokální recidivě nádoru u pacientů s rakovinou je předmětem probíhajících výzkumů (Keller *et al.*, 2019).

1.4.1 Cirkulující nádorové buňky

Cirkulující nádorové buňky (CTC) jsou buňky uvolňované do krevního oběhu nebo kostní dřeně z primárního tumoru, ale i metastáz, a jsou schopné zakládat další vzdálené metastázy v těle. Jejich průměr se pohybuje od 4-13 μm do 15-35 μm . Mezi typické znaky pro CTC patří přítomnost jádra a viditelná cytoplazma, exprese cytokeratinu, a naopak absence exprese CD45, což je marker leukocytů. Jejich počet je velmi nízký, uvádí se 1 CTC na 10^6 - 10^7 leukocytů. Jako nepříznivý počet se udává >5 CTC/7,5 ml krve u karcinomu prsu a prostaty a >3 CTC/7,5 ml krve u kolorektálního karcinomu.



Obrázek 9: Metastatická kaskáda nádorových buněk (převzato z Joosse *et al.*, 2015).

Aby cirkulující nádorové buňky mohly migrovat (Obrázek 9), podstoupí epiteliálně mezenchymální tranzici (EMT), při které získají mezenchymální morfologii. Při EMT dochází ke snížení exprese integrinů, potlačení exprese E-kadherinu, a naopak zvýšení exprese N-kadherinu. Tím EMT zvyšuje fenotypovou variabilitu nádorových buněk. Při metastázování získají CTC schopnost separace a úniku z primárního tumoru, migrace skrz okolní tkáň a vstupu do lymfatického systému nebo krve (intravazace). Prostředí v krevním řečišti je pro CTC nepříznivé. Buňky musí přežít bez interakcí s okolními buňkami a matrix, vyhnout se apoptóze indukované ztrátou adheze (tzv. anoikis), dochází ke kolizím s krevními buňkami, střetu s imunitními buňkami,

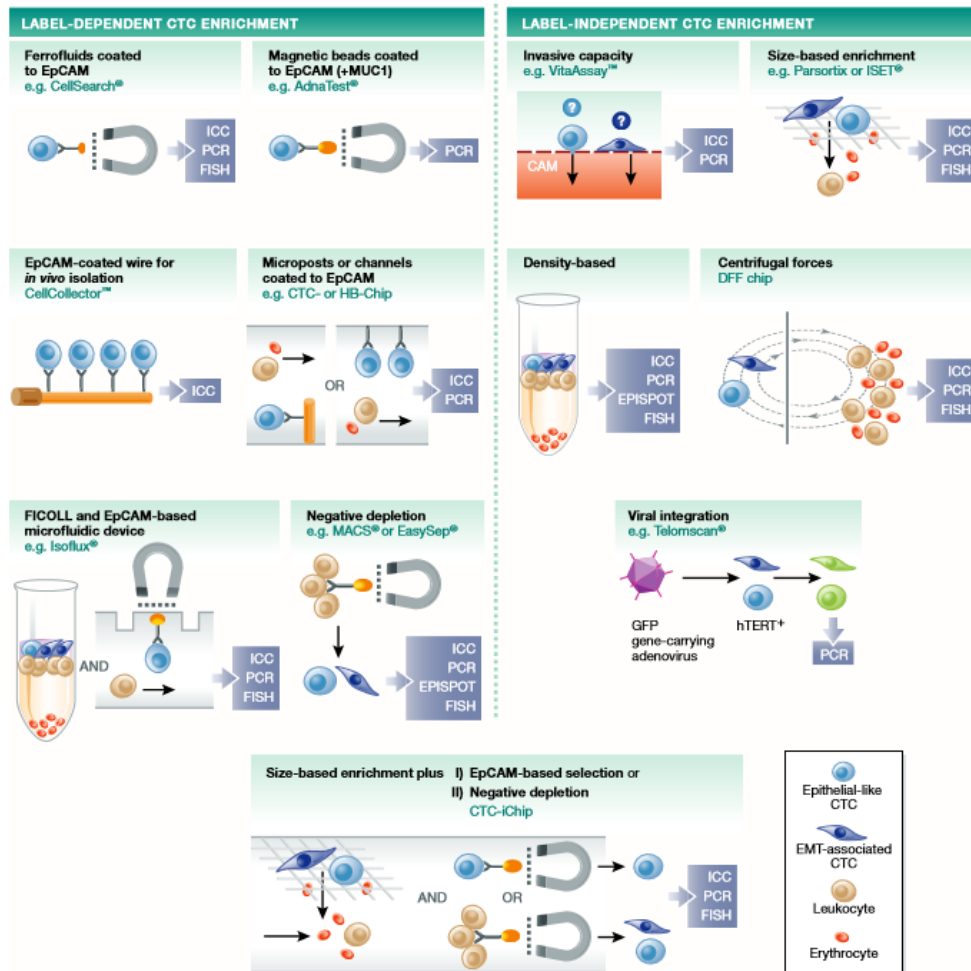
a nakonec opuštění krevního oběhu (extravazace) (Friedl *et al.*, 2011). Buňky mohou migrovat jednotlivě i jako klastry (2 a více buněk) a pohybovat se aktivně nebo pasivně. Jednotlivé buňky ztratí adhezivní pouta s okolními nádorovými buňkami, zatímco kolektivní migrace více buněk vyžaduje stabilní mezibuněčnou adhezi a mnohobuněčný koordinovaný pohyb (Friedl *et al.*, 2009). Aktivní migrace zahrnuje modifikaci buněčné morfologie (mezenchymální) a okolní tkáně, kdežto klastry mohou mít epitelální i mezenchymální morfologii. Kolektivní migrace vyžaduje vedoucí buňku s mezenchymálními znaky schopnou vytvořit cestu pro následující nádorové buňky skrz okolní tkáň. Nádorové buňky se mohou také pohybovat pasivně vlivem vnějších sil, a to růstem nádoru, působením mechanických sil nebo třením, v takovém případě je epitelální fenotyp zachován. Adaptace na nové mikroprostředí a proliferace jednotlivých nádorových buněk vyžaduje specifické rysy, buňky po diseminaci zastaví dělení, ale mohou zůstat v klidovém stavu, dokud prostředí neposkytne vhodné signály pro spuštění proliferace. Tento stav se nazývá klinická nádorová dormance a může trvat až 10 let (Joosse *et al.*, 2015).

Metody detekce cirkulujících nádorových buněk

Cirkulující nádorové buňky (CTC) se mohou izolovat pomocí pozitivní a negativní selekce (Obrázek 10). Pozitivní selekce separuje buňky od ostatních buněk na základě odlišných vlastností jako jsou fyzikální (velikost, hustota, el. náboj) nebo molekulární vlastnosti (exprese specifických povrchových markerů). Výhodou izolace pomocí fyzikálních vlastností je získání životoschopných buněk, kdy nedochází ke značení ani narušení jejich povrchu. Rozdílné velikosti může být využito při filtraci (MetaCell) buněk odvozených z epitelu, které jsou větší než krevní buňky. Metastázující buňky jsou více deformovatelné a mikrofluidní čip (Cellsee) využívá selekce dle velikosti a jejich schopnosti deformovat se v paralelní síti mikrofluidních kanálků s 56 tisíci záchytnými komorami. Větší buňky jsou zadrženy a menší projdou, dále se pak zadržené buňky značí imunohistochemicky nebo pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Gradientová centrifugace oddělí buňky na základě rozdílné buněčné denzity CTC a leukocytů od erytrocytů. Nádorové buňky mají negativnější povrchový náboj nebo elektrokinetický potenciál než leukocyty (ApoStream-ApoCell). Separace na základě molekulárních vlastností může být imunomagnetická a nemagnetická. Imunomagnetická separace využívá imunitní reakce, vazby specifické protilátky a antigenu na povrchu buněk (EpCAM, N-kadherin). CellSearch je zatím jediná FDA (Food and drug administration)

uznávaná metoda pro izolaci CTC, která využívá protilátky proti EpCAM navázané na magnetické kuličky a následnou klasifikaci buněk nabarvením CTC pomocí cytokeratinu 6, 8, 18, jádra DAPI a leukocytů CD45. Další metodou je například AdnaTest, který kombinuje imunomagnetické obohacení epiteliálních buněk pomocí protilátek proti EpCAM a PCR detekci specifických nádorových transkriptů. Nemagnetické metody využívají povrchových markerů epiteliálních buněk jako například mikrofluidní zařízení CTC čip v 78 000 ostrůvky s protilátkami proti EpCAM k zachycení CTC.

Pomocí negativní selekce se identifikují a následně odstraní buňky, které mají fyzikální nebo molekulární vlastnosti leukocytů, případně jiných kontaminujících buněk. Na základě molekulárních vlastností se pomocí protilátek odstraní leukocyty s antigeny na svém povrchu (CD45, CD66). Imunomagnetická selekce leukocytů využívá anti-CD45 protilátky konjugované na magnetických kuličkách. Mezi takové přístupy patří například EasySep (StemCells), MASC (MiltenyiBiotec) nebo Dynabeads (ThermoFisher). Mezi nemagnetické metody negativní selekce patří RosetteSep která využívá CD45 delece a kombinuje separaci dle hustoty buněk s obohacením pomocí protilátek (Joosse *et al.*, 2015).



Obrázek 10: Metody izolace CTC lze rozdělit na techniky používající nebo nepoužívající značení. Jako techniky s označením buněk se nejčastěji používají imunomagnetické testy zaměřené na protein EpCAM. Mezi metody, které nepoužívají označení patří přístupy založené na velikosti nebo hustotě buněk. Je také možná kombinace různých strategií. Zachycené nádorové buňky jsou připraveny pro molekulární charakterizaci pomocí imunocytochemie (ICC) za použití protilátek pro nádorově specifické markery nebo pomocí PCR přístupů zaměřených na nádorově specifickou mRNA nebo DNA sekvenci. Další možností je detekovat životaschopné buňky sekrecí proteinu (EPISPOT). Kromě toho lze pro detekci použít fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) nádorově specifické genové aberace (převzato z Joosse et al., 2015).

1.4.2 Volné nádorové nukleové kyseliny

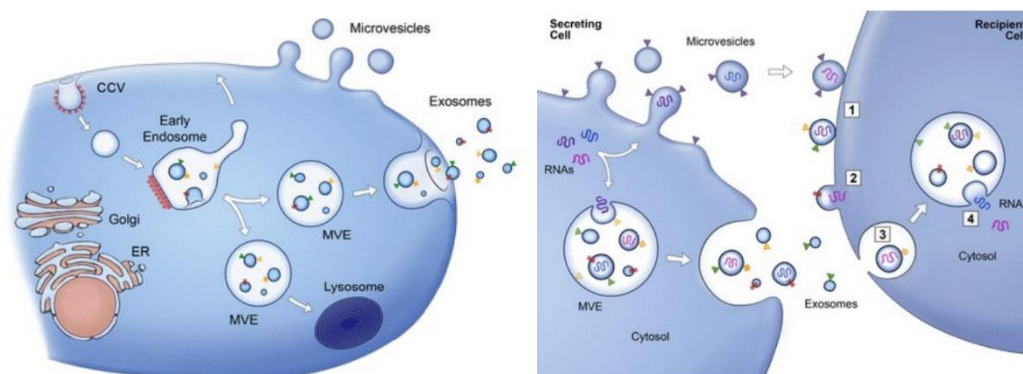
DNA vyskytující se volně v krvi se označuje jako cell-free DNA (cfDNA), cirkulující nádorová DNA poté jako circulating tumor DNA (ctDNA). Extracelulární krátké fragmenty dvouřetězcové DNA se mohou vyskytovat u zdravých jedinců o délce

180 bp a koncentraci 10-100 ng/ml (průměrně 13 ng/ml), zvýšená hladina bývá u pacientů s patologickými stavy (zánět, stres, autoimunitní onemocnění) a u pacientů s malignitami v pokročilém stádiu je průměrná koncentrace 180 ng/ml (0-5000 ng/ml), vyskytují se zde krátké (70-200 bp) a dlouhé (21 kb) fragmenty (Stroun *et al.*, 1987). Životnost ctDNA v krvi je v řádu minut až hodin, kdy je poté odstraněna játry. Zdrojem extracelulárních nukleových kyselin je apoptóza, nekróza nebo aktivní sekrece buňkami. Poměr mezi zdravou a nádorovou DNA (cfDNA/ctDNA) se zdá být slibný nádorový marker (Yu *et al.*, 2021). ctDNA může být využita jako diagnostický nástroj pro analýzu genetických a epigenetických změn. Tyto změny zahrnují mutace v DNA, ztrátu heterozygoty, hypermetylaci tumor supresorových genů, chromozomové přestavby, změny v mitochondriální DNA apod. ctDNA koreluje s velikostí nádoru a jeho stádiem, klinickými a radiologickými výsledky i progresí nádoru a metastázami (Ondroušková *et Hrstka*, 2015). Mezi metody izolace patří kolonkové metody komerčně dostupných kitů, fenol chloroformová extrakce nebo použití magnetických částic. Kvantifikace využívá qPCR, dPCR, BEAMing, NGS nebo cílené hloubkové sekvenování (TAM-seq, Safe-seq, CAPP-seq).

1.4.3 Exozomy

Exozomy jsou malé váčky o průměru 30-100 μm , které vznikají vylitím vnitřních váčků multivezikulárních tělísek (MVB) ven z buňky (Obrázek 11). MVB je intracelulární struktura obsahující váčky, které vznikají pučením membrány do lumen endosomu. Fúzí membrány MVB s membránou buňky se váčky ve formě exozomů uvolní do mimobuněčného prostoru, kde se mohou přichytit na plazmatickou membránu cílové buňky a fúzovat s ní nebo jsou pohlceny endocytózou (Raposo *et Stoorvogel*, 2013). Do váčků je při jejich tvorbě zabudována část proteinů a nukleových kyselin z původní buňky. Mohou tedy přenášet cytoplazmatické proteiny, signální molekuly a RNA (mRNA, miRNA). Exozomy se mohou podílet na růstu tumorů a vzniku metastáz tím, že přenáší signály, které podporují růst nádoru, angiogenezi, invazivitu, únik imunitnímu systému a rezistenci k léčbě. Exozomy mohou být také použity v diagnostice a léčbě. Protože jejich složení odráží stav buněk, ze kterých pochází, výzkum se zaměřuje na jejich využití jako diagnostickém prostředku časných patologických změn včetně rakoviny a neurodegenerativních onemocnění. V léčbě by se mohla využít schopnost váčků přenášet proteiny, mRNA a miRNA do vzdálených buněk, protože molekuly opouzdřené uvnitř exozomu jsou odolné v tělních tekutinách. Díky schopnosti přenášet

svůj vnitřní náklad do buněk se nabízí využití k přenosu terapeutických molekul do určité tkáně nebo cílových nádorových buněk, což by zvýšilo účinek léčby. Geneticky upravené exozomy (miRNA, siRNA) mohou tlumit růst tumorů nebo potlačit zánět. Váčky lze izolovat pomocí tří základních technik a to ultracentrifugací, protilátkami na magnetických kuličkách a gelovou filtrační chromatografií (Skalníková *et* Kovářová, 2017).



Obrázek 11: Schéma tvorby exozomů a mechanismu přenosu buněčného materiálu (převzato z Raposo *et* Stoorvogel, 2013).

1.5 Biomarkery u karcinomu prostaty

Měření hladiny PSA je zlatý standardní test pro screening a diagnostiku rakoviny prostaty. Hladiny PSA jsou však zvýšené i u mužů s BPH nebo zánětem prostaty. Specifičnost testu PSA u mužů s hladinou PSA 4,0-10,0 ng/ml je přibližně 20-45 % a řada mužů se zvýšenými hladinami PSA podstoupila zbytečnou biopsii prostaty (Fujita *et al.*, 2009). PSA test nedokáže odlišit vysoce rizikový karcinom prostaty, proto je nezbytný vývoj konkrétnějších biomarkerů pro rakovinu prostaty. Moč je slibným zdrojem pro výzkum nových biomarkerů rakoviny prostaty. Nádorové buňky prostaty nebo intraepiteliální neoplázie prostaty vznikající z epitelu prostaty mohou vylučovat látky nebo uvolňovat jejich buněčný obsah do prostatických žláz a samotné buňky rakoviny prostaty se uvolňují do prostatických žláz. Prostatická tekutina obsahuje látky pocházející z buněk rakoviny prostaty a tyto buňky jsou po manipulaci s prostatou pomocí DRE vylučovány do moči. Některé z těchto látek lze detekovat v moči i bez manipulace s prostatou pomocí citlivého testu nebo pokud se v moči vyskytují ve velkém množství. Například PSA přítomný v prostatické tekutině se vylučuje močí a lze je detekovat v moči bez manipulace s prostatou. Prostatická manipulace může obtěžovat pacienty, ale může

zvýšit hladinu biomarkerů v moči. Vhodnými kandidáty na biomarkery jsou buňky rakoviny prostaty, DNA, RNA, proteiny, exozomy a další malé molekuly přítomny v moči (Tosoian *et al.*, 2016).

Prostatický specifický membránový antigen (PSMA), také známý jako folát hydroláza I nebo glutamát karboxypeptidáza II, je transmembránový protein typu II s glutamát karboxypeptidázovou aktivitou. Vykazuje významnou nadměrnou expresi v buňkách rakoviny prostaty, včetně pokročilého stádia karcinomů prostaty, ale naopak nízkou expresi v normálních zdravých tkáních a je tedy vynikající cíl pro vývoj léčiv. PSMA lze tedy považovat za ideální pro vývoj malých a nízkomolekulárních cílených radiofarmak s rychlou clearance krve a nízkou aktivitou pozadí (Haberkorn *et al.*, 2016).

Klíčovým nádorovým supresorem, jehož exprese je u mnoha rakovin, včetně karcinomu prostaty down-regulována, je p27. Jedná se o klíčový regulátor buněčného cyklu, známý jako KIP1, který je kódován genem CDKN1B a reguluje progresi buněčného cyklu z klidové fáze do G₁ a z G₁ do S fáze inhibicí komplexů cyklin-dependentních kináz (CDKs)/cyklin. S patogenezí rakoviny prostaty bylo spojeno jak snížení hladiny exprese p27, tak snížení jeho jaderné akumulace. Je zajímavé, že delece nebo mutace genu CDKN1B jsou u rakoviny vzácné. To naznačuje, že p27 je do značné míry u rakoviny deregulován změnou subcelulární lokalizací a na úrovni exprese (Raghu *et al.*, 2017).

Většina karcinomů prostaty si nakonec vyvine rezistenci na hormonální terapii a chemoterapii. Bylo identifikováno mnoho mechanismů rezistence na chemoterapii. Mezi takové mechanismy patří mutace nebo inaktivace supresorového genu p53 a nadměrná exprese bcl-2. Mutace v genu p53 mohou vést k rezistenci vůči určitým chemoterapeutikům a takové mutace jsou pozorovány častěji u metastatických než u primárních karcinomů prostaty. Nadměrná exprese bcl-2 se často vyskytuje u rakoviny prostaty a je spojena jak s hormonální terapií, tak s rezistencí na chemoterapii. V experimentálních systémech dochází k nadměrné expresi bcl-2 po androgenní deprivaci a transfekce bcl-2 do citlivých buněčných linií je činí odolnými vůči chemoterapii a hormonální terapií. Bcl-2 může být inaktivován fosforylací, jak je tomu u taxanů (DiPaola *et al.*, 1999).

Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) má významnou roli v tumorogenezi a progresi karcinomu prostaty. Jak se již dříve ukázalo, exprese EGFR je spojena s vysokým stupněm, pokročilým stádiem a vysokým rizikem recidivy prostatického specifického antigenu a kostních metastáz. Navíc bylo prokázáno, že EGFR

řídí vývoj kostí. Ve skutečnosti, jako jeden z regulátorů EMT, (de)diferenciace, proliferace a angiogeneze, EGFR může iniciovat a/nebo podporovat diseminaci a metastázování nádoru, a proto může být považován za marker vysokého metastatického potenciálu (Nastały *et al.*, 2020).

1.5.1 Močové biomarkery u karcinomu prostaty

Testování biomarkerů v tělních tekutinách souvisejících s onemocněním, které lze získat neinvazivním způsobem, se zdá být dobrou alternativou jako možný screeningový nástroj. Kvůli jednoduchému získávání a skutečnosti, že buňky prostaty jsou přímo uvolňovány do močové trubice prostatickými kanály po DRE, se moč může stát budoucností pro neinvazivní testování biomarkerů u CaP (Hessels *et al.*, 2013) a také jednou z nejatraktivnějších biologických tekutin v klinické praxi. Ve srovnání s jinými klinickými biologickými vzorky má moč mnoho výhod pro stanovení diagnostických i prognostických biomarkerů (Fernandez-Serra *et al.*, 2015). Lze ji získat ve velkém množství a nedochází k žádné významné proteolytické degradaci ve srovnání s jinými tělními tekutinami (Thomas *et al.*, 2010). Navíc má jednodušší složení ve srovnání se sérem nebo plazmou, což snižuje interference v izolaci a usnadňuje vyhodnocování nových biomarkerů.

S rozvojem molekulární biologie byly v poslední době provedeny rozsáhlé studie profilování genů spojených s CaP. Byly identifikovány slibné genetické a epigenetické biomarkery včetně specificky nadměrně exprimovaných genů v buňkách CaP. Tyto důležité biomarkery moči u CaP zahrnují dlouhé nekódující RNA (lncRNA), jako je například prostatický nádorový antigen 3 (PCA3), biomarkery fúzního genu specifického pro CaP, jako je transmembránová serinová proteáza 2 (TMPRSS2) a metylační biomarkery specifické pro CaP, jako je glutathion S-transferáza P (GSTP1). Studium močových mikroRNA (miRNA) je další rozvíjející se oblastí pro zkoumání biomarkerů za účelem dosažení pre-bioptické predikce CaP, která přispěje k jeho včasné detekci (Wu *et al.*, 2017).

AMACR

Alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) je peroxisomální a mitochondriální enzym, který hraje důležitou roli v biosyntéze žlučových kyselin a β -oxidaci mastných kyselin. Je zodpovědný za konverzi (2R)-methylacyl-CoA estery na jejich (2S)-methylacyl-CoA epimery. Zvýšená koncentrace a aktivita proteinu je spojená

s karcinomem prostaty a enzym je používán jako biomarker u biopsie. Ve tkáni CaP bylo nalezeno 10 různých variant, které vznikají alternativním sestřihem mRNA (Esfahani *et al.*, 2015).

EpCAM

Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) je transmembránový glykoprotein, který je zapojen v buněčné signalizaci, migraci, proliferaci a diferenciaci. Má onkogenní potenciál díky schopnosti upregulovat c-myc, e-fabp a cykliny A, E. Je exprimován v epiteliálních a epiteliálně derivovaných neoplasmech, proto může být použit jako diagnostický marker u nádorů. Hraje roli v tumorogenezi a metastázování nádorů. Jedná se o potenciální prognostický marker a cíl pro imunoterapeutické strategie (Ni *et al.*, 2012).

EZH2

Enhancer of zeste homology 2 (EZH2) je histon lyzin N-methyltransferáza, enzym kódovaný genem EZH2, který se účastní histonové metylace a nakonec transkripční represe. Katalyzuje přidávání metylových skupin k histonu H3 na lyzinu za použití kofaktoru S-adenosyl-L-methioninu. Metylační aktivita EZH2 usnadňuje tvorbu heterochromatinu, čímž umlčuje funkci genu. Přestavba chromozomálního heterochromatinu pomocí EZH2 je také zapotřebí během mitózy. Mutace nebo nadměrná exprese EZH2 byla spojena s mnoha formami rakoviny. EZH2 inhibuje geny zodpovědné za potlačování vývoje nádoru a blokování aktivity EZH2 může zpomalit růst nádoru. EZH2 je atraktivním cílem protinádorové léčby, protože pomáhá nádorovým buňkám se dělit a proliferovat. EZH2 se stal cílem pro inhibici, protože je upregulován u mnoha rakovin včetně prsu, prostaty nebo močového měchýře. Exprese tohoto genu je často zvýšena u pokročilého CaP a zároveň souvisí se špatnou prognózou tohoto onemocnění (Liu *et al.*, 2017).

MSMB

Beta-microseminoprotein (MSMB) je jedním ze tří hlavních proteinů vylučovaných epiteliálními buňkami prostaty a sekretovaných do semenné plazmy. Je vylučován epiteliálními buňkami i v dalších orgánech, kde se vyvíjí karcinomy s pozdním nástupem, jako například játra, plíce, ledviny, jícen, žaludek atd. Protein má inhibiční aktivitu a inhibuje růst nádorových buněk CaP. Snížená exprese proteinu

MSMB způsobená polymorfismem 1 nukleotidu je spojena se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prostaty. MSMB může být použit jako biomarker, kdy močový MSMB je lepší než močový PSA u mužů (Peng *et al.*, 2017).

PA2G4

Proliferation associated protein 2G4 (PA2G4) je označován také jako ErbB3-binding protein 1 (EBP1). Hladiny exprese tohoto genu korelují s prognózou u řady rakovin, včetně neuroblastomu, mozku, prsu, prostaty, pankreatu a dalších nádorů. Existují dvě izoformy PA2G4-p42 a PA2G4-p48. I když tyto izoformy PA2G4 regulují růst a diferenciaci, mají často v závislosti na kontextu protichůdné role. Proto může PA2G4 fungovat buď jako kontextový tumor supresor, nebo jako onkogen, v závislosti na studované tkáni (Stevenson *et al.*, 2020).

PCA3

Prostatic cancer antigen 3 (PCA3) je dlouhá jednovláknová nekódující mRNA, která nasednutím na mRNA vlákno tumor supresoru PRUNE2 inhibuje jeho účinek. PCA3 obsahuje velké množství stop kodónů, kvůli kterým není translatována do proteinu. Exprese PCA3 je 10-100 násobně vyšší v nádorové tkáni a jeho hladina není závislá na věku pacienta, přítomnosti zánětu, poškození prostaty nebo biopsiích. PCA3 je nejspecifičtější gen CaP a může být využit jako biomarker pro karcinom prostaty, kdy se vypočítá PCA3 skóre jako poměr PCA3 mRNA/PSA mRNA násobené 1000 (Yang, Yu *et Wang*, 2016).

PSGR

OR51E2 neboli olfactory receptor 51E2 (PSGR) je protein, který je u lidí kódován genem OR51E2. Receptor interaguje s pachovými molekulami v nose a iniciuje odpověď neuronů, které spouští vnímání vůně. Je to člen velké rodiny receptorů spojených s G-proteiny (GPCR). Olfactory receptory sdílejí transmembránovou doménovou strukturu s mnoha neurotransmiterními a hormonálními receptory a jsou zodpovědné za rozpoznávání a transdukcí pachových signálů zprostředkovaných G-proteinem. Overexprese PSGR je asociována s PIN a nádory prostaty. V porovnání s BPH se exprese u PIN zvyšuje, zvláště u časných nádorů prostaty (Rodriguez *et al.*, 2014).

PTEN

Tumor supresorový gen phosphatase and tenzin homolog (PTEN) na chromozomu 10 je důležitý regulátor signalizace fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kinázy (PI3K) prostřednictvím katalýzy konverze fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfátu (PIP3) na fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát (PIP2). Pokles hladin PIP3 v důsledku aktivity PTEN má inhibiční účinek na signální dráhu, což má za následek pomalejší buněčný růst a posun molekulární rovnováhy ve prospěch apoptózy. Proto je PTEN účinným supresorem nádorů a jeho ztráta funkce je pozorována u široké škály malignit včetně rakoviny prostaty. U primárního karcinomu prostaty jsou genomové alterace PTEN pozorovány u přibližně 20 % případů a u kastračně rezistentního karcinomu prostaty mohou tyto změny postihnout až 50 % pacientů. Tato čísla naznačují významnou příležitost pro cílenou terapii, pokud se specificky zacílí PTEN mutantní nádorové buňky (Ozturk *et al.*, 2020).

RHOA

Ras homolog gene family membrane A (RHOA) je malý GTPázový protein v Rho rodině. Je asociován s regulací cytoskeletu, tvorbou aktinových stresových vláken a aktin-myosinovou kontraktilitou. Účastní se dynamiky cytoskeletu, transkripce, průběhu buněčného cyklu a buněčné transformace. Rodina proteinů Ras se podílí na regulaci a načasování buněčného dělení. Zvýšená exprese RHOA je spojena se zvýšenou letalitou a agresivní proliferací u karcinomu prostaty. Může hrát roli v rozlišení CaP od BPH a identifikaci agresivních onemocnění (Chen *et al.*, 2016).

TMPRSS2-ERG

Jedná se o fúzní gen, který se vyskytuje až u 70 % karcinomů prostaty. TMPRSS2 je transmembránová proteáza, serin 2, exprimována na buněčném povrchu, která reguluje mezibuněčné a intrabuněčné interakce. ERG je estrogeně regulovaný gen, ETS transkripční faktor, který se podílí na poškození DNA nebo proliferaci EMT. Nejčastěji k fúzi obou genů dochází mezi TMPRSS2 exonem 1 a ERG exonem 4. Fúzní gen u CaP se jeví jako více agresivní fenotyp s horší prognózou, vyšším stupněm nádoru a Gleason skóre (Fujita *et al.*, 2018).

TRPM8

Transient receptor potential cation channel subfamily M (melastatin) member 8 (TRPM8) je protein, který je u lidí kódován genem TRPM8. Jedná se o iontový kanál, který po aktivaci umožňuje vstup iontů Na^+ a Ca^{2+} do buňky, což vede k depolarizaci a generování akčního potenciálu. Je exprimován v senzorytických neuronech a je aktivován chladnými teplotami a podněty. Dále je také exprimován v prostatě, plicích a močovém měchýři. TRPM8 je androgen deprivace Ca²⁺ kanál nezbytný pro růst a přežití rakovinných buněk prostaty. Kanály TRPM8 mohou být cílem léčby CaP (Liu *et al.*, 2016).

KLK3

Prostatický specifický antigen (PSA) nebo kalikrein (KLK) 3 je enzym uvolňovaný do semenné tekutiny. Je vylučován z buněk obklopujících a tvořících vnitřní část acinu prostaty a lumenálních epitelálních buněk. Zvýšené hladiny PSA v séru se často využívají jako markery rakoviny prostaty, ale jsou také pozorovány při ejakulaci, transuretrální katetrizaci, transrektální ultrasonografii, traumatu, infekcích prostaty a benigní hyperplazii prostaty. Hladiny PSA mohou být také použity jako prognostické markery recidivy rakoviny. Takový biochemický relaps obvykle předchází jiným klinickým příznakům a symptomům recidivy.

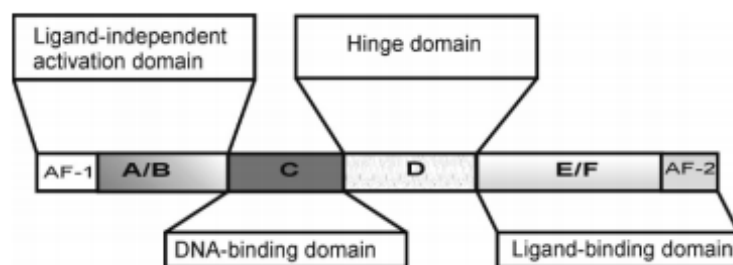
Geny KLK jsou lokalizovány na chromozomu 19q13 a kódují 15 serinových proteáz, největší rodinu proteáz v lidském genomu. Tyto proteázy hrají roli v různých fyziologických procesech, jako je zkapalňování semene a odlupování kůže. Různá množství genů KLK jsou exprimována v širokém spektru tkání, což ukazuje na různý stupeň jejich funkčního zapojení do fyziologických procesů. Například některé geny KLK (NES1, proteáza M, PSA) mají sníženou expresi v prostatě, prsu a některých dalších rakovinách (Boyukozer *et al.*, 2020).

Ki67/MK167

Ki67 je v onkologii dobře známým ukazatelem pro definování nádorové proliferace. Detekce exprese Ki67 pomocí imunohistochemie se používá jako prognostický marker buněčné proliferace u mnoha nádorů, zejména u karcinomu prsu a rakoviny děložního čípku. U karcinomu prostaty je také spojován s klinickým výsledkem, bez ohledu na léčbu (Pascale *et al.*, 2016).

1.6 Steroidní receptory

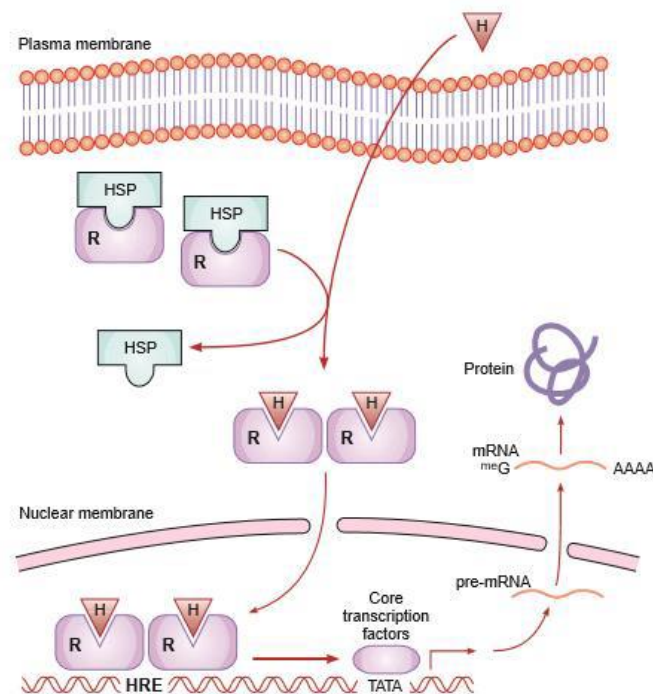
Steroidní receptory jsou transkripční faktory, které přenáší efekt nízkomolekulárních lipofilních látek na úroveň transkripční genomické odezvy. Tyto receptory váží steroidní hormony a steroidům podobné látky (ligandy) regulující transkripci cílových genů. Strukturu mají všechny steroidní receptory do jisté míry stejnou, jsou složeny z několika domén (Obrázek 12). Na N-konci se nachází N-terminální doména (NTD), která je variabilní a obsahuje AF-1 tzv. aktivační funkci 1, což je doména s aktivační sekvencí, která zajišťuje aktivaci receptoru nezávislou na vazbě ligandu. Další je DNA-vázající doména (DBD) zajišťující vazbu receptoru na DNA, kde se nachází hormonálně responzivní element (HRE). Je tvořena 2 zinkovými prsty, mezi kterými je α -helix, který při vazbě receptoru na DNA zapadá do velkého žlábkku. Jedná se o vysoce konzervovaný úsek. Pantová oblast se nachází mezi DBD a ligand vázající doménou (LBD). Jedná se o dimerizační doménu, která je zodpovědná za tvorbu dimeru dvou receptorů po aktivaci ligandem. Obsahuje nukleární lokalizační signál (NLS), který směřuje aktivovaný receptor do jádra. Poslední doménou na C-terminálním konci je ligand vázající doména, kde dochází k navázání ligandu do hydrofobní oblasti, interaguje také s jinými transkripčními faktory a vážou se sem korepresory a koaktivátory. Obsahuje AF-2 (aktivační funkce 2), která po vazbě ligandu indukuje aktivaci transkripce. Tato doména také interaguje s HSP (proteiny teplotního šoku), které stabilizují receptor, udržují správnou konformaci receptoru pro navázání ligandu a znemožňují transport receptoru přes jaderné póry před navázáním hormonu (Zieleniak *et al.*, 2008).



Obrázek 12: Struktura steroidních receptorů (převzato ze Zieleniak *et al.*, 2008).

Na Obrázku 13 je zobrazeno schéma působení hormonů a receptorů v buňkách. Lipofilní steroidní hormony jsou v krvi transportovány vázané na transportní proteiny (globulin vázající pohlavní hormon-SHBG; albuminy). Malá část (1-2 %) steroidních

hormonů je v krvi volně a prochází cytoplazmatickou membránou do cílových buněk, kde se váže na LBD receptoru. Tím dochází k disociaci proteinu teplotního šoku a aktivaci receptoru. Odpojení HSP90 umožňuje dimerizaci dvou receptorů a odhalení nukleárního lokalizačního signálu, který vede k translokaci receptoru do jádra přes jaderné póry. Dimerizovaný receptor v jádře obsadí hormonálně responzivní element, který se nachází v promotorových oblastech cílových genů. Steroidní hormony ovlivňují genovou expresi prostřednictvím koaktivátorů (nebo korepresorů), které interagují s komplexem transkripčního aparátu a ovlivňují ho. Poté dochází k zahájení transkripce, kterou vzniká neupravené vlákno mRNA (pre-mRNA), které je dále posttranskripčně upraveno a translatováno do proteinu (Gardner *et al.*, 2011).

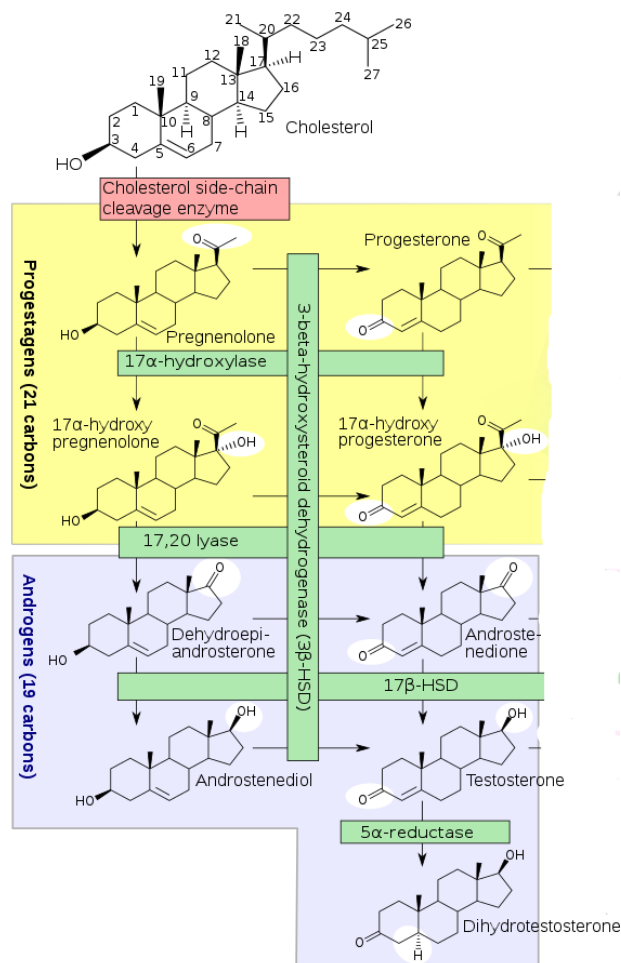


Obrázek 13: Schéma působení hormonů a receptorů v buňkách (převzato z Gardner, 2011).

1.6.1 Androgenový receptor

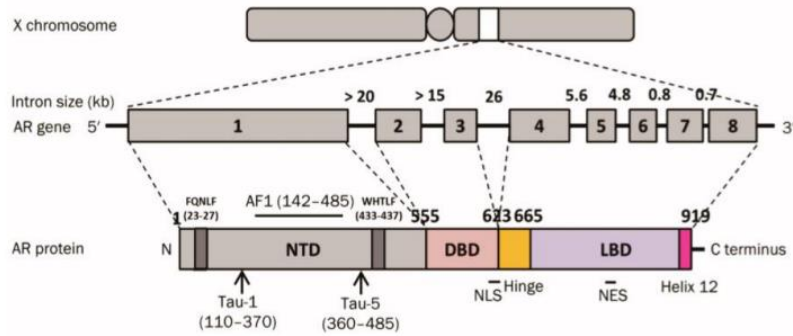
Androgeny jsou mužské pohlavní hormony, které jsou zodpovědné za diferenciaci mužského genitálního systému u plodu. V pubertě jejich působením dochází k růstu penisu, varlat, prostaty, semenných váčků a ochlupení. Tyto hormony vznikají v Leydigových buňkách varlat a v menší míře také v kůře nadledvin (zona reticularis). Nádory prostaty jsou schopné také produkovat vlastní androgeny. Tyto hormony vznikají steroidogenezí z prekursoru cholesterolu (Obrázek 14). Testosteron se působením

enzymu 5 α -reduktázy mění na biologicky aktivnější dihydrotestosteron (DHT), který je ligandem pro androgenový receptor (AR).



Obrázek 14: Steroidogeneze androgenů (převzato z Miller et al., 2017).

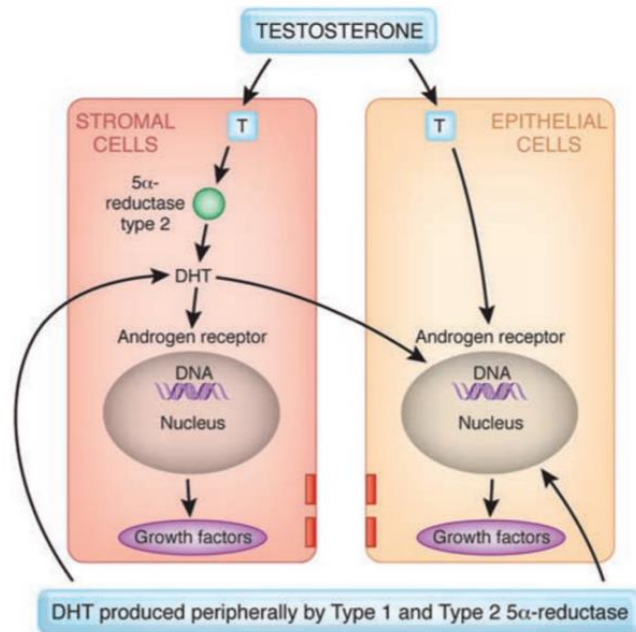
Androgenový receptor patří do rodiny steroidních transkripčních receptorů. Nachází se na krátkém raménku chromozomu X, obsahuje 919 aminokyselin a jeho velikost je 110 kDa. Je tvořen 8 exony, které kódují 3 hlavní domény receptoru (Obrázek 15). Exon 1 kóduje NTD, kde jsou přítomny polyglutaminové trinukleotidové repetice (CAG). Jejich normální počet se pohybuje mezi 8 až 35 (průměrně 21), pokud dojde ke zkrácení počtu na méně než 21, zvyšuje se riziko karcinomu prostaty, naopak při vyšším počtu CAG než 40 se snižuje mužská fertilita. Exony 2 a 3 kódují první a druhý zinkový prst na DNA vázající doméně a poslední LBD je kódována exony 4-8 (Tan et al., 2015).



Obrázek 15: *Struktura AR genu a proteinu (převzato z Tan et al., 2015).*

Funkcí AR je regulace transkripce genů, které kódují proteiny nezbytné pro funkci prostaty, regulace genové exprese fúzních genů, růstových regulátorů, transkripčních faktorů nebo regulátorů buněčného cyklu. Podporují také diferenciaci luminálních a epiteliálních buněk prostaty. Spuštění transkripce aktivním AR je klíčové pro normální vývoj prostaty, růst a zachování fyziologických funkcí. Mezi androgen dependentní geny patří například PSA, PCA3, KLK2, hGK-1.

Na Obrázku 16 je ukázáno působení androgenů v buňkách prostaty. Testosteron difunduje do epiteliálních a stromálních buněk prostaty, může interagovat přímo s androgenovým (steroidním) receptorem navázáním na promotorovou oblast genů regulovaných androgenem. Ve stromálních buňkách je většina testosteronu přeměněna na dihydrotestosteron, který je mnohem účinnějším androgenem a může působit autokrinním způsobem ve stromálních buňkách nebo parakrinním způsobem difúzí do epiteliálních buněk v těsné blízkosti. DHT je produkován primárně v kůži a játrech, může difundovat do prostaty z oběhu a zde působit endokrinním způsobem. V některých případech může bazální buňka prostaty sloužit jako místo produkce DHT, podobně jako buňka stromální (Roehrborn, 2008).

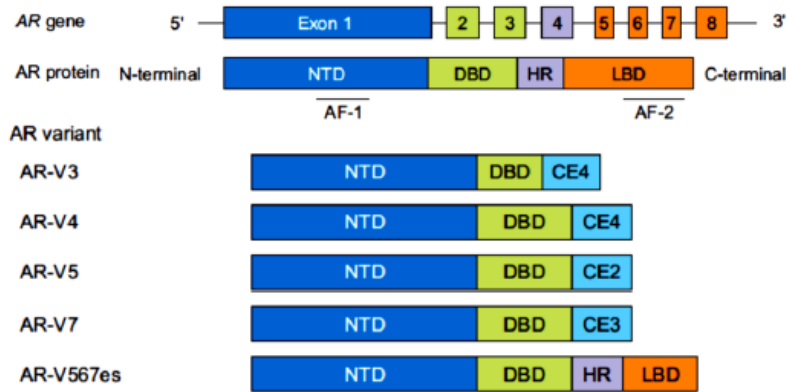


Obrázek 16: Působení androgenů v buňkách prostaty (převzato z Roehrborn, 2008).

Vlivem působení androgenní deprivace dochází ke zvýšené transkripci AR a vzniku sestřihových variant, které jsou vytvářeny jako reakce na stresovou situaci. Sestřihové varianty AR jsou zkrácené proteiny bez ligand vázající domény, kterých je v současné době známo více než 20 (Obrázek 17). Jedná se o jeden z mechanismů rezistence karcinomu prostaty na léčbu. Mechanismy jejich vzniku mohou být strukturní změny v genu AR nebo alternativní sestřih mRNA (Fujita *et Nonomura*, 2019).

Nejvíce prostudovanou sestřihovou variantou u karcinomu prostaty je AR-V7, která je zkrácena na konci exonu 3 (obsahuje 16 aminokyselin), kde dochází ke ztrátě celé LBD. Spolu s AR-V1 se jedná o nejčastější variantu u CRPC. Vzniká alternativním sestřihem genu pro AR. Tyto varianty jsou androgen nezávislé a mohou být důvodem pro rezistenci na enzalutamid, který se váže právě na ligand vázající doménu AR. U části nemocných s mCRPC dochází během syntézy AR k alternativnímu sestřihu se vznikem zkrácené formy AR bez vazebné domény pro androgeny. Na takovou formu se nemůže androgen navázat a receptor může aktivovat signální dráhy i bez svého ligandu. Přítomnost AR-V7 na úrovni proteinu a mRNA zhoršuje celkovou prognózu pacientů s mCRPC a je spojena s refrakterností na ARTA terapii (androgen receptor targeted agents). Neovlivňuje však účinnost taxanů, z toho důvodu by mohl být AR-V7 použit jako prediktivní marker pro individualizaci personalizované léčby jako volba mezi ARTA terapií a taxany (Antonarakis *et al.*, 2014). Testování přítomnosti této sestřihové varianty

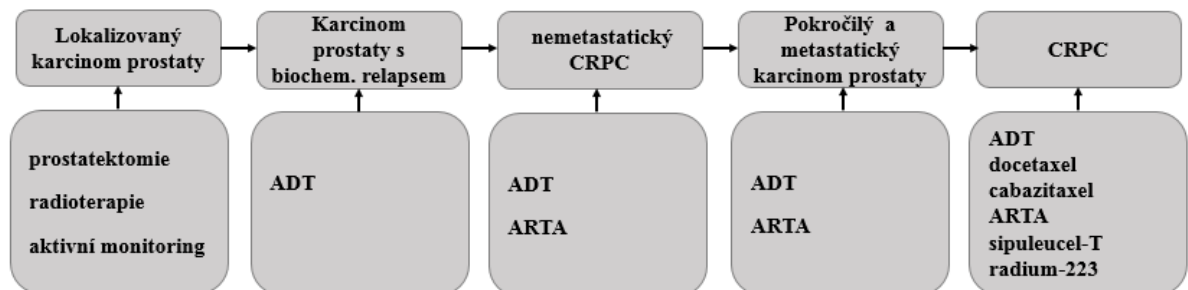
může být pomocí izolace cirkulujících nádorových buněk za použití imunomagnetické separace komerčně dostupným kitem AdnaTest pro detekci mRNA za použití RT-qPCR. Další metodou pro detekci mutovaného proteinu AR-V7 se používá automatizované vysokokapacitní skenování buněk na mikroskopickém sklíčku (EpicScience).



Obrázek 17: Sestříhové varianty androgenového receptoru (převzato z Fujita et Nonomura, 2019).

1.7 Léčba karcinomu prostaty

Na Obrázku 18 je zobrazeno léčebné schéma jednotlivých stádií rakoviny prostaty. Pro lokalizovaný karcinom se k léčbě nejčastěji využívá prostatektomie, radioterapie a aktivní sledování pacienta. Muži s nádorem prostaty v biochemickém relapsu jsou léčeni androgen deprivační terapií (ADT). Pro nemetastatické kastračně rezistentní karcinomy prostaty (CRPC) nebo pokročilé a metastatické nádory se volí léčba ADT a ARTA. Pacienti s CRPC už postupují většinou pouze léčbu na zpomalení postupu nemoci, zvýšení a prodloužení kvality života.



Obrázek 18: Schéma léčby různých stádií karcinomu prostaty (upraveno dle Stein et al., 2016).

1.7.1 Lokalizovaný karcinom prostaty

Lokalizovaný karcinom je ten, který nepronurůstá vazivovým pouzdrém a je omezen pouze na prostatu.

Pozorné vyčkávání (watchfull waiting) je léčebná metoda přísného dohledu, kdy pacient není aktivně léčen. Je zhodnoceno riziko nežádoucích účinků léčby pro pacienta a reálná doba přežití. Volí se u pacientů s vyšším věkem, kteří mají neagresivní průběh onemocnění (stádium I a II), nízké Gleason skóre (do 4), nádor o objemu do 1 cm³, který je malý, dobře diferenciováný, je omezen na žlázu a roste pomalu (zdvojení velikosti za 2-4 roky). Pacienti jsou sledováni do biochemické lokální a systémové progresy a nástupu symptomů a poté se zvolí vhodná léčba.

Aktivní sledování (aktive surveillance) není vhodné pro vysoce rizikové nádory. Volí se u nízké rizikových tumorů s diagnózou latentního či indolentního karcinomu, který neohrožuje pacienta na životě a jeho kvalitě. Provádí se pravidelné vyšetření hladin PSA v séru, DRE každé tři měsíce po dobu dvou let a poté každých 6 měsíců a kontrolní biopsie do 12-18 měsíců, poté každé 2 roky. Kritéria pro aktivní sledování jsou uvedena v Tabulce 4 (Balík *et al.*, 2011).

Tabulka 4: Epsteinova kritéria pro aktivní sledování (převzato z Balík *et al.*, 2011).

Parametr	Hraniční hodnota
PSA	< 10 ng/ml
PSA denzita	< 0,2 ng/ml na ml
GS	≤ 3 + 3 = 6
Stadium	cT1c-T1a
Pozitivní jehlové biopsie	≤ 2
Velikost tumoru	≤ 50% v jednom vzorku
Velikost tumoru	< 0,5 cm
Očekávané přežití	> 10 let

Chirurgická léčba radikální prostatektomií je volena u mladých mužů s předpokládanou dlouhou dobou života (>10 let), v dobrém biologickém stavu a bez jiných onemocnění. Operuje se karcinomem lokalizovaným (cT1-2) nepronurůstajícím do pouzdra a ohraničeným. Jedná se o odstranění celé prostaty včetně pouzdra, semenných váčků, někdy i lymfatických uzlin (pánevní lymfadenektomie) a části močové trubice procházející prostatou. K nežádoucím účinkům po operaci patří inkontinence a poruchy erekce. Operace může být otevřená, laparoskopická nebo robotem asistovaná. Nejčastěji volenou otevřenou operační technikou je retropubická prostatektomie, kdy je řez veden

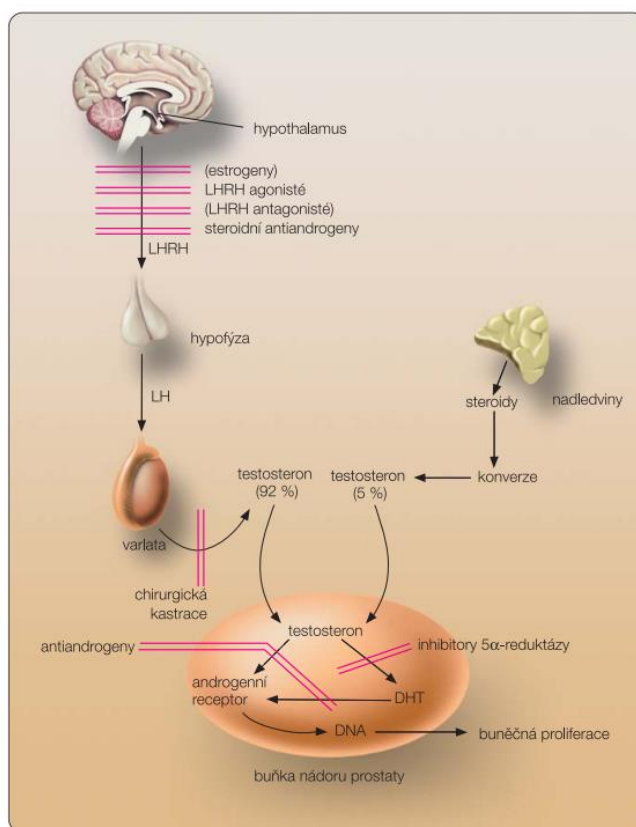
v podbřišku, dále perineální s řezem mezi šourkem a konečníkem. U laparoskopie jsou výhodou nižší krevní ztráty, kratší doba hospitalizace a rekonvalescence. Robotická operace je variantou laparoskopické, kterou provádí chirurg na dálku přes robotický systém.

Radioterapie je rovnocenná léčba k radikální prostatektomii a je indikována u starších pacientů, kteří mají další onemocnění, které by mohlo zvýšit riziko operace, nebo operační zákrok odmítají podstoupit. Je založena na principu cílení na často se dělící nádorové buňky vysokými dávkami lokálního záření, poškození zdravých buněk je redukováno jejich nižší dělicí frekvencí, nicméně jsou i tyto buňky v menší míře poškozovány. Existují dva způsoby ozáření, a to buď zevní, nebo vnitřní (brachyterapie). U zevní radioterapie, která převažuje, je zdroj záření (fotony) umístěn mimo tělo pacienta, kdežto u brachyterapie je zdroj aplikován přímo do prostaty ve formě radioaktivních zrn (I^{32}). Pooperační radioterapie se dělí na adjuvantní a paliativní. U nádorů s pozitivním chirurgickým okrajem nebo stádiem pT3b a vyšší se volí adjuvantní radioterapie, která bývá zahájena 3 měsíce po radikální prostatektomii jako prevence recidivy. Paliativní radioterapie je volena u pacientů s biochemickým relapsem po prostatektomii, kde bývá předpoklad generalizovaného onemocnění. Mezi akutní nežádoucí účinky ozáření patří dysurie, průjmy, hematurie, krvácení do stolice. Jako chronické jsou poté označovány radiační prostatitida, inkontinence stolice a moči a poruchy erekce.

1.7.2 Karcinom prostaty s biochemickým relapsem

Hormonální léčba (androgen deprivace – ADT, Obrázek 19) se obecně dělí na kastrocní (blokáda syntézy testosteronu vedoucí k jeho kastrocním hladinám a snížení hladin cirkulujících androgenů) a na léčbu antiandrogeny (blokáda vazby testosteronu na androgenový receptor bez vlivu na hladinu testosteronu). Po nasazení léčby by tato terapie měla být doživotní. Redukce hladin testosteronu může být provedena kastrocní chirurgickou, kdy se odstraní varlata (orchiektomie), nebo farmakologickou, kdy navození kastrocních hladin androgenů je dosaženo pomocí analogů hormonu uvolňujícího luteinizační hormon (LHRH), mezi které patří agonisté a antagonisté LHRH. Agonisté jsou syntetické deriváty LHRH, které nepřímou blokuji sekreci LHRH z hypotalamu tím, že zvyšují stimulaci hypofýzy, která skrz sekreci luteinizačního (LH) a folikuly stimulujícího (FSH) hormonu vede k přechodnému zvýšení hladiny testosteronu na 1-3 týdny (tzv. flare fenomén) a tím dochází k navození falešné nadbytečnosti neaktivního LHRH a poté při delší stimulaci hypofýzy vyvolává snížení

gonadotropinů a následné snížení hladin testosteronu. Dochází tedy k vyčerpání tvorby hormonu po předchozí hyperstimulaci hypofýzy, což vede nakonec k poklesu LH a následně testosteronu. Výhodou farmakologické kastrace je především její reverzibilní charakter. Mezi léky používané k farmakologické kastraci patří komerčně dostupné látky goserelin, buserelin, leuprorelin a triptorelin. Antagonisté LHRH přímo blokují receptory pro tento hormon (Matoušková, 2006). Hormonální léčba může být nasazena v různých časových modifikacích (Tabulka 5, Balík *et al.*, 2011).



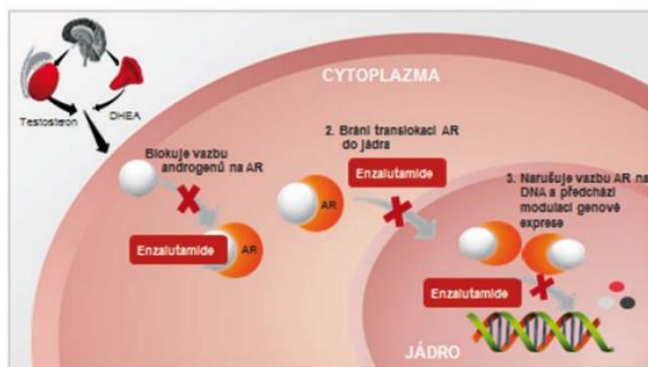
Obrázek 19: Schéma regulace syntézy testosteronu a místa jejího terapeutického ovlivnění v léčbě karcinomu prostaty (převzato z Matoušková, 2006).

Tabulka 5: Způsoby a načasování hormonální léčby (převzato z Balík *et al.*, 2011).

Způsob hormonální léčby	Metodika a načasování modifikací
Včasná hormonální léčba	Nasazení při zjištění diagnózy
Odložená hormonální léčba	Nasazení při příznacích
Totální androgenní blokáda	Kombinace orchiektomie nebo LHRH analogů s antiandrogeny
Minimální androgenní blokáda	Kombinace antiandrogenů a blokátorů 5 alfa reduktázy
Trvalá hormonální léčba	Nepřetržitě podávání
Intermitentní hormonální léčba	Přerušované podávání LHRH analogů (eventuálně antiandrogenů), vysazení při remisi a nasazení při relapsu

1.7.3 Nemetastatický CRPC a pokročilý metastatický karcinom prostaty

Hormonální léčba antiandrogeny zahrnuje látky soutěžící s cirkulujícími nebo lokálními androgeny o vazbu na androgenovém receptoru a blokující specifická místa androgenové signalizace. ARTA (androgen receptor targeted agents) terapie zahrnuje hormonální léčiva bicalutamid, enzalutamid a abirateron acetát. Bicalutamid brání translokaci AR do jádra a předchází přirozené signalizaci. Jedná se o nejvíce používané antiandrogenní léčivo, které vazbou na LBD (ligand vázající doménu) receptoru blokuje účinek testosteronu na nádorové buňky a nádor poté přestává růst. Velkou nevýhodou tohoto léku je častý vznik rezistence u pacientů, kteří mají zvýšenou expresi AR a tím se antagonisté mění na agonisty, kteří přispívají k progresi tumoru. Enzalutamid patří mezi nejnovější nesteroidní antiandrogeny 2. generace, který si zachovává vlastnosti antagonisty i při vyšším výskytu AR (Litwin *et al.*, 2017). Jedná se o selektivního antagonistu AR, který blokuje vazbu androgenů na AR, brání translokaci AR do jádra, narušuje vazbu AR na DNA a předchází modulaci genové exprese (Obrázek 20). Má vyšší afinitu k AR, ale nezachytí sestříhové varianty AR včetně AR-v7. Léčba enzalutamidem má za následek prodloužení života a období bez metastáz a také snižuje cirkulující a intratumorální hladiny androgenů a PSA (Katolická, 2014).



Obrázek 20: Enzalutamid cílí přímo na AR a jeho efekt se v AR signální cestě projevuje ve třech krocích (převzato z Katolická, 2014).

Abirateron acetát inhibuje syntézu androgenů v nadledvinách i v nádorech prostaty, které mohou být zdrojem androgenů po kastracní léčbě a důvodem selhání androgen deprivace terapie. Je součástí ARTA terapie, užívá se perorálně a jeho toxicita je minimální. Podává se spolu s malou dávkou kortikosteroidů (prednison) z důvodu účinku na nadledviny a bývá nasazen jako druhá linie léčby mCRPC

u pacientů progredujících po léčbě docetaxelem. Bylo prokázáno prodloužení přežití pacientů s mCRPC po podání toho léčiva. Jedná se o vysoce selektivní inhibitor enzymu CYP17A1 (cytochrom p45c17 17 α -hydroxyláza a C17,20-lyáza) (Barata *et al.*, 2019), který katalyzuje přeměnu pregnenolonu a progesteronu na konečné produkty kortizol a dihydrotestosteron (Obrázek 14) (Miller *et al.*, 2017).

1.7.4 Kastrálně rezistentní karcinom prostaty

Definice kastrálně rezistentního karcinomu prostaty (CRPC) má několik parametrů. Prvním z nich je kastrální hladina testosteronu (<50 ng/dl nebo <1,7 nmol/l). Další je progresse biochemická, tedy 3 po sobě jdoucí vzestupy PSA v séru v rozmezí nejméně 1 týdne a nejdéle 3 měsíců, dva vzestupy PSA ≥ 50 % nad nadír (nejnižší hodnota PSA po léčbě) a konečná hladina PSA ≥ 2 ng/ml. Posledním parametrem je radiologická progresse a nález dvou a více nových kostních lézí na scintigrafii.

Toto stádium karcinomu prostaty je bohužel zatím nevléčitelné a léčba pouze zpomalí postup nemoci, zvýší a prodlouží kvalitu života. Nicméně vývoj a výzkum stále nových léčiv dává naději i pro tyto pacienty. Androgen deprivační terapie by měla pokračovat doživotně a bývá nasazena u těchto pacientů i v průběhu jiných typů systémové léčby. Chemoterapie využívá taxany docetaxel a kabazitaxel. Obě cytostatika jsou odvozena od rostlinného alkaloidu taxolu z kůry stromu *Taxus brevifolia*. Dnes se vyrábí semisynteticky z rostlinného prekurzoru z jehličí evropského tisu *Taxus baccata*. Mechanismus účinku těchto látek spočívá v narušení funkce dělicího vřeténka během buněčného cyklu. Při buněčném dělení se tvoří dělicí vřeténko z mikrotubulů a taxany podporují jejich tvorbu a stabilizaci a inhibují depolymerizaci. V důsledku toho dochází k zablokování buněčného cyklu. Docetaxel se běžně podává jako 1. linie léčby u CRPC pacientů. Kabazitaxel je derivát docetaxelu a je podáván jako 2. linie léčby k docetaxelu. Další možnou léčbou u pacientů z CRPC je ARTA terapie. Sipuleucel-T je vakcína autologních dendritických buněk, která je zatím jako jediný lék tohoto typu registrovaný v USA. Využívá aktivní buněčnou imunoterapii s největší šancí na úspěch v začátku léčby. Mononukleární buňky jsou z periferní krve získávány pomocí mimoséparace a sběru leukocytů (leukoferéza) a inkubují se s rekombinantním fúzním proteinem, který je tvořen prostatickou kyselou fosfatázou (PAP) a granulocytárním kolonie stimulujícím faktorem (GM-CSF). Poté jsou buňky vráceny do těla pacienta ve 3 infuzích ve dvoutýdenních intervalech. Radium-223 je radioizotop produkující α -

záření, je podáván pacientům injekčně a vychytává se ve skeletu. Má dobrý paliativní účinek a snižuje bolestivost kostních metastáz (Parker *et al.*, 2013).

1.8 Srdeční glykosidy

Srdeční glykosidy jsou látky tradičně používané jako léčiva v terapii srdečního selhání a srdečních arytmií. Jedná se o přírodní látky ze skupiny kardioglykosidů, jejichž hlavním zdrojem jsou rostliny rodu náprstníků (*Digitalis*). První zmínky o používání kardioglykosidů k léčebným účelům sahají až do starověkého Egypta, kdy byly využívány jako složka antidot proti některým jedům. Ačkoli se někteří badatelé zabývali studiem kardioglykosidů již dříve, do širšího povědomí se dostaly až díky Wiliamu Witheringovi, který ve své práci v r. 1785 publikoval zkušenosti nabyté při užívání těchto k léčbě pacientů (Withering, 1785). Na jeho práci navázali další autoři, ale skutečný rozmach v užívání kardioglykosidů nastal až ve 20. století a dnes se řadí mezi 200 nejužívanějších léků v USA (Fuentes *et al.*, 2018). Nejznámějším a také nejlépe prozkoumaným mechanismem jejich bioaktivního působení je inhibice sodno-draselné pumpy (NKA; Na⁺/K⁺-ATPase), která je spojena právě s již zmíněným využitím kardioglykosidů jako léčiv srdečních arytmií a srdečního selhání (Pierre *et Xie*, 2006; Laursen *et al.*, 2015). Mimo jiné se v dnešní době dostávají kardioglykosidy do popředí zájmu jako potenciální léčiva nádorových onemocnění (Haux 1999; Stenkvist 2001; Haux *et al.*, 2001; López-Lázaro *et al.*, 2003; López-Lázaro 2007; Sharma *et Purkait* 2012; Wu *et al.*, 2012).

Kardioglykosidy se nacházejí jako sekundární metabolity rostlin téměř ve všech jejich částech (Verma *et al.*, 2016). Hlavní úlohou těchto látek v rostlinách je ochrana proti škůdcům (Zalucki *et al.*, 2001). Mezi nejvýznamnější zástupce patří látky digitoxin, který je tvořen biosyntézou z cholesterolu (Obrázek 22) a digoxin, které se vyskytují v rostlinách z rodu náprstníku z čeledi jitrocelovité, zejména v náprstníku červeném (*Digitalis purpurea*) a náprstníku vlnatém (*Digitalis lanata*), ouabain, který se vyskytuje v krutíkvětu cenném (*Strophanthus gratus*) a oleandrin, který se nachází v oleandru obecném (*Nerium oleander L.*).

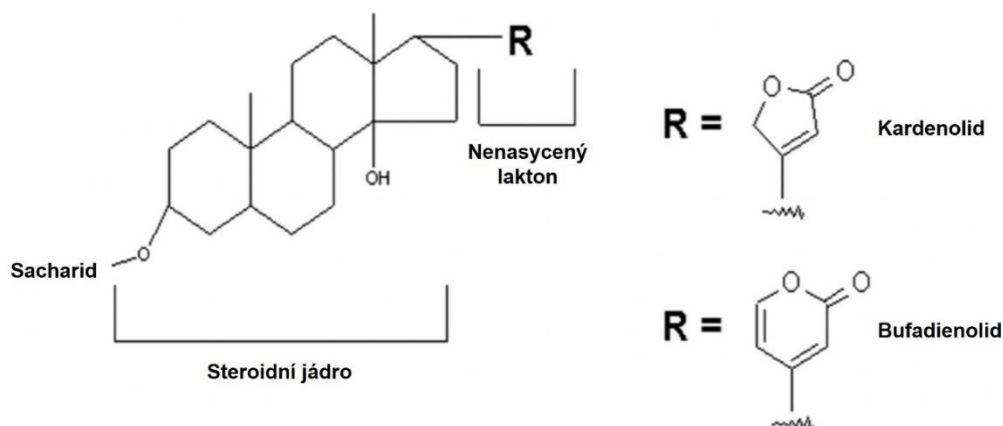
Kardioglykosidy jsou známé zejména jako rostlinné metabolity, ale vyskytují se i u živočichů. Příkladem takových látek jsou bufogenin a bufotoxin, které jsou izolovány z ropušího jedu a marinobufagin, který byl detekován v lidské plazmě (Mijatovic *et al.*, 2007). Některé kardioglykosidy mají své zástupce v rostlinné

i v živočišné říši. Tyto látky se souhrnně označují jako látky podobné látkám z náprstníku (digitalis-like factors). V této souvislosti byla v lidské plazmě objevena přítomnost „endogenního ouabainu“ (ouabain-like factor), který je strukturně totožný se svým rostlinným analogem (Hamlyn *et al.*, 1991). V lidské plazmě byla objevena přítomnost digoxinu podobných látek (digoxin-like factors), které svými biologickými vlastnostmi připomínají rostlinný digoxin. Bylo zjištěno, že tyto látky jsou vylučovány močí pacienty trpícími renální dysfunkcí a zvýšeným krevním tlakem (Gusdon *et al.*, 1984). Tyto látky mohou být označovány jako digoxinu podobné imunoreaktivní faktory (digoxin-like immuno reactive factors), interagují s protilátkami původně určenými proti digoxinu, a proto také interferují při klinickém stanovení digoxinu v plazmě (Dasgupta *et Trejo*, 1999).

1.8.1 Chemická struktura srdeční glykosidů

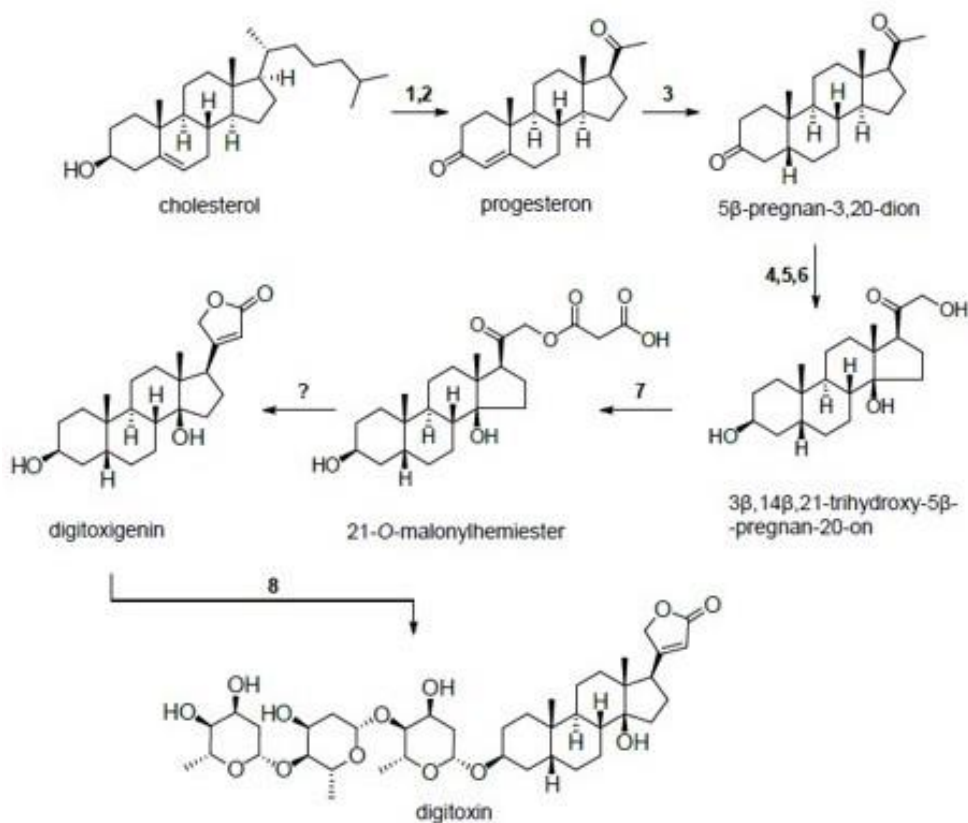
Z chemického hlediska se kardioglykosidy řadí mezi steroidní látky. Jejich molekula se skládá ze steroidního skeletu, který je substituován methylovými skupinami v polohách C-10 β , C-13 β , hydroxylovou skupinou v poloze C-14 β a nenasyceným laktonem v poloze C-17 β . Podle typu laktonu dělíme kardioglykosidy na kardenolidy a bufadienolidy (Obrázek 21). V kardenolidech se nachází pětiuhlíkatý furanonový cyklus, zatímco v bufadienolidech je šestiuhlíkatý pyranonový cyklus. V poloze C-3 je dále obvykle přítomen sacharid (nejčastěji d-glukosa, d-digitoxosa nebo l-rhamnosa). Stejně jako u ostatních glykosidů se steroidní skelet kardioglykosidů bez navázaného sacharidu nazývá aglykon. Biologická aktivita kardioglykosidů vychází stejně jako u jiných látek z jejich chemické struktury, která ovlivňuje sílu vazby s jejich nejvýznamnějším molekulárním cílem – NKA. Základní strukturou kardioglykosidů, která je nezbytná pro jejich biologický účinek, je 3 β ,5 β ,14 β -androstan-3,14-diol. Modifikace této základní struktury, především přítomnost laktonu v poloze C-17 β a sacharidů v poloze C-3, má významný vliv na biologickou aktivitu výsledného kardioglykosidu stejně jako na jeho farmakokinetické parametry, jako je např. rozpustnost ve vodě, biologický poločas a způsob vylučování. Nasycení a stejně tak otevření laktonového cyklu kardenolidů má za následek snížení jejich biologické aktivity (Magpusao *et al.*, 2015). Počet a typ sacharidových jednotek v pozici C-3 má vliv na biologickou aktivitu výsledného kardioglykosidu. Aglykon příslušného kardioglykosidu má obvykle nižší biologickou aktivitu než jeho glykosylované formy. S rostoucím stupněm glykosylace biologická aktivita glykosidu klesá a nejvyšší

se nachází u monoglykosylovaných kardioglykosidů (Mijatovic *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011).



Obrázek 21: Všeobecná struktura kardioglykosidů (převzato z Kumar *et al.*, 2013).

Prvním významným prekurzorem kardenolidu je cholesterol (Obrázek 22), který je konvertován na progesteron pomocí cholesterol monooxygenázy a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy. Progesteron je následně redukován pomocí progesteron-5 β -reduktázy na 5 β -pregnan-3,20-dion. Konverze 5 β -pregnan-3,20-dionu na 3 β ,14 β ,21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-on se účastní 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza a dva další hypotetické enzymy (pregnan-14 β -hydroxyláza a 14 β -hydroxypregnan-21 β -hydroxyláza), jejichž existence dosud nebyla plně prokázána. Poslední část syntézy aglykonu zahrnuje reakci 3 β ,14 β ,21-trihydroxy-5 β -pregnan-20-onu s malonyl-CoA za vzniku hemiesteru katalyzovanou malonyl-koenzym A:21-hydroxypregnan-21-O-malonyl transferázou následovanou kondenzační reakcí za vzniku laktonového cyklu pomocí zatím neznámého enzymu (Pádua *et al.*, 2016). Aglykon je poté glykosylován pomocí glukosyltransferázy na příslušný kardioglykosid (Lichtstein *et al.*, 1998; Bejček *et al.*, 2021).



Obrázek 22: Schéma biosyntézy digitoxinu z cholesterolu. Enzymy: 1 – cholesterol monooxygenáza (EC 1.14.15.6), 2 – 3β-hydroxysteroid dehydrogenáza (EC 1.1.1.145), 3 – progesteron-5β-reduktáza (EC 1.3.1.3), 4 – 3β-hydroxysteroid dehydrogenáza (EC 1.1.1.145), 5 – pregnan-14β-hydroxyláza (hypotetický), 6 – 14β-hydroxypregnan-21β-hydroxyláza (hypotetický), 7 – malonyl-koenzym A:21-hydroxypregnan-21-O-malonyltransferáza (EC 2.3.1.-), 8 – glukosyl transferáza (EC 2.4.1.-) (převzato z Bejček *et al.*, 2021).

1.8.2 Biologická aktivita kardioglykosidů

Biologická aktivita srdeční glykosidů zahrnuje vazbu na různé buněčné proteiny. Nejvýznamnější je schopnost kardioglykosidů inhibovat NKA, která je podstatou využití těchto látek jako léčiv srdečního selhání a srdečních arytmií. NKA se podílí na udržování fyziologické koncentrace Na^+ a K^+ iontů a při její inhibici dochází k narušení iontové rovnováhy a nárůstu intracelulární koncentrace Na^+ . Na tento stav následně reaguje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ přenašeč změnou směru transportu, což způsobí nárůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} s následným stahem srdeční tkáně. Tento jev se označuje jako tzv. pozitivně ionotropní účinek (Pierre *et Xie*, 2006). Zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} sice zesiluje svalovou kontrakci, nicméně v dlouhodobém horizontu může vyvolat

apoptózu buněk. Hranice mezi těmito ději je tenká, a právě proto mají srdeční glykosidy poměrně úzké terapeutické okno (Liu *et al.*, 2010). V současnosti se v klinické praxi používá výhradně digoxin. Další dva nejznámější kardioglykosidy, digitoxin a ouabain, mají méně výhodné farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. Jsou ale využívány v experimentální farmakologii pro porovnání účinků strukturně podobných látek. Kromě transportu Na⁺ a K⁺ iontů přes cytoplasmatickou membránu plní NKA také funkci receptoru – podílí se na regulaci proliferace buněk. V takovém případě se NKA vyskytuje v komplexu s proteinkinázou Src. Po navázání kardioglykosidu se Src kináza aktivuje a spouští signální dráhu mitogenem aktivované proteinkinázy (Ras/MAPK) s následnou aktivací řady transkripčních faktorů (Haas *et al.*, 2000). Src představuje nereceptorovou proteinovou tyrozinkinázu, která se uplatňuje v celé řadě buněčných procesů, podporuje proliferaci prekancerózních buněk, reguluje buněčnou adhezi a invazi buněk v pokročilejších stádiích nádorové progresse.

Biologická aktivita srdečních glykosidů není výhradně spojena jen s vazbou na NKA. Bylo popsáno, že kardioglykosidy mohou ovlivnit signální dráhu faktoru nádorové nekrózy α /nukleárního faktoru kappa B (TNF- α /NF- κ B), která reguluje imunitní odpověď organismu na patologický podnět a v případě jejího zablokování může dojít ke snížení zánětlivé reakce (Prassas *et Diamandis*, 2008). López-Lázaro *et al.* (2005) ve své práci popsali inhibiční účinek kardioglykosidů na aktivitu topoisomerázy I a II (López-Lázaro *et al.*, 2005), které při replikaci a transkripci za normálních okolností snižují napětí v rozvolňujícím se vlákne DNA. Bylo popsáno, že tyto látky se mohou podílet na inhibici exprese genů viru HIV. Tento jev pravděpodobně souvisí s úlohou NKA jako receptoru, u některých kardioglykosidů byla pozorována inhibice tvorby virových proteinů již při nanomolárních koncentracích (Kurapati *et al.*, 2016). Antivirová aktivita srdečních glykosidů byla popsána také pro lidský cytomegalovirus, a to pravděpodobně cestou snížení exprese genu pro draselný kanál (*hERG*) (Kapoor *et al.*, 2012).

1.8.3 Protinádorová aktivita srdečních glykosidů

V důsledku vysoké koncentrace intracelulárního Ca²⁺ jsou srdeční glykosidy schopné inhibovat proliferaci buněk a spustit buněčnou smrt nádorových buněk aktivací apoptotických či autofagických signálních drah, produkcí volných kyslíkových radikálů nebo zástavou buněčného cyklu (Winnicka *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2017). Pokud je koncentrace kardioglykosidů nízká, nemusí docházet k inhibici NKA, ale mohou být

aktivovány signalizační kaskády, u nádorových buněk pak mohou vést k potlačení buněčné proliferace. Některé srdeční glykosidy byly zařazeny do klinických studií pro léčbu některých typů nádorů (Ishida *et al.*, 2016; Stenkvist, 1999). Účinky srdečních glykosidů byly zjištěny *in vitro* u ouabainu na nádorové buňky prsu (Kometiani *et al.*, 2005), u oleandrinu na buňky maligního melanomu (Bao *et al.*, 2016), u bufalinu a cinobufaginu bylo zjištěno, že mají schopnost indukovat apoptotickou buněčnou smrt u celé řady nádorových buněk, např. u nádorových buněk plic (Zhu *et al.*, 2012), prsu (Dong *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015), prostaty (Yu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2018) a hepatocelulárních buněk (Qi *et al.*, 2011), u digitoxinu byly zjištěny antiproliferační účinky na nádorové buňky prostaty (Dimas *et al.*, 2014; Haux *et al.*, 1999; Pollard *et al.*, 2019; Winnicka *et al.*, 2006).

Mechanismy, které jsou základem protinádorové aktivity oleandrinu, zahrnují zástavu buněčného cyklu (Ko *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2015), modulaci buněčných signálních drah (NF- κ B, JNK) (Manna *et al.*, 2000; Slingerland *et al.*, 2013; Sreenivasan *et al.*, 2003), oxidativní a mitochondriální stres (McConkey *et al.*, 2000), sníženou expresi Rad51 (Bao *et al.*, 2016) a zastavení aktivace fibroblastového růstového faktoru-2 (Smith *et al.*, 2001).

Některé formy kardioglykosidů mohou inhibovat proliferaci a indukci apoptózy nádorových buněk prostaty v koncentracích použitelných v klinické praxi (Winnicka *et al.*, 2006; Platz *et al.*, 2011). Varbanov *et al.* (2017) zjistili, že u pacientů, kteří užívali digoxin pravidelně přes 10 let, byl zaznamenán nižší výskyt karcinomu prostaty.

Úzký terapeutický index již klinicky používaných kardioglykosidů omezuje jejich terapeutické požití zejména v důsledku kardiiovaskulární toxicity. Proto jsou hledány nové deriváty odvozené od těchto steroidních sloučenin, které by byly schopné inhibovat proliferaci a metastáze nádorových buněk bez kardiiovaskulárního poškození.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2. Močové markery

2.1 Materiál a metody

2.1.1 Výběr pacientů

Pro studium močových markerů bylo pro tuto práci vybráno 299 pacientů, jejichž klinické a patologické charakteristiky jsou popsány v Tabulce 6. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v červnu 2014 (ref. č. 127/14). Od všech účastníků byl získán slovní informovaný souhlas s měřením močových markerů jako součást jejich běžného urologického vyšetření pro anonymní analýzu dat v této studii. Písemný informovaný souhlas nebyl nutný, protože rutinní klinický postup nebyl nijak ovlivněn neinvazivním měřením močových markerů. Pacienti s BPH byli rozděleni do dvou podskupin, první skupinu tvořili pacienti se zánětem a druhou bez rozsáhlého zánětu podle histopatologického vyšetření patologem.

Tabulka 6: Charakteristiky pacientů.

Charakteristika	Celá skupina (N=299)		Podskupina (N=146)	
	BPH	CaP	BPH	CaP
Počet pacientů	178	121	78	68
Věk (roky)				
<55	17	18	7	7
55-65	80	46	31	26
>65	81	57	40	35
Sérové PSA (ng/ml)				
<2,5	-	10	-	6
2,5-10	147	111	63	62
>10	31	-	15	-
% volného PSA				
0-10	18	12	11	9
11-20	49	16	20	12
21-100	48	8	24	5
Zánět				
ano	62	-	34	-
ne	83	-	43	-
n.a.	33	-	1	-
Gleason skóre				
<7	-	39	-	18
7	-	70	-	41
>7	-	12	-	9
Stádium rakoviny				
T1-pT2b	-	38	-	18
pT2c	-	64	-	39
pT3a-b	-	19	-	11
Riziko rakoviny				
nízké	-	26	-	10
střední	-	70	-	42
vysoké	-	25	-	16

2.1.2 Izolace RNA z moči

Po masáži prostaty během digitálního rektálního vyšetření byla pacientům odebrána moč (30 ml) a zpracována do 1 hodiny od odběru. Vzorky moči byly centrifugovány při 2800 RPM (5 min při 4 °C) a buněčný sediment byl použit pro celkovou izolaci RNA pomocí SurePrep™ Urine Exfoliated Cell RNA Purification Kit (Fisher Scientific). Před započítím práce bylo nutné zahřát všechny používané roztoky na laboratorní teplotu. Ke stabilizovanému buněčnému sedimentu bylo přidáno 200 µl lyzačního roztoku s β-merkaptetanolem (Sigma-Aldrich) a vortexováno 15 s. Lyzát byl přenesen do zkumavky, kde k němu byl přidán 95% etanol v množství, které odpovídá 50 % celkového objemu buněčného sedimentu s pufrem a vortexováno 10 s. Lyzát s etanolem byl přenesen do čisté kolonky se sběrnou zkumavkou a centrifugován (12 000 RPM) při laboratorní teplotě 1 min. Ze sběrné zkumavky byl poté odstraněn supernatant slitím. Dále bylo přidáno 500 µl WASH roztoku do kolonky a centrifugováno (12 000 RPM) 1 min při laboratorní teplotě. Ze sběrné zkumavky byl odstraněn supernatant slitím. Poté bylo opět přidáno 500 µl WASH roztoku do kolonky a vše stočeno (12 000 RPM) 2 min. Sběrné zkumavky se supernatantem byly odstraněny a kolonky umístěny do čisté zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 25 µl RNA elučního pufru. Poté bylo provedeno stočení (1 600 RPM) 2 min a následně 1 min (12 000 RPM) při laboratorní teplotě. Koncentrace RNA byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop (Thermo Scientific). Vzorky RNA byly skladovány při -80 °C.

2.1.3 Reverzní transkripce

Celková RNA (100 ng) byla ošetřena DNasou I (Invitrogen) a poté byla provedena reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III (Invitrogen). Reakční směs byla připravena (Dnase I, Amp Grade, 1 U/µl, 10x DNase I Reaction Buffer, Invitrogen, RNase-free water, 100 ng RNA) a přidána ke vzorkům za následné inkubace 15 min při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby bylo ke vzorkům přidáno 25 mM EDTA. Následně byly vzorky zahřívány pomocí thermocykleru Mastercycler gradient (Eppendorf) na 65 °C po dobu 10 min. Dále byla připravena směs 10 µM nespécifických (random) primerů s 10 mM nukleotidy dNTP (Invitrogen), která byla přidána ke vzorkům a vše bylo po dobu 5 min zahříváno v thermocykleru při teplotě 65 °C. Následovalo ochlazení na ledu po dobu minimálně 1 min. Nakonec byla namíchána směs (5x first strand buffer; 0,1 M DTT; SuperScript III Reverse transcriptase, Invitrogen; 40 U/µl Protector RNase Inhibitor, Roche), která byla přidána ke vzorkům

a v thermocykleru spuštěna reverzní transkripce (inkubace 5 min při 25 °C, RT-PCR 60 min při 50 °C, inaktivace 15 min při 70 °C). Vzorky cDNA byly skladovány při -20 °C.

2.1.4 Kvantitativní real-time PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR) byla provedena pomocí LightCycler 480 Probes Master Mix (Roche) a vhodných primerů (Tabulka 7). Nejprve byl připraven premix (2x LightCycler 480 Probes Master Mix, RNase-free water, 10 µM próby, Universal probe library, 10 µM primery, Genери-Biotech) a napipetován do 96-ti jamkového panelu, kde byl objem premixu v každé jamce 18 µl. Následně byl přidán 1 µl cDNA do každé jamky, poté byl panel centrifugován 2 min při 1 200 RPM. Nakonec byla provedena qPCR při 50 cyklech denaturace, annealingu a prodlužování (95-60-72 °C každý po dobu 20 s) na přístroji LightCycler 480 (Roche).

Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech. Vzorky s hodnotami $KLK3$ $Ct > 35$ (prahová hodnota cyklu, cycle threshold) byly vyloučeny a chybějící hodnoty pro dva nebo více močových markerů byly vyřazeny kvůli nízkému množství cDNA. Relativní kvantifikace byla provedena podle delta Ct (dCt) metody využívající referenční gen ($dCt = Ct_{target} - Ct_{KLK3}$) a inverzní hodnoty ($-dCt$) byly použity pro následnou statistickou analýzu a vizualizaci.

Tabulka 7: Primery a próby použité ve studii.

Gen	ID genu	Primery a próby	Pozice/kat.č.	Produkt
AMACR	NM_001167595.1	FW-5'-TCAACTATTTGGCTTTGTCAGG-3' RV-5'-GTGAGAATCCGTATGCCCC-3' probe UPL #29	exon 2/3 exon 3	67 bp
CD45/PTPRC	NM_001267798.1	TaqMan Gene Expression Assay próba FAM-MGB	Hs04189704_m1	57 bp
EpCAM	NM_002354.2	FW-5'-AGTTGGTGCACAAAATACTGTCAT-3' RV-5'-TCCCAAGTTTTGAGCCATTC-3' próba UPL #8	exon 2 exon 3	89 bp
EZH2	NM_004456.3	FW-5'-GATGATGGAGACGATCCTGAA-3' RV-5'-GGGCGGCTTTCTTTATCAT-3' próba UPL #65	exon 5 exon 5/6	80 bp
Ki67/MKI67	NM_002417.4	FW-5'-TCAAGGAACTGATTCAGGAGAAG-3' RV-5'-GTGACTGAAGAACACATTTCC-3' próba UPL #32	exon 13 exon 13	77 bp
KLK3	NM_001648.2	FW-5'-GTCTGCGGCGGTGTTCTG-3' RV-5'-GCCGACCCAGCAAGATC-3' 5'-FAM-CACAGCTGCCACTGCATCAGGA-BHQ1-3'	exon 2 exon 3 exon 2	88 bp
MSMB	NM_002443.2	FW-5'-AAATTTTCATGTTGCACCCTTG-3' RV-5'-CCATTCCTGACAGAACAGGTC-3' próba UPL #22	exon 3/4 exon 4	140 bp
PA2G4	NM_006191.2	TaqMan Gene Expression Assay próba FAM-MGB	Hs00854538_g1	113 bp
PCA3	NR_015342.1	FW-5'-GCACATTTCCAGCCCCTTTAAA-3' RV-5'-GGGCGAGGCTCATCGAT-3' 5'-FAM-AGAAATGCCCGGCCCATC-BHQ1-3'	exon 3 exon 4 exon 4	113 bp
PSGR/OR51E2	NM_030774.3	TaqMan Gene Expression Assay próba FAM-MGB	Hs00258239_s1	74 bp
RHOA	NM_001313941.1	TaqMan Gene Expression Assay próba FAM-MGB	Hs00357608_m1	62 bp
TBP	NM_003194.5	FW:5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3' RV:5'-TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC-3' 5'-Cy5-TCTTCACTCTTGGCTCCTGTGCACA-BHQ2-3'	exon 5 exon 6 exon5/6	89 bp
TRPM8	NM_024080.4	FW-5'-TCAGAATAAGAAGGAAGTCTCCAAA-3' RV-5'-CAGCAGCATTGATGTCGTTC-3' próba UPL #32	exon 13 exon 14	125 bp

2.1.5 Ředění LNCaP a leukocytů

Nádorová buněčná linie karcinomu prostaty (LNCaP) byla kultivována (37 °C, 5 % CO₂) a sklizena za standardních podmínek pro buněčné kultury (kapitola 4.1.2) a buňky byly spočítány v hemocytometru. Leukocyty byly získány od zdravého dobrovolníka z 5 ml krve stabilizované v EDTA. Po centrifugaci při 5200 RPM byl odpipetován prstenec obsahující leukocyty na rozhraní erytrocytů a plazmy (buffy coat) a lýza reziduálních erytrocytů byla provedena pomocí PBS a ddH₂O (double-distilled water) a stočení po dobu 5 min při 1900 RPM. Leukocyty byly spočítány na hemocytometru. Ředění nádorových buněk LNCaP a leukocytů bylo provedeno podle Obrázku 26B, C a vše bylo dále zpracováno stejným způsobem jako vzorky moči.

2.1.6 Statistická analýza

Data byla analyzována s ohledem na klinicko-patologické parametry (procento volného PSA, zánět v benigní tkáni, Gleason skóre a stádium nádoru) pomocí programu Statistica 12 (TIBCO Software Inc., Mann – Whitneyův test, Spearmanův korelační koeficient a Pearsonův chí-kvadrát test). Grafy byly generovány v GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Byly provedeny jednorozměrné a vícerozměrné logistické regresní analýzy v softwaru R, ver. 3.5.0 (www.r-project.org). Nejlepší vícerozměrný model byl vždy vybrán ze skupiny modelů generovaných v procesu výběru nejlepší podmnožiny (pomocí `bess` funkce z `BeSS` R package, ver. 1.0.5) jako model s nejmenší chybovostí při testování odhadované LOOCV. ROC křivky (Receiver Operating Characteristic) byly vygenerovány pomocí funkce `ROC` z balíčku `Epi`, ver. 2,30, zatímco AUC (Area Under Curve) společně s 95% intervaly spolehlivosti byly vypočteny pomocí funkcí z balíčku `pROC`, ver. 1.12.1. Hodnoty *p*, které se vztahují k nulové hypotéze (AUC je 0,5), byly vypočteny pomocí testovací funkce `Wilcox` použitím `roc.area` funkce z verifikačního balíčku, ver. 1.42.

2.2 Výsledky

2.2.1 Preamplifikace u močových markerů

Během mezilaboratorních srovnání se někdy vyskytly problémy s reprodukcí výsledků, které byly získány primárním protokolem (Jamaspishvili *et al.*, 2011). Důležité je, že odchylky v hodnotách Ct mohou ovlivnit rizikové stratifikace hlášené urologům. Z tohoto důvodu byl přehodnocen celý proces reverzní transkripce, preamplifikace a PCR. Již dříve byl testován test uniformity (Jamaspishvili *et al.*, 2011) a jednoduchá

preamplifikace poskytla lepší výsledky než preamplifikace celého transkriptomu, která byla použita v mnoha jiných studiích (Laxman *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2013; Leyten *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017). Preamplifikace způsobila zkreslení Ct hodnot při měření močových markerů, jak je zřejmé z variačních koeficientů pro konkrétní postupy (tj. RT-PCR; RT-preamplifikace-PCR; pouze PCR a pouze preamplifikace-PCR, Tabulka 8). Analyzováno bylo také 23 vzorků s preamplifikací a bez ní. Překvapivě nedošlo k žádnému velkému zlepšení v počtu hodnotitelných vzorků navzdory preamplifikaci. Všechny vzorky byly měřeny na AMACR, MSMB a KLK3. PCA3 nebyl detekován ve dvou vzorcích ani jednou z metod. Menší rozdíl byl pozorován pro TRPM8, který nebyl detekován ve dvou vzorcích s preamplifikací a pěti vzorcích bez ní. Vzhledem k výše popsaným pozorováním byl v dalších experimentech vynechán preamplifikační krok, aby došlo ke snížení potenciálního zkreslení vneseného do hodnocení klinických vzorků.

Tabulka 8: *Variační koeficienty založené na opakovaném hodnocení stejných vzorků.*

Postup	KLK3	N	PCA3	N	AMACR	N	TRPM8	N	MSMB	N
RT-PCR	1,99	15	2,72	14	1,35	15	1,80	13	2,94	15
RT-preamp-PCR	6,74	26	4,91	16	3,19	15	6,19	6	8,01	15
PCR	1,22	71	0,81	71	0,86	71	1,09	71	1,31	71
preamp-PCR	4,07	18	3,50	13	2,33	13	2,79	9	4,10	13

2.2.2 Korelace močových markerů s transkripty rakoviny prostaty

Klinické a patologické údaje o pacientech jsou uvedeny v Tabulce 6. Expresní analýza 13 močových transkriptů umožnila jedinečnou analýzu pomocí neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu (Tabulka 9). Podle očekávání Ct hodnoty KLK3 silně korelovaly s Ct hodnotami jiných genů, u kterých je známo, že hrají roli u rakoviny prostaty (tj. PCA3, AMACR, TRPM8, MSMB a PSGR). Slabší korelace byla pozorována u EpCAM, což naznačuje přítomnost jiných epiteliálních buněk pocházejících z močových cest. Expresí CD45 silně korelovala s EZH2 a zejména s housekeeping geny TBP a RHOA, což naznačuje přítomnost leukocytů v moči.

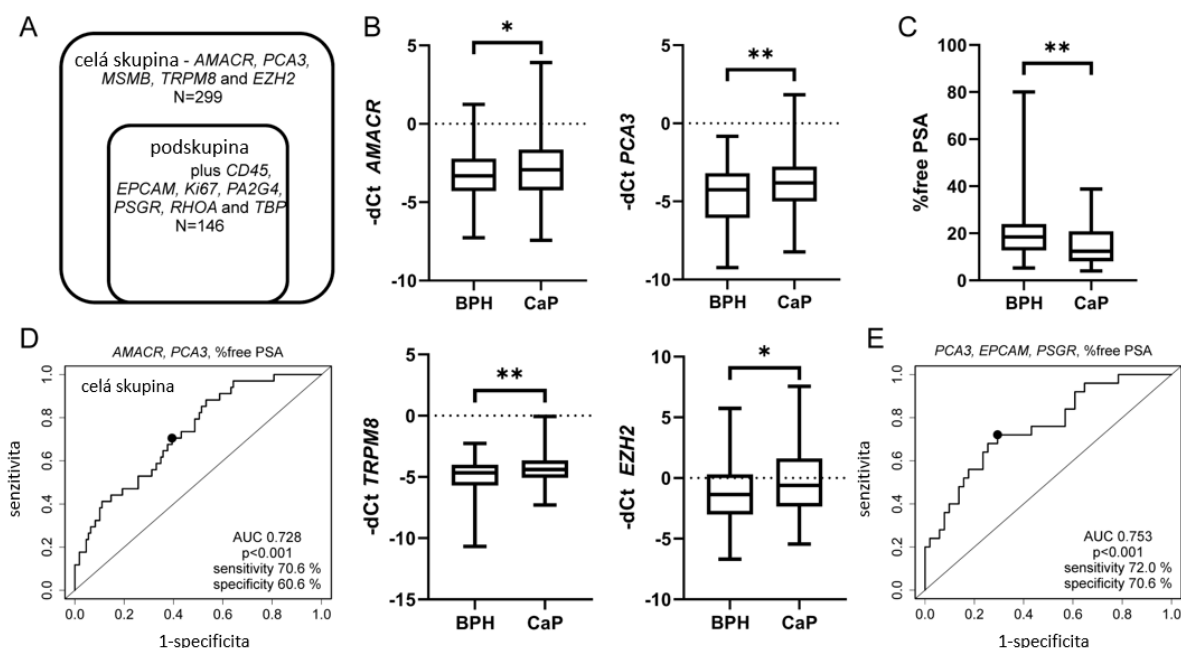
Tabulka 9: Spearmanova korelace mezi Ct hodnotami s důrazem na KLK3 a CD45. Silné korelace ($R_s > 0,6$) jsou zvýrazněny tučně, nevýznamné výsledky ($p > 0,001$) jsou kurzívou.

	KLK3	AMACR	PCA3	TRPM8	MSMB	EZH2	CD45	EpCAM	Ki67	RHOA	PA2G4	PSGR	TBP
KLK3	1,000	0,720	0,791	0,863	0,895	0,292	-0,092	0,489	<i>0,154</i>	<i>0,192</i>	0,433	0,826	<i>0,169</i>
AMACR		1,000	0,685	0,663	0,680	0,562	<i>0,186</i>	0,507	0,350	0,463	0,665	0,647	0,431
PCA3			1,000	0,770	0,682	0,274	-0,027	0,426	<i>0,191</i>	<i>0,240</i>	0,411	0,747	<i>0,225</i>
TRPM8				1,000	0,827	0,317	<i>0,007</i>	0,582	<i>0,256</i>	0,324	0,506	0,746	0,318
MSMB					1,000	0,403	<i>0,050</i>	0,462	<i>0,184</i>	<i>0,266</i>	0,474	0,711	<i>0,215</i>
EZH2						1,000	0,775	0,259	0,530	0,738	0,669	<i>0,039</i>	0,685
CD45							1,000	0,157	0,491	0,809	0,588	-0,126	0,718
EpCAM								1,000	0,500	0,425	0,496	0,368	0,457
Ki67									1,000	0,586	0,624	<i>0,075</i>	0,626
RHOA										1,000	0,819	<i>0,105</i>	0,926
PA2G4											1,000	0,384	0,827
PSGR												1,000	<i>0,126</i>
TBP													1,000

Protože zvýšené hladiny mRNA KLK3 byly popsány u karcinomu prostaty (Sequeiros *et al.*, 2015), testovali jsme také jiné housekeeping geny. Nicméně žádný z těchto genů použitých pro alternativní normalizaci (TBP, RHOA, PA2G4, EpCAM) nebyl lepší než KLK3. Ve skutečnosti zde byl pouze trend snížení KLK3 v CaP ve srovnání s BPH při normalizaci na EpCAM ($p=0,083$) a trend ke zvýšení PCA3 v CaP při normalizaci na PA2G4 ($p=0,095$) (Obrázek 23A). Proto byla standardní normalizace na Ct hodnoty KLK3 použita pro všechny níže uvedené močové markery.

2.2.3 Močové markery a rozlišení karcinomu prostaty od benigní hyperplazie

Hlavním cílem této studie byla validace našich předchozích výsledků (AMACR, PCA3, MSMB, TRPM8, EZH2 s normalizací na KLK3) v rozšířené skupině pacientů s celkovými hladinami PSA 2,5–10 ng/ml (Tabulka 6). U podskupiny pacientů ($N=146$) byla rovněž hodnocena přítomnost dalších transkriptů (CD45, EpCAM, Ki67, PA2G4, PSGR, RHOA, TBP, Obrázek 23A). Do studie byli také zahrnuti pacienti s BPH a hladinami PSA nad 10 ng/ml ($N=31$) a pacienti s CaP a PSA hladinami pod 2,5 ng/ml ($N=10$, Tabulka 6). Signifikantně rozdílné exprese mezi BPH a CaP byly pozorovány pro AMACR ($p=0,045$), PCA3 ($p=0,004$), TRPM8 ($p=0,005$) a EZH2 ($p=0,019$, Obrázek 23B). Jak se dalo očekávat, procento volného PSA se také signifikantně lišilo u případů BPH a CaP (hodnota $p=0,003$, Obrázek 23C). Důležité je, že procento samotného volného PSA mělo AUC 0,66 (Tabulka 10). Multivariační logistická analýza všech parametrů určila nejlepší kombinovaný model (% volného PSA plus PCA3 a AMACR) se zlepšenou AUC 0,728 (Tabulka 10, Obrázek 23D).



Obrázek 23: Rozdílná exprese močových markerů mezi CaP a BPH. (A) Popis celé skupiny a podskupiny pacientů analyzovaných na vybrané transkripty. (B) Expres AMACR, PCA3, TRPM8 a EZH2 je signifikantně rozdílná u pacientů s CaP a BPH (hodnoty p 0,045; 0,004; 0,005; respektive 0,019). (C) Procento volného PSA v kombinaci s močovými markery přispívá k rozlišení BPH od CaP. Procento volného PSA signifikantně odlišuje CaP od BPH (hodnota p 0,003). Krabicové grafy představují medián, 25–75% percentil a rozsah hodnot. Hodnoty $p < 0,05$ a $< 0,01$ jsou označeny *, respektive **. (D) ROC křivka % volného PSA v kombinaci s močovými markery AMACR a PCA3 nebo (E) s EpCAM, PCA3 a PSGR v podskupině pacientů.

2.2.4 Kombinovaný model a procento volného PSA u podskupiny pacientů

Předmětem zkoumání bylo také to, zda přidané markery (EpCAM, PSGR, Ki67, PA2G4) mohou zlepšit stratifikaci BPH a CaP v podskupině pacientů (N=146, Obrázek 23A). Dalšími cíli bylo hodnocení normalizace genové exprese (KLK3, RHOA a TBP) a analyzování přítomnosti leukocytů v moči (CD45). Ačkoli žádný z přidaných transkriptů neodlišoval BPH od karcinomu, analýza s více proměnnými odhalila alternativní kombinaci EpCAM, PSGR, PCA3 a % volného PSA s AUC 0,753 (Tabulka 10, Obrázek 23E). Nicméně tento slibný model bude nutné ověřit na větší skupině pacientů.

Tabulka 10: Univariační a multivariační analýza.

Univariační analýza				ROC analýza	
marker	β	OR (95% CI)	<i>p</i> -hodnota	AUC (95% CI)	<i>p</i> -hodnota
AMACR	0,168	1,183 (1,031-1,357)	0,017	0,569 (0,502-0,635)	0,023
PCA3	0,233	1,263 (1,09-1,463)	0,002	0,602 (0,533-0,667)	0,002
TRPM8	0,341	1,406 (1,143-1,73)	0,001	0,599 (0,532-0,664)	0,003
MSMB	0,07	1,072 (0,883-1,303)	0,482	0,526 (0,458-0,594)	0,223
EZH2	0,127	1,136 (1,037-1,244)	0,006	0,587 (0,519-0,653)	0,007
EpCAM	0,141	1,152 (0,991-1,338)	0,065	0,585 (0,488-0,674)	0,042
PSGR	0,127	1,135 (0,888-1,451)	0,311	0,532 (0,44-0,633)	0,255
%free PSA	-0,075	0,928 (0,879-0,98)	0,007	0,666 (0,559-0,763)	0,001

Multivariační analýza				ROC analýza	
celá skupina	β	OR (95% CI)	<i>p</i> -hodnota	AUC (95% CI)	<i>p</i> -hodnota
věk	0,043	1,044 (0,97-1,123)	0,256	0,728 (0,633-0,816)	<0,001
AMACR	0,244	1,277 (0,943-1,729)	0,114		
PCA3	0,283	1,327 (1,01-1,742)	0,042		
%free PSA	-0,082	0,921 (0,871-0,975)	0,004		

podskupina	β	OR (95% CI)	<i>p</i> -hodnota	AUC (95% CI)	<i>p</i> -hodnota
PCA3	0,439	1,551 (1,092-2,205)	0,014	0,753 (0,642-0,862)	<0,001
EpCAM	0,207	1,23 (0,935-1,619)	0,139		
PSGR	-0,151	0,86 (0,578-1,278)	0,454		
%free PSA	-0,064	0,938 (0,877-1,004)	0,064		

Model založený na PCA3, AMACR a procentu volného PSA významně odlišoval karcinom prostaty od benigní hyperplazie ($p < 0,001$, Tabulka 11). Důležité je, že identifikoval 65 % potenciálně agresivních karcinomů prostaty, zatímco pouze 10 % mužů s BPH bylo špatně klasifikováno. Na druhou stranu 51 % mužů s BPH se může podle tohoto modelu vyhnout biopsii, přičemž pouze 6 % potenciálně agresivních CaP by bylo vynecháno. Přítomnost zánětu neovlivnila stratifikaci BPH a CaP podle tohoto modelu ($p = 0,33$, Tabulka 11). Tyto výsledky však musí být ověřeny na větší kohortě, protože % volného PSA bylo k dispozici pouze u poloviny pacientů v této studii (Tabulka 12).

Tabulka 11: Stratifikace BPH a CaP založená na modelu s PCA3, AMACR a % volného PSA.

Stratifikace ¹	BPH ²	CaP ²	vysoce-inter ³	nízce-inter ³	BPH-ano ⁴	BPH-ne ⁴
model-slabé	11 (10 %)	13 (38 %)	11 (65 %)	2 (12 %)	7	4
model-indif	42 (39 %)	14 (41 %)	5 (29 %)	9 (53 %)	15	24
model-silné	56 (51 %)	7 (21 %)	1 (6 %)	6 (35 %)	21	28
celkem (100 %)	109	34	17	17	43	56

¹ Hraniční hodnoty (cut-off) byly vybrány podle nejlepšího rozdělení rizikových skupin BPH a CaP a stanoveny na 37 % (mezi slabými a indiferentními skupinami) a 18 % (mezi indiferentními a silnými skupinami) pravděpodobnosti diagnózy rakoviny.

² Model významně rozlišoval CaP a BPH ($p=0,0001$, Pearsonův chí-kvadrát test).

³ Nádory se středním rizikem (intermediate, $N=24$) byly rozděleny do vysoce rizikové skupiny (pT2c a Gleason skóre 7) nebo níže rizikové skupiny (buď pT2c nebo pouze Gleason skóre 7).

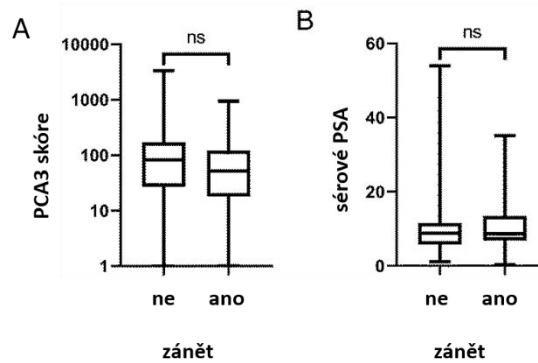
⁴ Zánět (ano/ne) neovlivnil stratifikaci BPH podle modelu ($p=0,33$, Pearsonův chí-kvadrát test).

Tabulka 12: Charakteristiky pacientů s měřením % volného PSA, PCA3 a AMACR.

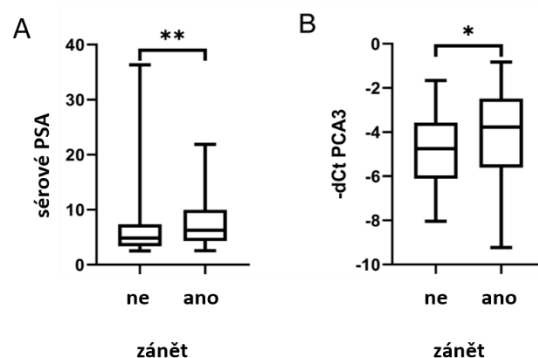
Charakteristika	BPH	CaP
Počet pacientů	109	34
Věk (roky)		
<55	7	3
55-65	49	14
>65	53	17
Sérové PSA (ng/ml)		
<2,5	-	3
2,5-10	105	31
>10	4	-
% volného PSA		
0-10	18	12
11-20	44	16
21-100	47	8
Zánět		
ano	43	-
ne	56	-
n.a.	10	-
Gleason skóre		
<7	-	12
7	-	18
>7	-	4
Stádium rakoviny		
T1-pT2b	-	12
pT2c	-	20
pT3a-b	-	2
Riziko rakoviny		
nízké	-	6
střední	-	24
vysoké	-	4

2.2.5 Zánět prostaty

Jedna z prvních studií na PCA3 od Hessels *et al.* (2003) poskytla údaje o zánětu u 84 pacientů bez malignity. Nebyla zde žádná souvislost zánětu s PCA3 a překvapivě ani s PSA v séru (Obrázek 24). V předchozí studii na našem pracovišti (Kucerova *et al.*, 2015) byl histopatologicky hodnocen zánět v jehlových biopsiích u pacientů s BPH. Na základě předběžné analýzy bylo zjištěno, že zánět prostaty může ovlivnit močový PCA3 (Kral *et al.*, 2015). Toto pozorování bylo potvrzeno také v této studii, kde jak PCA3 ($p=0,041$), tak sérové PSA ($p=0,005$) byly signifikantně zvýšeny u pacientů se zánětem (Obrázek 25). Důležité je, že mírný nárůst PCA3 významně nezměnil stratifikaci případů BPH se zánětem a bez něj do rizikových skupin na základě kombinovaného hodnocení PCA3, AMACR a procenta volného PSA ($p=0,89$).



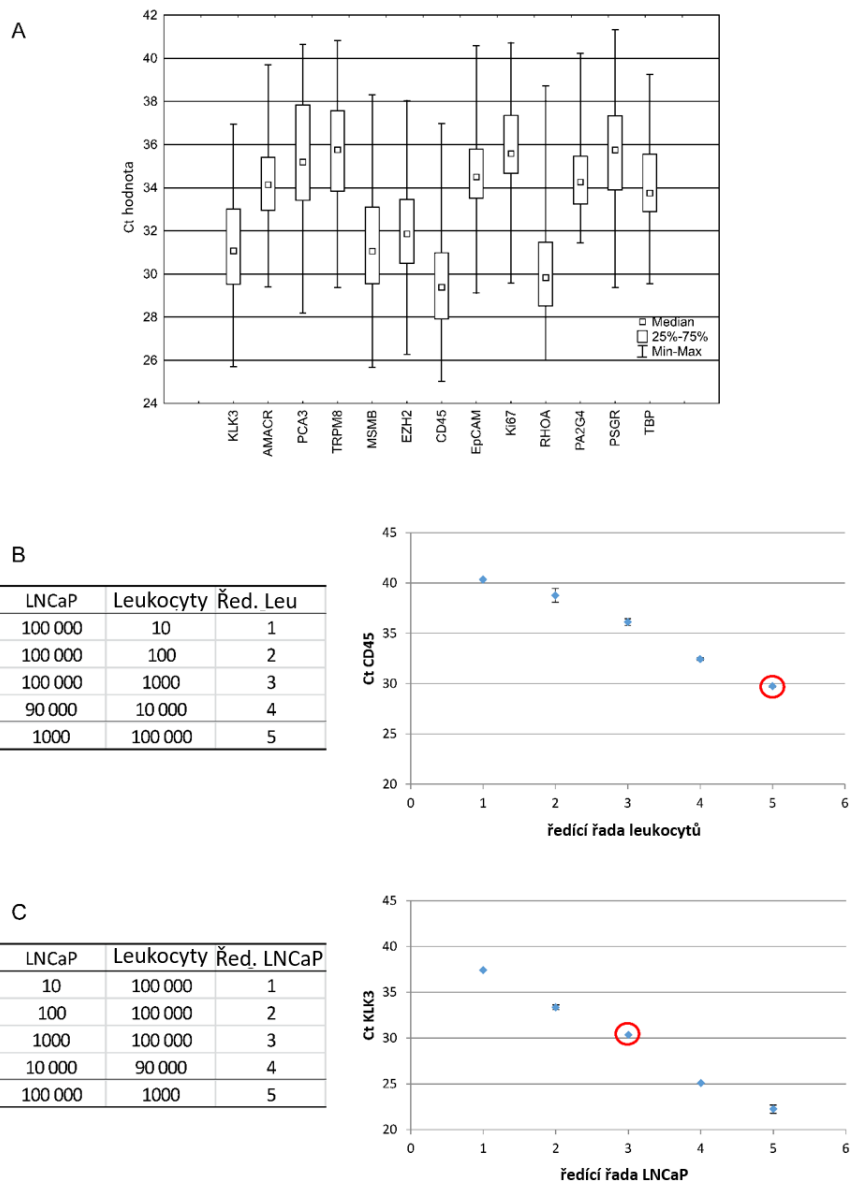
Obrázek 24: PCA3 skóre (A), ale ani sérové PSA (B) nebyly ovlivněny zánětem ve studii Hessels *et al.*, 2003 ($p=0,226$ a $p=0,655$).



Obrázek 25: Zánět v tkáni BPH ovlivňuje sérové PSA a močové PCA3. Sérové hladiny PSA (A) a v menší míře také močové PCA3 (B) byly signifikantně vyšší u pacientů se zánětlivou tkání BPH (hodnoty $p=0,005$, respektive $0,040$). Krabicové grafy představují medián, 25–75% percentily a rozsah hodnoty. Hodnoty $p < 0,05$ a $< 0,01$ jsou označeny * a **.

2.2.6 Detekce počtu leukocytů a nádorových buněk v moči

Jak bylo uvedeno výše, mRNA CD45 byla hojně přítomna ve vzorcích moči (Tabulka 9, Obrázek 26A), ale hladiny se nelišily u benigních pacientů se zánětem a bez zánětu ($p=0,17$). Jedním z cílů této práce bylo, zda test RT-qPCR detekuje relevantní počet leukocytů (CD45 pozitivní) a rakovinných buněk (KLK3 pozitivní) v moči a byl proveden jednoduchý experiment s ředěním. Jak uvádí jiní, 30 ml moči může obsahovat 100 000 leukocytů, které se mohou dále zvyšovat během zánětu močového traktu (Wilson *et al.*, 2004; dos Santos *et al.*, 2007; Musher *et al.*, 1976). Zmiňovaný počet leukocytů (100 tis.) od dobrovolníka poskytl Ct hodnotu CD45 blízkou 30 (Obrázek 26B), což bylo velmi podobné průměrné hodnotě z našich močových vzorků (průměr CD45 29,6). Průměrná hodnota Ct pro KLK3 ze vzorků pacientů byla 31,2, což je hodnota blízká 1000 LNCaP nádorových buněk prostaty (Obrázek 26C). Tyto výsledky jsou v dobré shodě s obrazovou analýzou, která rovněž detekovala 1 000 LNCaP buněk přidaných do moči (Fujita *et al.*, 2009). Desítky až několik tisíc nádorových buněk pak byly úspěšně detekovány ve vzorcích moči od 35 pacientů (Fujita *et al.*, 2009), což se dobře odráží ve variabilitě Ct hodnot vzorků pacientů v této studii (Obrázek 26A).



Obrázek 26: Výsledky ředících experimentů s leukocyty a buňkami rakoviny prostaty LNCaP jsou ve shodě se skutečnými hodnotami Ct ze vzorků pacientů. **(A)** Rozsah hodnot Ct močových transkriptů od všech pacientů. Krabicové grafy představují medián, 25-75% percentily a rozsah hodnot. **(B)** Ředící řada leukocytů s nádorovými buňkami prostaty LNCaP. **(C)** Ředící řada LNCaP buněk s leukocyty.

3. Tekutá biopsie u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Pacientské vzorky

V této dizertační práci byla použita a zpracována plná krev od pilotního souboru pacientů (N=35) s kastročně rezistentním karcinomem prostaty, kteří byli léčeni na Onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Studii schválila Etická komise FN a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Od všech účastníků studie byl získán písemný informovaný souhlas pro měření nádorových markerů a pro anonymní analýzu dat v této studii.

Tabulka 13: Charakteristiky pacientů.

	Počet pacientů
Celkem	35
Věk (roky)	
<65	12
65-70	14
>70	9
PSA v době dg. (ng/ml)	
0-2,5	0
2,5-10	14
>10	19
n.a.	2
TNM klasifikace	
T1a N0 M0	0
T1b-3 N0 M0	20
T1-4 N1 M0-1	14
n.a.	1
Gleason skóre	
<7	4
7	10
>7	23
Přežití od stanovení dg. (roky)	
<1	0
1-5	9
6-10	15
>10	11

3.1.2 Zpracování krevní plazmy

Plná krev od pacientů byla odebrána do zkumavek s přídavkem EDTA. Krev byla dále stočena při 908 RPM, 20 min při laboratorní teplotě. Po stočení byla plazma bohatá na destičky uchovávána při -80 °C pro další použití.

3.1.3 Izolace cirkulujících nádorových buněk z krve

Cirkulující nádorové buňky (CTC) byly z plné krve odebrané do zkumavek s EDTA a izolovány pomocí kitu RosetteSepTM Human CD45 Depletion Cocktail (Stemcell Technologies). Ke vzorku krve byl přidán RosetteSepTM Cocktail (50 µl/ml) a vše bylo inkubováno 20 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl vzorek naředěn PBS obsahující 2% FBS ve stejném množství jako krve. Do nové zkumavky bylo přidáno médium LymphoprepTM (4 ml, Stemcell Technologies), které bylo následně převrstveno vzorkem. Vše bylo stočeno při 2 871 RPM, 20 min při laboratorní teplotě s vypnutou brzdou. CTC byly posbírány pomocí pipety jako tenká vrstva na rozhraní plazmy a média. Buňky byly dále promyty PBS s 2% FBS a stočeny při 1 435 RPM, 10 min při laboratorní teplotě. K peletě buněk na dně zkumavky byl přidán lyzační pufr RTL s přídavkem β-merkaptoetanolu (350 µl + 3,5 µl). Vzorky byly uchovávány při -80 °C pro další použití.

3.1.4 Izolace nukleových kyselin z krevní plazmy

Pro izolaci volných nádorových nukleových kyselin (ccfDNA/RNA) z krevní plazmy byl použit QIAamp ccfDNA/RNA kit (QIAGEN). Ke vzorkům plazmy byl přidán RPL pufr o objemu 300 µl/1 ml, vortexován 5 s a následně inkubován se vzorkem 3 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl přidán RPP pufr o objemu 100 µl/1 ml, vortexován více než 20 s a následně inkubován 3 min na ledu. Po stočení 3 min při 11 300 RPM byl supernatant přepipetován do nové zkumavky a držen na ledu. K supernatantu byl přidán vychlazený isopropanol ve stejném množství jako vzorku a vše bylo promícháno pomocí vortexu. Vzorek byl následně přepipetován na RNeasy Midi spin column a stočen 1 min při 7 300 RPM. Ze sběrné zkumavky byl poté odstraněn supernatant. Na kolonu byl přidán RWT pufr (4 ml) a stočen 1 min při 7 300 RPM. Ze sběrné zkumavky byl odstraněn supernatant a poté byl na kolonu přidán RPE pufr (2,5 ml) a stočen 5 min při 7 300 RPM. Kolona byla přendána do nové zkumavky a na střed byla napipetována RNase-free voda (200 µl), proběhla inkubace 1 min a stočení 1 min při plné rychlosti (14 000 RPM).

Následně byl proveden postup přečištění vyizolovaných nukleových kyselin. K eluátu byl přidán RPL pufr (200 µl) a 96% etanol (800 µl), vše bylo promícháno a přepipetováno na kolonu RNeasy MinElute spin column (Qiagen). Vzorek s kolonou byl stočen 30 s při 9 200 RPM, supernatant byl odstraněn a poté byl na kolonu přidán pufr RPE (500 µl). Vše bylo opět stočeno 30 s při 9 200 RPM, supernatant byl odstraněn a následně byl na kolonu připipetován 80% etanol (500 µl) a stočen 30 s při 9 200 RPM. Pro dosušení byly kolony stočeny 5 min při plné rychlosti s otevřeným víčkem. Nakonec byla kolona přendána do nové zkumavky a na její střed byl přidán eluční pufr RNase-free voda (20 µl). Po inkubaci 1 min bylo vše stočeno při plné rychlosti a eluát skladován při -80 °C pro další použití.

3.1.5 Izolace nukleových kyselin z cirkulujících nádorových buněk

Pro izolaci nukleových kyselin (DNA/RNA) z cirkulujících nádorových buněk byl použit AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen). Ke vzorku zlyzovaných CTC byl přidán RNA spike I (2 µl, TATAA Biocenter) pro kontrolu výtěžnosti. Dále byl vzorek přenesen na kolonu AllPrep DNA spin column a stočen 30 s při 10 000 RPM. Další postup se lišil pro izolaci DNA (zachycena na koloně) a RNA (přítomna v eluátu). V této práci byla pro další experimenty použita pouze RNA, proto bude popsán jen postup izolace RNA. K eluátu byl přidán 70% etanol (350 µl) a vzorek byl přenesen na RNeasy spin column, vše bylo stočeno 30 s při 10 000 RPM. Supernatant byl odstraněn. Poté byl na kolonu napipetován RW1 pufr (700 µl) a vše bylo stočeno 30 s při 10 000 RPM, supernatant byl odstraněn. Na kolonu byl následně přidán RPE pufr (500 µl) a vše bylo opět stočeno za stejných podmínek, supernatant byl opět odstraněn. Následně byl 80% etanol připipetován na kolonu a stočen 2 min při 10 000 RPM. Poté byla kolona přemístěna do nové zkumavky a vysušena stočením 5 min při 14 000 RPM s otevřeným víčkem. Na střed kolony byl přidán eluční pufr Rnase-free voda (14 µl) a stočen 1 min při 14 000 RPM. K eluátu byl nakonec přidán RNA spike II (2 µl, TATAA Biocenter) pro kontrolu RT-qPCR inhibice. Vzorek byl skladován při -80 °C pro další použití.

3.1.6 Analýza exprese zájmových genů

Pro analýzu exprese zájmových genů (AMACR, AR, AR-V7, CD45, EpCAM, PCA3, PSA, PTEN, TBP a TMPRSS2-ERG) byly vyizolované nukleové kyseliny z krevní plazmy a CTC zpracovávány pomocí reverzní transkripce a kvantitativní PCR v reálném čase, jejichž postup je popsán výše (kapitola 2.1.3 a 2.1.4.).

3.1.7 Statistické zpracování dat

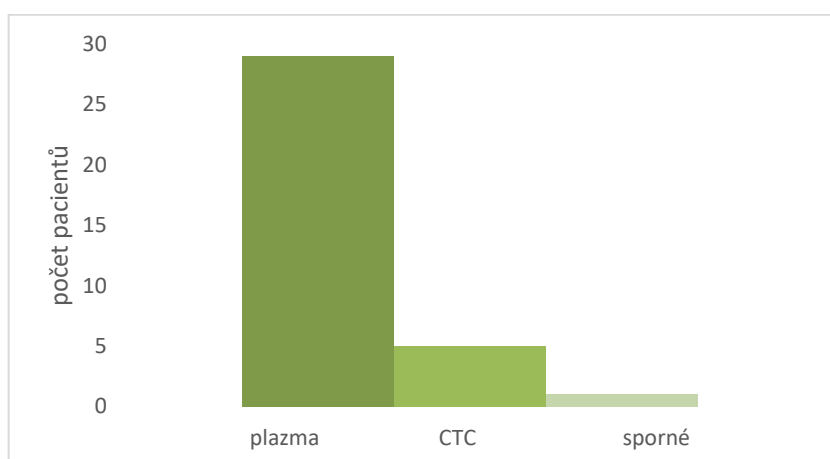
Ke statistickému zpracování dat byl použit program Statistica 12 (Mann–Whitney test, Spearmanova korelace a Pearson´s chi-squared test).

3.2 Výsledky

3.2.1 Exprese studovaných genů z plazmy a cirkulujících nádorových buněk

Pro výběr nejlepšího zdroje nukleových kyselin (NK, ccfDNA/RNA, RNA) pro PCR analýzu byla současně porovnána exprese studovaných genů z krevní plazmy s destičkami a cirkulujících nádorových buněk z krve stejného pacienta. Pro toto srovnání byly použity vzorky od všech pacientů (N=35) s pokročilým karcinomem prostaty.

U 29 vzorků byla efektivnější metoda izolace NK z plazmy a pouze u 5 případů byla úspěšná i izolace z CTC, 1 vzorek vyšel sporně (Obrázek 27). Pro další statistické zpracování výsledků byly tedy vybrány a použity výsledky z PCR analýzy genů z krevní plazmy.



Obrázek 27: Porovnání exprese studovaných genů pomocí PCR analýzy nukleových kyselin ccfDNA/RNA z krevní plazmy s destičkami a RNA z CTC od 35 pacientů.

3.2.2 Exprese a vzájemná korelace studovaných genů

Byla sledována úspěšnost detekce exprese studovaných genů (Tabulka 14) ve vzorcích 35 pacientů z krevní plazmy s destičkami a vztahy jednotlivých zájmových genů s Gleason skóre, přítomností metastáz a úmrtím pacientů. Z výsledků vyplývá, že největší záchyt exprese (90-100 %) byl pro geny AMACR, CD45, PTEN a TBP. Naopak nejnižší záchyt byl pro fúzní gen TMPRSS2-ERG a to pouze 14 %.

Tabulka 14: Úspěšnost detekce exprese studovaných genů ve vzorcích pacientů (N=35) z krevní plazmy. Vztahy jednotlivých zájmových genů s Gleason skóre pacientů, přítomností metastáz a úmrtím uvedeny v procentech.

sledovaný gen	počet pacientů	exprese genu (%)
AMACR	32	91
AR	15	42
AR-V7	11	31
CD45	34	97
EpCAM	29	82
PCA3	23	65
PSA	6	17
PTEN	33	94
TBP	35	100
TMPRSS2-ERG	5	14
celkem	35	-

Z důvodu přesnější standardizace provedených vyšetření byly použity externí kontroly pro sledování výtěžnosti RNA (spike I) a RT-qPCR inhibice (spike II). Na základě těchto kontrol bylo ze statistického zpracování vyřazeno 7 pacientů z celkových 35. Dva pacienti, kteří neprošli kontrolou kvality podle externích kontrol, avšak měli pozitivní expresi genu AR a TMPRSS2-ERG byli zahrnuti do vybraných statistických analýz.

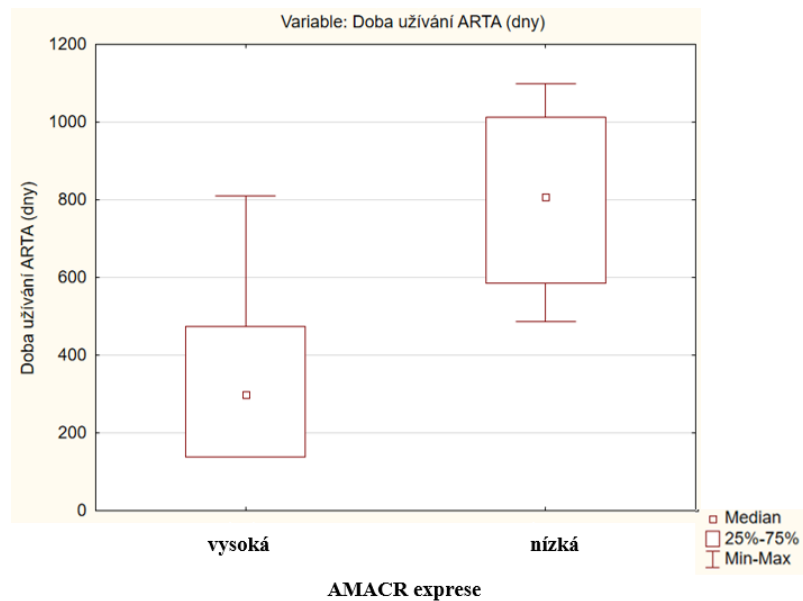
Klinické a patologické údaje o pacientech jsou uvedeny v Tabulce 13. Statisticky byla vyhodnocena data získaná RT-qPCR ze vzorků krevní plazmy. Expresní analýza 9 studovaných genů umožnila analýzu pomocí neparametrického Spearmanova korelačního koeficientu (Tabulka 15). Byla pozorována silná korelace (R_s 0,92) mezi expresí genů TBP a CD45. Dále exprese genu AMACR silně korelovala s expresí genu EpCAM (R_s 0,74). Podobně silná korelace (R_s 0,75) byla nalezena mezi geny PTEN a TBP. Silná korelace byla pozorována i mezi AR-V7 a PSA (R_s 0,88), ale pravděpodobně se jedná o artefakt s souboru s malým počtem vyšetření. Vyšší hodnoty Ct znamenají nižší expresi AR-V7, přičemž tato exprese byla detekována pouze u 11 vzorků. Důležitá je signifikantní korelace mezi expresí genů AMACR a EpCAM a také rovněž mezi geny PTEN a TBP.

Tabulka 15: Spearmanova korelace sledovaných genů.

Proměnná	PSA ze dne doručení	LDH ze dne doručení	AMACR	AR	AR-v7	CD45	EpCAM	PCA3	PSA	PTEN	TBP	Spike I	Spike II
PSA ze dne doručení	1,0000	0,1994	0,1243	0,4396	0,8833	0,1539	0,2150	-0,0123	0,1429	0,1047	0,1504	-0,0051	-0,0435
LDH ze dne doručení	0,1994	1,0000	0,1399	0,1156	0,3939	0,0959	0,1776	-0,0316	-0,0286	0,0102	0,0277	-0,1693	-0,1637
AMACR	0,1243	0,1399	1,0000	-0,1560	0,1394	0,6137	0,7425	0,5098	0,6571	0,7508	0,7737	0,4555	0,4449
AR	0,4396	0,1156	-0,1560	1,0000	0,6167	0,4725	-0,0879	0,1000	-1,0000	0,2857	0,3143	0,2636	0,3636
AR-v7	0,8833	0,3939	0,1394	0,6167	1,0000	0,6121	0,2121	0,1667		0,3576	0,3455	-0,0714	-0,0714
CD45	0,1539	0,0959	0,6137	0,4725	0,6121	1,0000	0,4816	0,6331	0,2000	0,6308	0,9227	0,6324	0,4820
EpCAM	0,2150	0,1776	0,7425	-0,0879	0,2121	0,4816	1,0000	0,3015	0,8000	0,6065	0,6623	0,2649	0,1853
PCA3	-0,0123	-0,0316	0,5098	0,1000	0,1667	0,6331	0,3015	1,0000	-0,1429	0,4474	0,5549	0,2672	0,4966
PSA	0,1429	-0,0286	0,6571	-1,0000		0,2000	0,8000	-0,1429	1,0000	0,6000	0,2571	-0,1000	-0,2000
PTEN	0,1047	0,0102	0,7508	0,2857	0,3576	0,6308	0,6065	0,4474	0,6000	1,0000	0,7538	0,4579	0,5565
TBP	0,1504	0,0277	0,7737	0,3143	0,3455	0,9227	0,6623	0,5549	0,2571	0,7538	1,0000	0,6482	0,4775
Spike I	-0,0051	-0,1693	0,4555	0,2636	-0,0714	0,6324	0,2649	0,2672	-0,1000	0,4579	0,6482	1,0000	0,7296
Spike II	-0,0435	-0,1637	0,4449	0,3636	-0,0714	0,4820	0,1853	0,4966	-0,2000	0,5565	0,4775	0,7296	1,0000

3.2.3 Vzájemný vztah studovaných genů a klinicky významných parametrů

Dále byl studován vzájemný vztah mezi expresí genu AMACR normalizovaného dle hladin housekeeping genu TBP (pacienti rozdělení do dvou skupin AMACR-TBP vysoká a nízká exprese) a dobou užívání ARTA terapie (užívání léčiv abirateronu nebo enzalutamidu, Obrázek 28). Dle výsledků vyplývá, že pacienti s vyšší expresí AMACR užívali ARTA terapii signifikantně kratší čas než pacienti s nižší expresí tohoto genu ($p=0,024$). Vyšší exprese genu AMACR tedy souvisí s kratší dobou užívání ARTA. Karcinomy prostaty u pacientů s vyšší expresí genu AMACR byly agresivnější a rychleji progredovaly, což vyžadovalo ukončení ARTA terapie a nasazení další linie léčby. Významná data týkající se genu AMACR byla pozorována také ve vztahu k celkovému přežití pacientů. Pacienti s vyšší expresí genu AMACR (normalizovaného na gen TBP) vykazovali vyšší úmrtnost než pacienti s nízkou expresí AMACR ($p=0,011$, Tabulka 16).



Obrázek 28: Vztah mezi expresí genu AMACR a délkou užívání ARTA terapie. Krabicové grafy představují medián, 25-75% percentil a rozsah hodnot.

Tabulka 16: Vztah mezi expresí genu AMACR a úmrtím pacientů.

úmrtí	AMACR-TBP exprese		
	vysoká	nízká	celkem
ano	7	1	8
ne	6	12	18
celkem	13	13	26

Z vyhodnocených výsledků se jako zajímavý ukázal také gen EpCAM (normalizovaný na TBP), jehož vyšší exprese byla spojena s pokročilejším stádiem onemocnění v době kastrace ($p=0,010$), ale nikoli v době nasazení ARTA terapie ($p=0,51$). Vyšší exprese EpCAM byla spojena s přítomností viscerálních nebo kostních metastáz v době kastrace pacientů (Tabulka 17). Exprese EpCAM rovněž korelovala s hladinou laktátdehydrogenázy (LDH) při zahájení ARTA terapie ($R_s 0,496$).

Tabulka 17: Vztah mezi expresí genu *EpCAM* a přítomností metastáz v době kastrace a v době nasazení ARTA terapie.

přítomnost M EpCAM-TBP exprese			
v době kastrace	vysoká	nízká	celkem
ano	8	2	10
ne	3	9	12
celkem	11	11	22
nasazení ARTA terapie			
ano	6	8	14
ne	3	2	5
celkem	9	10	19

Pro další studované geny PCA3, PSA, TMPRSS2-ERG, CD45, PTEN, AR ani jeho sestřihovou variantu AR-V7 nebyl pozorován signifikantní vztah s klinicky významnými parametry. Dále byla statisticky vyhodnocena Spearmanova korelace mezi vybranými klinickými parametry (Tabulka 18). V rámci statistické analýzy těchto parametrů bylo zjištěno, že vstupní PSA (iPSA) silně koreluje s PSA po kastraci (R_s 0,749), s LDH při zahájení ARTA terapie (R_s 0,744) a především negativně s dobou užívání ARTA terapie (R_s -0,897). Výše uvedené výsledky bude nutné ověřit na rozšířeném souboru pacientů.

Tabulka 18: Spearmanova korelace významných klinických parametrů.

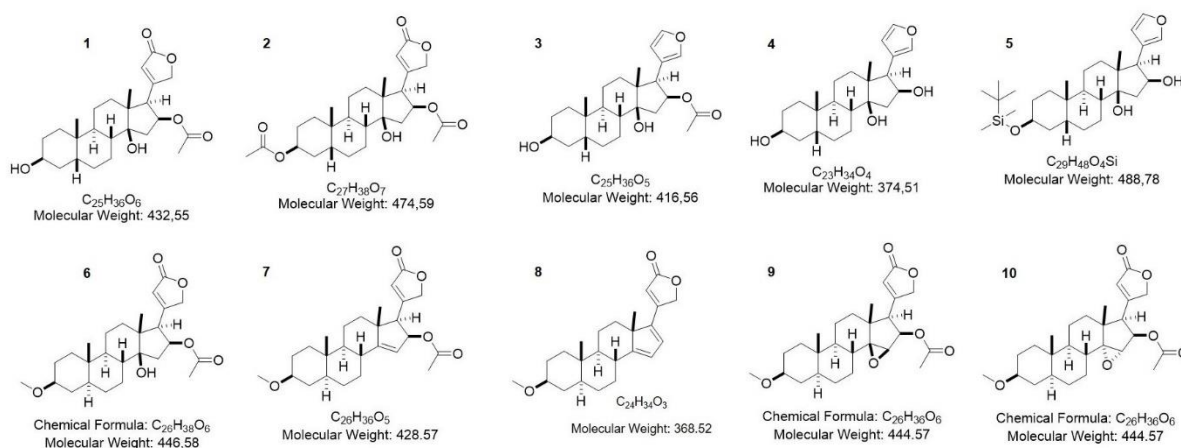
	PSA ze dne doručení	LDH ze dne doručení	iPSA	Věk v době dg.	Doba od kastrace do rozvoje kastr. rezistence (dny)	PSA nadir (po kastraci)	PSA (při zahájení ARTA)	LDH (při zahájení ARTA)	ALP (při zahájení ARTA)	Doba užívání ARTA (dny)	Věk v době zahájení ARTA
PSA ze dne doručení	1,0000	0,2788	0,4661	0,2164	-0,3152	0,5297	0,5765	0,0519	0,4854	-0,5330	0,0978
LDH ze dne doručení	0,2788	1,0000	0,1735	0,2532	-0,2948	0,2857	0,3932	0,3905	0,2988	-0,3599	0,0565
iPSA	0,4661	0,1735	1,0000	0,1022	-0,4545	0,7486	0,4773	0,7436	0,3091	-0,8975	-0,1406
Věk v době dg.	0,2164	0,2532	0,1022	1,0000	-0,1831	0,2431	0,3192	0,0195	0,2305	0,1856	0,7765
Doba od kastrace do rozvoje kastr. rezistence (dny)	-0,3152	-0,2948	-0,4545	-0,1831	1,0000	-0,6225	-0,5049	-0,2144	-0,1105	0,3047	0,2757
PSA nadir (po kastraci)	0,5297	0,2857	0,7486	0,2431	-0,6225	1,0000	0,6609	0,4895	-0,0066	-0,7782	-0,1118
PSA (při zahájení ARTA)	0,5765	0,3932	0,4773	0,3192	-0,5049	0,6609	1,0000	0,2131	0,2056	-0,5219	0,0939
LDH (při zahájení ARTA)	0,0519	0,3905	0,7436	0,0195	-0,2144	0,4895	0,2131	1,0000	0,3804	-0,7283	-0,1553
ALP (při zahájení ARTA)	0,4854	0,2988	0,3091	0,2305	-0,1105	-0,0066	0,2056	0,3804	1,0000	-0,2551	0,0169
Doba užívání ARTA (dny)	-0,5330	-0,3599	-0,8975	0,1856	0,3047	-0,7782	-0,5219	-0,7283	-0,2551	1,0000	0,1716
Věk v době zahájení ARTA	0,0978	0,0565	-0,1406	0,7765	0,2757	-0,1118	0,0939	-0,1553	0,0169	0,1716	1,0000

4. Účinek steroidních derivátů srdečních glykosidů na prostatické buněčné linie

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Chemický materiál

V této práci byly testovány srdeční glykosidové deriváty (Obrázek 29), které byly syntetizovány na Ústavu organické chemie ve Varšavě v Polsku pod vedením prof. Wichy a ve spolupráci s Laboratoří růstových regulátorů PŘF UP v Olomouci. Testovaná skupina (Tabulka 19) zahrnuje oleandrigenin (1) a jeho 3-O-acetyl derivát (2), 17β-(3-furyl)-oleandrigeninové analogy (3-5), 3-O-methyl-5α-oleandrigenin (6), 14β,15β-epoxid (9), deriváty androstanu odvozené od oleandrigeninu (7, 8 a 10). Čistota testovaných látek byla stanovena pomocí HPLC (>98 %). Všechny látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na 10 mM zásobní koncentraci. Požadované koncentrace testovaných látek byly připraveny přidáním zásobních roztoků do příslušného média. Strukturální vzorce testovaných látek včetně jejich molekulové hmotnosti jsou znázorněny na Obrázku 29. Pro snadnější orientaci budou v textu uváděny látky pod svými čísly (1-10).



Obrázek 29: Strukturální vzorce testovaných látek (1-10) včetně jejich molekulové hmotnosti.

Tabulka 19: Chemické názvy testovaných látek pod uvedenými čísly (1-10).

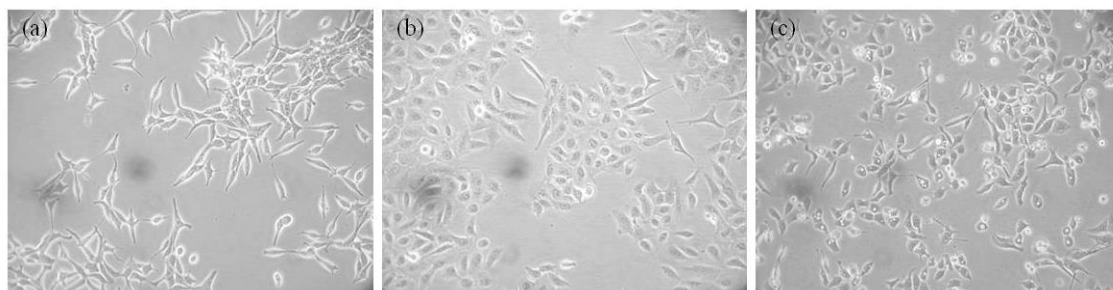
Testovaná látka	Chemický název
1	Oleandrogenin
2	3- <i>O</i> -Acetyl oleandrogenin
3	16 β -Acetoxy-17 β -(Furyl-3)-5 β ,14 β -androstan-3 β ,14-diol
4	17 β -(Furyl-3)-5 β ,14 β -androstan-3 β ,14,16 β -triol
5	17 β -(Furyl-3)-3 β -tertbutyldimethylsilyloxy-5 β ,14 β -androstan-14,16 β -diol
6	3- <i>O</i> -Methyl-5 α -oleandrogenin
7	16 β -Acetoxy-17 β -(5H-furan-2-on-3-yl)-3 β -methoxy-5 α -androst-14-ene
8	17 β -(5H-Furan-2-on-3-yl)-3 β -methoxy-5 α -androstan-14,16-diene
9	16 β -Acetoxy-14,15 β -epoxy-3 β -methoxy-5 α -card-22-enolide
10	16 α -Acetoxy-14,15 α -epoxy-17 β -(5H-furan-2-on-3-yl)-3 β -methoxy-5 α ,14 α -androstane

4.1.2 Kultivace buněk

Experimenty byly prováděny s buněčnými liniemi odvozenými od karcinomu prostaty DU-145 a LNCaP a nenádorovou prostatickou linií RWPE-1 (Obrázek 30). Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích (5-10 ml) v příslušném médiu v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Veškerá manipulace s buňkami byla prováděna sterilně a ve flow-boxu.

Buněčná linie DU-145 byla kultivovaná v kultivačním médiu DMEM (Eaglovo médium modifikované dle Dulbecco, Invitrogen), obohaceném o 10% fetální bovinní sérum (FBS, Invitrogen), antibiotika streptomycin a penicilin (1 U/ml, Invitrogen) a 2 mM L-glutamin (Sigma). LNCaP buňky byly kultivovány v RPMI 1640 médiu (Sigma) s přidavkem 10% FBS, 2 M L-glutaminu, 1 mM pyruvátu sodného (Sigma) a antibiotik penicilinu a streptomycinu (1 U/ml). Obě linie byly pasážovány pomocí 0,1% trypsin-EDTA (Sigma). Kultivace nenádorové prostatické linie RWPE-1 probíhala v SFM médiu (Serum-free medium; Life Technologies), které bylo obohaceno o extrakt hovězí hypofýzy (BPE, 0,05 mg/ml, Life Technologies), epidermální růstový faktor (EGF, 5 ng/ml, Life Technologies) a antibiotika penicilin, streptomycin, amphotericin B

(1 U/ml, Sigma) a gentamycin (0,5 U/ml, Sigma). Buňky RWPE-1 byly pasážovány pomocí 0,05% trypsin-EDTA. Kultivace všech buněčných linií probíhala v inkubátoru Heracell (Thermo Scientific) při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂.



Obrázek 30: Morfologie buněk u lidské prostatické nádorové buněčné linie (a) LNCaP a (b) DU-145 a lidské prostatické nenádorové buněčné linie (c) RWPE-1. Zvětšení 20x.

4.1.3 Test cytotoxicity testovaných látek

Ke sledování závislosti účinku dávky testovaných látek na buněčnou viabilitu byl použit MTT test buněčné viability (Carmichael *et al.*, 1987), pomocí kterého byla určena koncentrace IC₅₀. Jedná se o koncentraci, která inhibovala buněčnou viabilitu z 50 % po 48 h inkubaci buněk s testovanou látkou. Do 96-jamkových mikrotitračních panelů byly nasazeny buňky v závislosti na typu buněčné linie ve 100 μl média v počtu 1,4×10⁴ buněk/cm² (DU-145); 1,6×10⁴ buněk/cm² (LNCaP) a 3,2×10⁴ buněk/cm² (RWPE-1). Po 24 h (DU-145), případně 48 h (u buněk LNCaP, RWPE-1) latenci, během níž došlo k adhezi buněk ke dnu jamky, bylo médium v jamkách vyměněno za čerstvé médium obsahující příslušnou koncentraci testovaných látek. Byla nařaděna sestupná koncentrační řada testovaných látek (0,5-50 μM) a následovala jejich inkubace s buňkami po dobu 48 h. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze příslušné médium, případně vehikulum testovaných látek DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %. Po 48 h inkubaci bylo do každé jamky přidáno 10 μl 0,5% činidla MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid, Serva). Žlutá tetrazoliová sůl byla v metabolicky aktivních buňkách redukována na fialové krystaly formazanu, které byly po 3 h rozpuštěny ve 100 μl 10% SDS (dodecylsulfát sodný, Serva). Po 24 h byla na spektrofotometru Power Wave XS (BIOTEK®Instruments) provedena kvantifikace změřením absorbance roztoku při vlnové délce 570 nm, která přímo korelovala s počtem vitálních buněk. Na základě testu byla určena koncentrace IC₅₀, která inhibuje buněčnou viabilitu z 50 % po inkubaci buněk s testovanými látkami. Experimenty byly provedeny v tripletech a třikrát nezávisle opakovány.

4.1.4 Kultivace 3D modelových systému

Kultivace 3D buněčných sféroidů představuje *in vitro* experimentální model, který napodobuje vlastnosti bližší reálné situaci *in vivo*. V tomto uspořádání se v rámci sféroidu tvoří gradienty živin, kyslíku či odpadních metabolitů a zároveň je možné uskutečnit kokultivaci různých buněčných typů nebo zahrnout interakce s extracelulární matrix (ECM). Přirozenými interakcemi pak buňky získávají morfologické a jiné buněčné charakteristiky podobné těm v solidních nádorech *in vivo* (Barchánková *et al.*, 2019).

Před kultivací 3D buněčných sféroidů byl na dno jamek mikrotitračních panelů aplikován 1,5% roztok agarózy, který byl ještě před tím sterilizován při 121 °C po dobu 15 min. Po ztuhnutí agarózy bylo do každé jamky 96-jamkového panelu vloženo 3000 buněk v případě všech tří linií, které byly inkubovány v tzv. médiu pro sféroidy (DMEM/F-12, 3:1, Invitrogen; 0,2× supplement B27 bez vitamínu A, Invitrogen; 10 ng/ml EGF, Sigma; 0,4% BSA - hovězí sérový albumin, Sigma). Po nanesení buněk byly kultivační panely centrifugovány při otáčkách 1000 RPM za laboratorní teploty po dobu 10 min. Následně bylo k buňkám přidáno 50 µl čistého média. Po inkubaci buněk přes noc byly vzniklé buněčné sféroidy ovlivněny testovanou látkou v koncentrační řadě 25-2 µM. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze příslušné médium, případně vehikulum testovaných látek DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %. Stav buněčných sféroidů byl průběžně kontrolován a zaznamenáván 1. a 7. den po ovlivnění a účinek testované látky byl porovnán s kontrolními sféroidy. Experimenty byly provedeny v tripletech a třikrát nezávisle opakovány a pomocí programu ImageJ (National Institutes of Health, NIH) byly stanoveny plochy 3D buněčných sféroidů a porovnávány s kontrolními.

4.1.5 Analýza buněčného cyklu

Průtoková cytometrie umožňuje stanovit množství DNA a určit zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu v daném vzorku buněk. Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky DU-145 a LNCaP pěstovány v 60 mm kultivačních miskách. Buňky byly následující den ovlivněny testovanou látkou v koncentraci IC₅₀ po dobu 24/48 h. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze příslušné médium, případně vehikulum testovaných látek DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %.

Po inkubaci buněk bylo kultivační médium odsáno, miska byla 2x promyta pomocí PBS (Phosphate Buffer Saline) a po trypsinizaci (0,25% trypsin-EDTA) byly

buňky opláchnuty příslušným médiem, tato buněčná suspenze byla přenesena do zkumavky a centrifugována 10 min při 4 °C a 1 500 RPM. Následně byl supernatant odpipetován a peletka opatrně resuspendována v PBS. Buněčná suspenze byla opět centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl opět odpipetován a peletka rozpuštěna v 50 µl PBS a opatrně promíchána. K buňkám byl za stálého jemného vortexování po kapkách přidán 1 ml vychlazeného 70% etanolu (Lachema). Zafixované buňky byly uloženy na -20 °C do dalšího zpracování.

Pro finální analýzu buněčného cyklu byly vzorky centrifugovány při 4 °C, 1090 RPM, po dobu 10 min. Supernatant byl odpipetován, buňky byly promíchány ve 3 ml PBS obsahující 2% FBS a ponechány 10 min na ledu. Poté byly buňky centrifugovány při 4 °C, 5 min při 1200 RPM a byl odstraněn supernatant. Vzniklá peletka byla resuspendována v 50 µl PBS s 0,2 mg/ml RNasy A (Qiagen) a přenesena do mikrozukavky. Přípravený vzorek byl inkubován 15 min ve vodní lázni při 37 °C. Následně byl každý vzorek obarven propidium jodidem (100 µg/ml, Sigma) a inkubován na ledu a ve tmě po dobu 15 min. Před analýzou buněčného cyklu na průtokovém cytometru FACS Calibur (Becton Dickinson Bioscience) byly buňky udržovány při 4 °C. Zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu po ovlivnění testovanou látkou bylo porovnáváno se zastoupením kontrolních buněk. Experimenty byly třikrát opakovány.

4.1.6 Imunocytochemická fluorescenční detekce steroidních receptorů

Buňky byly pěstovány na kulatých krycích sklech v 60 mm kultivačních miskách a inkubovány se 4 ml příslušného média, které obsahovalo testované látky v koncentraci IC₅₀. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze příslušné médium, případně vehikulum testovaných látek DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %. Po časovém inkubačním intervalu (24/48 h) byla sklička promyta v PBS a následně byly buňky fixovány vychlazenou směsí metanol/acetone (1:1, v/v) po dobu 10 min. Na sklička byly aplikovány primární protilátky (seznam protilátek je uveden v Tabulce 20). Po inkubaci protilátek při 4 °C přes noc byl jejich nadbytek odmyt pomocí PBS a sklička byla inkubována s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou (Alexa Fluor 594 kozí anti-myšší IgG nebo Alexa Fluor 488 kozí anti-králíčí IgG; Molecular Probes, USA). Po dalším oplachu v PBS byla všechna buněčná jádra za tmy a pokojové teploty dobarvena 50 µg/ml DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol; Sigma). Následně byla sklička dvakrát rychle opláchnuta v deionizované vodě a zamontována do vodného média mowiol

(Calbiochem). Ve fluorescenčním mikroskopu (BX50F, Olympus) byla srovnána exprese a lokalizace receptorů v buňkách ovlivněných testovanými látkami a buňkách kontrolních. Experiment byl třikrát opakován.

4.1.7 Inkorporace bromodeoxyuridinu

Inkorporace 5-brom 2'-deoxyuridinu (BrdU; 0,1 mmol/l, Sigma) byla použita k detekci buněk ve fázi S buněčného cyklu. BrdU je modifikovaná nukleotidová báze, která se během syntézy řetězce DNA začleňuje do DNA a umožňuje detekovat pouze buňky ve fázi S. Buňky byly pěstovány na kulatých krycích sklech v 60 mm kultivačních miskách a inkubovány se 4 ml příslušného média, které obsahovalo testované látky v koncentraci IC_{50} . Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze příslušné médium, případně vehikulum testovaných látek DMSO, jehož koncentrace v médiu nepřesáhla 0,3 %. BrdU byl přidán do média 4 h před sběrem krycích sklíček s adherovanými buňkami. Nadbytek buněk byl poté opláchnut PBS a buňky byly pomocí vychlazené směsi metanol/acetón (1:1, v/v) fixovány po dobu 10 min. Nejdříve byla DNA buněk denaturována prostřednictvím HCl (ředění 1:5, Lachema) a následně byla aplikována primární myší monoklonální protilátka proti BrdU (ředění 1:100, klon Bu20a, Dako) po dobu 60 min při pokojové teplotě. Následně byla aplikována myší sekundární protilátka značená pomocí FITC (1:100, fluorescein isothiokyanát; Sigma) po dobu 60 min při pokojové teplotě. Buněčná jádra byla nakonec dobarvena 50 $\mu\text{g/ml}$ DAPI (Sigma), opláchnuta v deionizované vodě a zamontována do vodného média mowiol, podobně jako u imunocytochemické detekce (viz výše). Ve fluorescenčním mikroskopu byl spočítán počet BrdU pozitivních buněk k celkovému počtu všech buněčných jader. Hodnoty byly srovnány s kontrolními neovlivněnými buňkami. Experiment byl třikrát opakován.

4.1.8 Western blot analýza

Buňky byly nasazeny do 100 mm kultivačních misek a ovlivněny testovanou látkou v koncentraci (IC_{50}) po dobu 24 a 48 h. Po uplynutí inkubace bylo médium odsáto, buňky byly promyty vychlazeným PBS a byly uvolněny z povrchu misek pomocí vychlazeného lyzačního pufru (0,3 M TRIS-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40, Sigma; 10% SDS; 10% deoxycholát sodný, Sigma; deionizovaná voda), ke kterému byly přidány tablety proteázových a fosfatázových inhibitorů (Roche). V tomto lyzačním pufru byly buňky inkubovány 60 min při 4 °C a každých 15 min vortexovány. Poté byly

centrifugovány při 20 000 RPM a 4 °C po dobu 30 min. Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkuvek.

Z lyzovaných buněk byla stanovena koncentrace proteinů podle Bradfordové (Bradford, 1976). Hovězí sérový albumin (BSA, Sigma; 1 µg/µl) byl použit jako standard v koncentrační řadě 0,5; 1; 2; 5; 7 a 10 µl na 1 ml naředěného Bradfordova činidla (1:4; Sigma). Do 1 ml naředěného Bradfordova činidla byl přidán 1 µl vzorku. Standardy a vzorky byly přeneseny v tripletech do 96-jamkového panelu a byla změřena absorbance proteinů při 595 nm na spektrofotometru PowerWave XS. Na základě kalibrační křivky roztoku BSA byl proveden výpočet obsahu proteinů ve vzorcích. Připravená koncentrace proteinů ve vzorcích byla 20,5 µg/10 µl. Proteinové lyzáty byly smíchány s 4× koncentrovaným LSB pufrem (1 M TRIS pH 6,7, P-Lab; 40% glycerol; 10% SDS; 0,05% bromfenolová modř; 1% β-merkaptóetanol, Sigma) a doplněny do požadovaného objemu 1× koncentrovaným LSB pufrem. Vzorky byly 2 min zahřáty na 96 °C na termobloku AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet) a uchovávány na -20°C.

Elektroforetická separace proteinů

Separace proteinů ve vzorcích proběhla na 10%, příp. na 12% polyakrylamidovém gelu dle rozpisu Sambrook *et Russell* (2001). Gely byly připraveny za použití deionizované vody, směsi akrylamidu-bisakrylamidu (29:1; Sigma), 1,5 M TRIS pufru (pH 8,8), 10% SDS, 10% persulfátu amonného (Sigma) a N, N, N', N'-tetramethylethylendiaminu (TEMED, Promega). Separace byla provedena při konstantním proudu 120 V přibližně 100 min v přítomnosti elektroforetického pufru (25 mM TRIS; 250 mM glycin, Sigma; 0,1% SDS, pH 8,3). Pro určení molekulové hmotnosti byl použit hmotnostní marker Full-Range Rainbow (Amersham).

Blotování proteinů na membránu

Přenosu proteinů na nitrocelulosovou membránu Hybon-ECL (Amersham) předcházela přibližně hodinová inkubace gelů v transferovém pufru (39 mM glycin; 48 mM TRIS-báze; 0,037% SDS a 20% metanol) a následně byl proveden pomocí blotovacího systému Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) přenos proteinů při konstantním proudu 10 V po dobu 30-45 min. Pro vizualizaci a kontrolu kvality přenesených proteinů byla membrána obarvena pomocí Ponceau S (Sigma) po dobu 5 min, byla promyta v deionizované vodě a připravena pro další práci.

Imunodetekce

Membrána byla rozdělena na části podle molekulových hmotností sledovaných proteinů, nařezané membrány byly opláchnuty v PBS a blokovány v 5% blokovacím mléku (sušené odtučněné mléko Laktino, 1,3 % tuku, PML; PBS; 0,1% Tween 20, Sigma), příp. 5% BSA alespoň 2 h. Poté byly na membrány nanесeny primární protilátky (Tabulka 20) naředěné do 5% mléka (sušené odtučněné mléko 1,3 % tuku; PBS), popř. v 5% BSA, inkubace probíhala ve vlhké komůrce přes noc při 4 °C. Poté byly membrány promývány po dobu 60 min v PBS-T (PBS; 0,1% Tween 20), příp. v TBS-T (0,01 mM TRIS; 0,0137 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,6), přičemž každých 15 min byl promývací roztok nahrazen za čistý. Pak byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě 45 min. Po inkubaci byly membrány promývány v PBS-T (popř. TBS-T) 60 min, přičemž každých 15 min byl promývací roztok nahrazen za čistý. Proteiny byly detekovány chemiluminiscenčním systémem DURO (1:1; Amersham), popř. FEMTO (1:1; Amersham), signál byl detekován pomocí systému Odyssey Fc (Li-Cor Biotechnology). Hodnocení bylo provedeno srovnáním pozice, štěpných či degradačních fragmentů a intenzity proužků pro vzorky kontrolní (K24, K48) a vzorky ovlivněné testovanou látkou. Vnitřní kontrolou množství proteinů ve vzorcích byla detekce MCM-7 (Santa Cruz, USA). Experiment byl třikrát opakován.

Tabulka 20: Seznam použitých primárních protilátek.

protilátka	klon	zdroj	ředění WB, ICE/IF	Velikost (kDa)	výrobce
AR	N-20	králík	1:200/1:50	110	Santa Cruz
cas-3	-	králík	1:1000	35-19-17	Cell Signaling
cas-7	C-7	myš	1:1000	35-30-20	Cell Signaling
ER-α	D-12	myš	1:200/1:50	66	Santa Cruz
ER-β	F-10	myš	1:100/1:50	56	Cell Signaling
MCM-7	141.2	myš	1:500	80	Santa Cruz
Mcl-1	-	králík	1:1000	40	Cell Signaling
p21	12D1	králík	1:1000	21	Cell Signaling
p53	-	králík	1:800	53	Cell Signaling
PARP	46D11	králík	1:800	116-89	Cell Signaling
PR	6A1	myš	1:1000/1:50	90-118	Cell Signaling
PSA	D6B1	králík	1:1000/1:100	29	Cell Signaling

4.1.9 Statistické zpracování dat

Všechny experimenty byly alespoň třikrát nezávisle zopakovány. Z každé série dat byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno Studentovým t-testem a v programu MS Excel 2019 (Microsoft).

4.2 Výsledky

4.2.1 Vliv derivátů odvozených od oleandrigeninů na buněčnou viabilitu

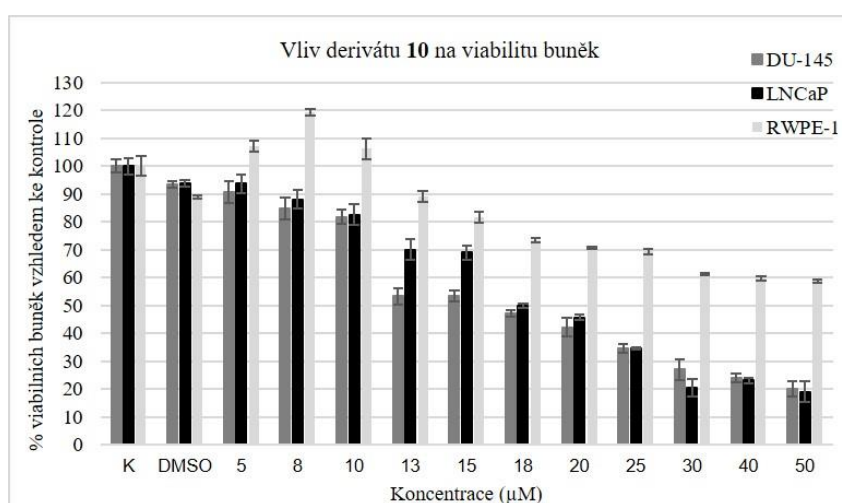
Efekt testovaných derivátů na buněčnou viabilitu byl sledován v rozmezí koncentrací 0,5-50 μM u nádorových prostatických buněk DU-145 a LNCaP a nenádorových prostatických buněk RWPE-1 pomocí MTT testu cytotoxicity. Stanovili jsme IC_{50} koncentrace testovaných derivátů po 48 h působení (Tabulka 21).

Tabulka 21: Stanovení koncentrace IC_{50} testovaných derivátů na nádorové a nenádorové prostatické buňky.

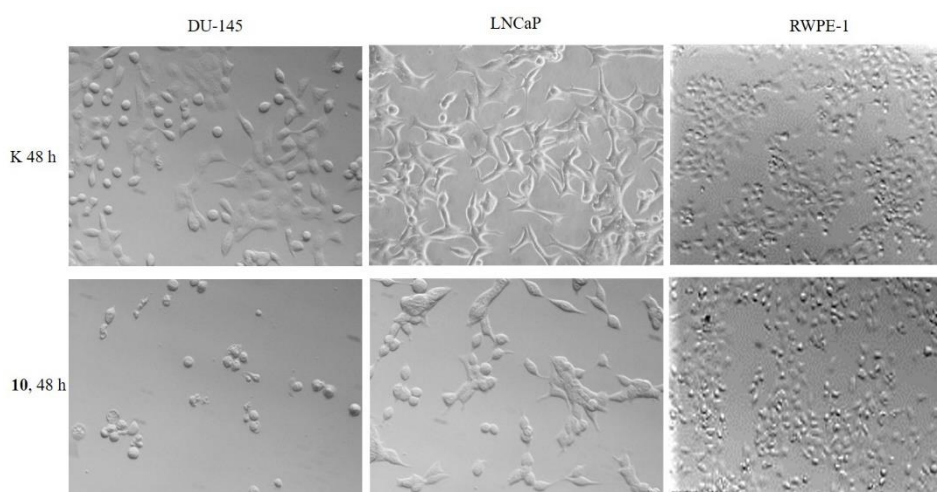
Testované deriváty	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$), 48 h		
	DU-145	LNCaP	RWPE-1
1	<0,5	<0,5	<0,5
2	<0,5	0,8 \pm 1,4	<0,5
3	6,2 \pm 0,6	14,2 \pm 2,1	<0,5
4	2,1 \pm 1,5	4,4 \pm 1,1	<0,5
5	32,1 \pm 1,9	10,3 \pm 0,4	0,8 \pm 2,5
6	10,1 \pm 0,3	23,1 \pm 0,4	2,6 \pm 1,9
7	>50	>50	34,8 \pm 1,8
8	>50	>50	21,2 \pm 2,6
9	2,4 \pm 2,2	5,2 \pm 0,8	<0,5
10	16,8 \pm 0,3	18,0 \pm 1,6	>50

Na základě MTT testu bylo zjištěno, že některé látky vykazovaly výrazný inhibiční účinek na viabilitu obou nádorových buněčných linií DU-145 a LNCaP při velmi nízkých koncentracích, např. látky **1**, **2** vykazovaly koncentraci IC_{50} menší než 0,5 μM . Ovšem tento výrazný cytotoxický účinek byl sledován i u nenádorových buněk RWPE-1 u většiny testovaných látek. Některé testované deriváty naopak neměly vliv na inhibici buněčné viability u nádorových buněk, např. u látek **7** a **8** byla koncentrace

IC₅₀ větší než 50 μM. Ze skupiny testovaných derivátů odvozených od oleandrigenu byla vybrána látka označená číslem **10** (16α-Acetoxy-14,15α-epoxy-17β-(5H-furan-2-on-3-yl)-3β-methoxy-5α,14α-androstane), jejíž koncentrace IC₅₀ byla stanovena 16,8 μM u buněk DU-145 a 18 μM u buněk LNCaP, přičemž na nenádorovou buněčnou linii RWPE-1 neměla výrazný cytotoxický vliv, koncentrace IC₅₀ byla větší než 50 μM (Obrázek 31). Tyto koncentrace IC₅₀ byly použity pro další experimenty v časovém intervalu 24 a 48 h. Morfologické změny po ovlivnění látkou **10** v koncentracích IC₅₀ u nádorových buněk DU-145 a LNCaP a nenádorových buněk RWPE-1 jsou zobrazeny na Obrázku 32.



Obrázek 31: Vliv derivátu **10** na životaschopnost nádorových buněk DU-145 a LNCaP a nenádorových buněk RWPE-1 po 48 h. Zobrazená data jsou průměry ± SD získané ze tří nezávislých experimentů v triplicátech.

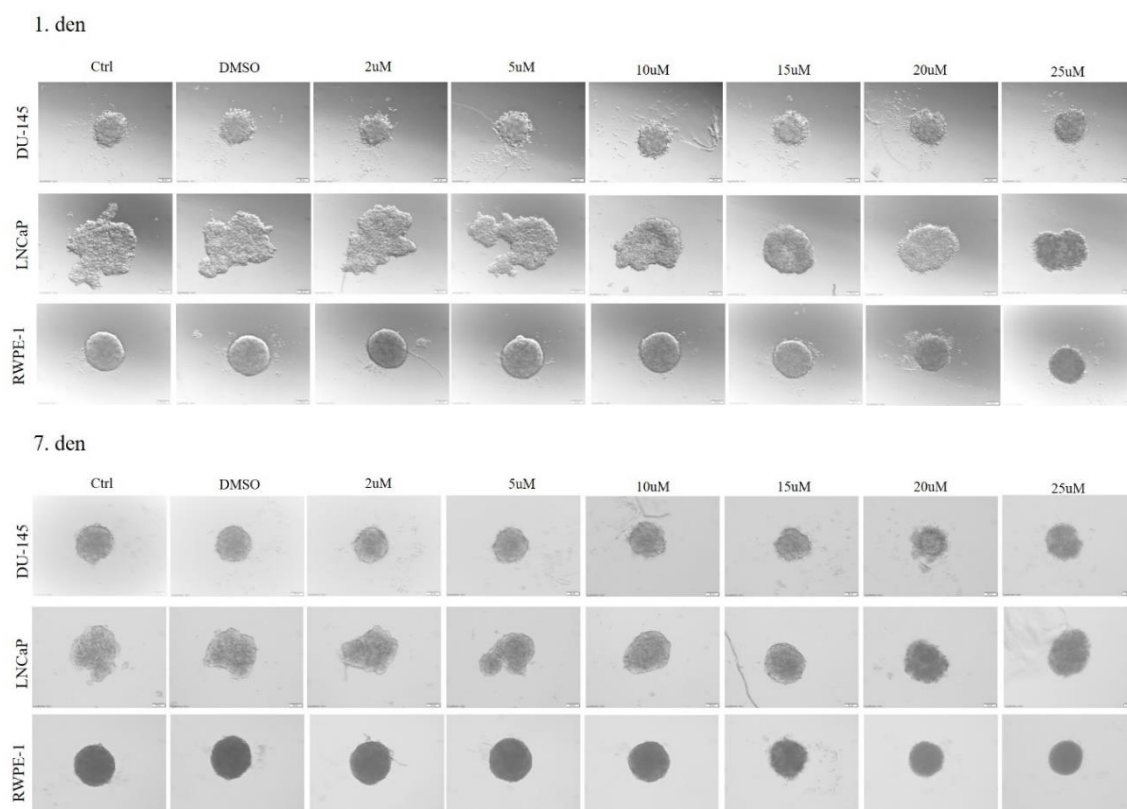


Obrázek 32: Morfologie buněk po ovlivnění testovaným derivátem **10** (IC₅₀, 48 h) u nádorových buněk DU-145 a LNCaP a nenádorových buněk RWPE-1 vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám. Zvětšení 20x.

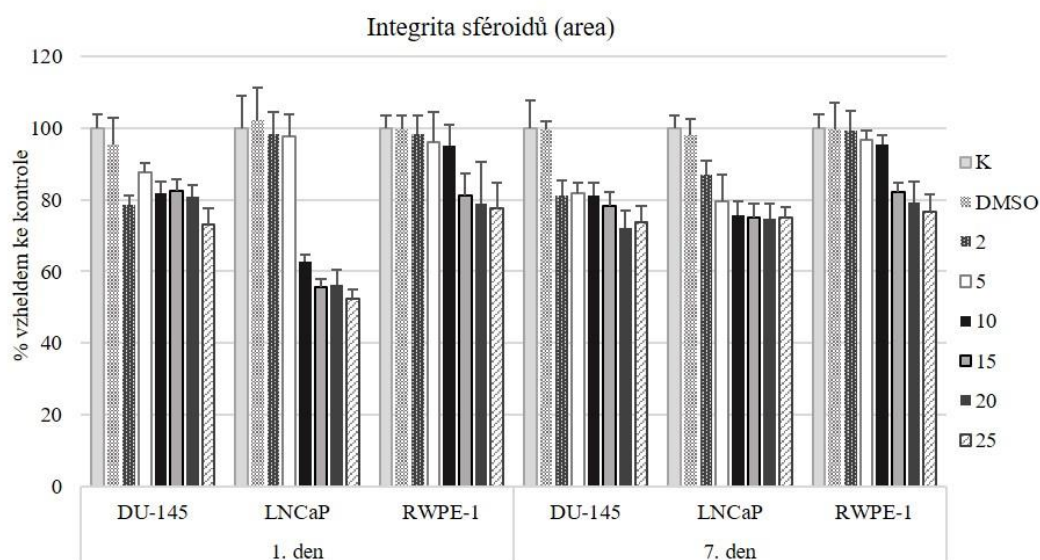
4.2.2 Účinek vybraného derivátu na kultivaci 3D modelových systémů

Kultivace 3D buněčných sféroidů a jejich integrita byla sledována u nádorových buněk DU-145 a LNCaP a nenádorových buněk RWPE-1 po ovlivnění vybraným derivátem **10** v koncentracích 2-25 μM po dobu 1 a 7 dní vzhledem ke kontrolním neovlivněným buňkám (Obrázek 33).

Sféroidy buněk DU-145 byly velikostně i strukturou podobné se sféroidy buněk RWPE-1. Jejich velikost a integrita se víceméně v závislosti na koncentraci testované látky a čase neměnila. Nejvýraznější změny byly zaznamenány u buněčných sféroidů linie LNCaP, které tvořily výrazně větší a méně kompaktní sféroidy, které postupně zmenšovaly svou velikost a stávaly se kompaktnějšími v závislosti na koncentraci a čase (Obrázek 34).



Obrázek 33: Vliv vybraného derivátu **10** (2 - 25 μM) na kultivaci buněk DU-145, LNCaP a RWPE-1 v 3D modelovém systému po dobu 1 a 7 dní v porovnání s kontrolními buňkami. Zvětšení 20x.



Obrázek 34: Vliv vybraného derivátu **10** (2 - 25 μM) na kultivaci a integritu buněk DU-145, LNCaP a RWPE-1 v 3D modelovém systému po dobu 1 a 7 dní vzhledem ke kontrolním buňkám (K). Zobrazená data (změřené plochy jednotlivých sféroidů) jsou průměry \pm SD získané ze tří nezávislých experimentů v triplicátech pomocí programu ImageJ (National Institutes of Health, NIH).

4.2.3 Analýza buněčného cyklu

Na základě analýzy pomocí průtokové cytometrie byly sledovány změny distribuce buněk v rámci buněčného cyklu po ovlivnění buněk DU-145 a LNCaP testovaným derivátem **10** (Tabulka 22). Buňky DU-145 byly zastaveny v kontrolním bodě G_2/M , o čemž svědčí nárůst buněk v této G_2/M fázi buněčného cyklu, zejména po 24 h působení látky **10** z 29 % na 46 %. Buňky LNCaP byly zastaveny ve fázi G_1 , kdy buněčné zastoupení v této fázi vzrostlo za současného snížení zastoupení buněk ve zbývajících fázích cyklu po ovlivnění testovaným derivátem **10** v obou časových intervalech.

Pomocí průtokové cytometrie byla provedena analýza malých jaderných částic k detekci apoptotických buněk sub G_1 frakce buněčného cyklu. Studovaný derivát **10** zvyšoval u obou buněčných linií procenta sub G_1 buněk, přičemž efekt testované látky byl výraznější u buněk LNCaP po 48 h.

Tabulka 22: Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu subG₁, G₁, S, G₂/M fázi na základě průtokové cytometrie. Buněčné linie DU-145 a LNCaP byly ovlivněny testovaným derivátem **10** (IC₅₀, 24 a 48 h) a histogramy neovlivněných kontrolních buněk byly srovnány s histogramy buněk ovlivněných.

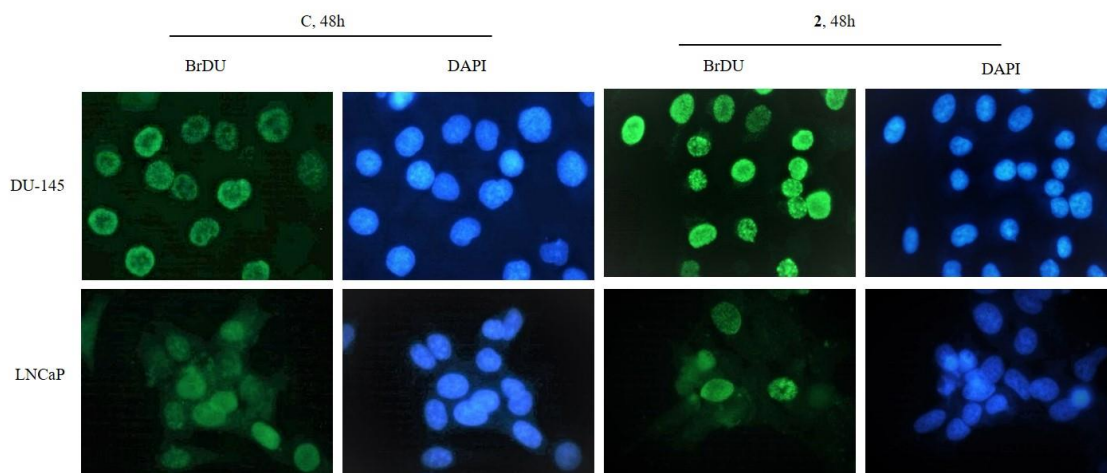
		subG ₁	G ₁	S	G ₂ /M
DU-145	K (24 h)	19 %	49 %	22 %	29 %
	10 (24 h)	26 %	36 %	18 %	46 %
	K (48 h)	21 %	58 %	13 %	29 %
	10 (48 h)	29 %	51 %	11 %	38 %
LNCaP	K (24 h)	11 %	65 %	21 %	14 %
	10 (24 h)	20 %	75 %	8 %	17 %
	K (48 h)	18 %	68 %	14 %	18 %
	10 (48 h)	36 %	78 %	10 %	12 %

4.2.4 Inkorporace BrdU

Při sledování účinku testované látky na proliferaci buněk ve fázi S na základě imunocytochemické detekce BrdU inkorporovaného do DNA proliferujících buněk pomocí monoklonální protilátky anti-BrdU bylo zjištěno, že látka **10** vedla ke snížení procenta BrdU pozitivních buněk u obou buněčných linií v obou časových intervalech (Tabulka 23). Obrázek 35 reprezentuje účinek derivátu u buněk DU-145 a LNCaP po 48 h vzhledem ke kontrolním buňkám.

Tabulka 23: Imunocytochemická detekce inkorporace BrdU u buněk DU-145 a LNCaP. Výsledky představují procenta BrdU pozitivních buněk po ovlivnění testovaným derivátem **10** po dobu 24 a 48 h v IC₅₀ koncentraci ve srovnání s kontrolními buňkami.

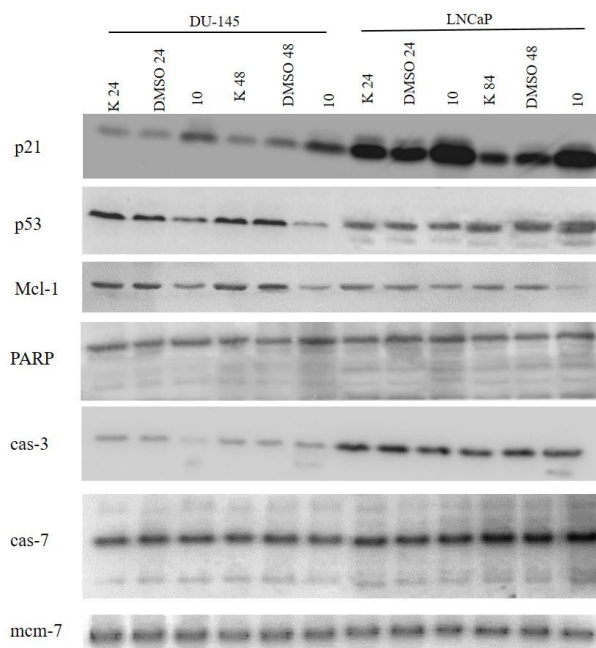
	DU-145	LNCaP
K (24 h)	45 ± 4,7 %	52 ± 6,1 %
10 (24 h)	32 ± 2,1 %	29 ± 4,6 %
K (48 h)	50 ± 3,4 %	54 ± 5,8 %
10 (48 h)	27 ± 3,6 %	31 ± 2,2 %



Obrázek 35: Sledování účinku testovaného derivátu **10** na proliferaci buněk na základě imunocytochemické detekce BrdU inkorporovaného do DNA proliferujících buněk pomocí myši monoklonální protilátky anti-BrdU. Jádra buněk inkorporující BrdU jsou zbarvená zeleně. Jádra všech buněk dobarvená pomocí DAPI svítí modře. Jednotlivé obrázky (BrdU-DAPI) znázorňují stejná zorná pole fluorescenčního mikroskopu při originálním zvětšení 1000×.

4.2.5 Vliv adrostanového derivátu na expresi proteinů buněčného cyklu a apoptózy

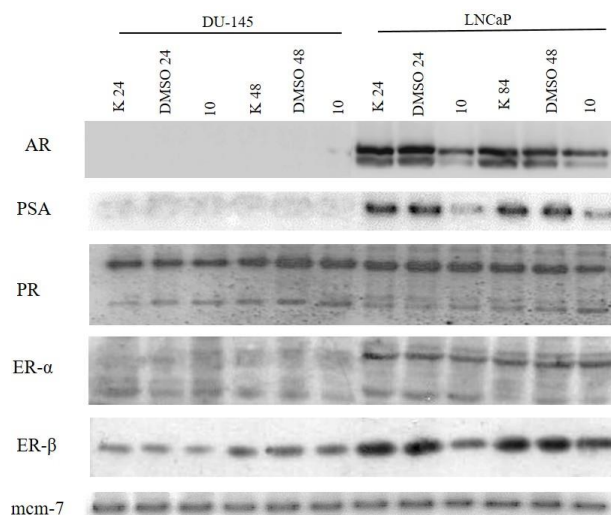
Pomocí Western blot analýzy bylo zjištěno, že testovaný derivát vede ke změnám exprese vybraných proteinů uplatňujících se při regulaci buněčného cyklu a apoptózy (Obrázek 36). Expres proteinu p21 byla u obou buněčných linií zvýšena po 24 i 48 h působení derivátem **10**. U buněk LNCaP byla zvýšená hladina exprese výraznější než u buněk DU-145. Expres nádorového supresoru p53 byla u buněk DU-145 snižena po 24 a 48 h ovlivnění. Buňky exprimují mutovaný typ p53. Zatímco u buněk LNCaP, které exprimují wild-type p53, bylo zjištěno zvýšení exprese proteinu po 48 h působení derivátem **10**. Hladina exprese anti-apoptického proteinu Mcl-1 byla snižena u obou buněčných linií v obou časech, výrazněji u buněk LNCaP po 48 h ovlivnění testovaným derivátem **10**. Při detekci exprese proteinu PARP nebyly zjištěny výraznější změny v porovnání s kontrolními buňkami. Po ovlivnění buněk DU-145 testovaným derivátem byly detekovány štěpné aktivní fragmenty cas-3 v obou časech, u buněk LNCaP po 48 h aplikaci. Změny exprese cas-7 byly zaznamenány u buněk LNCaP zejména po 48 h působení testovaným derivátem.



Obrázek 36: Vliv adrostanového derivátu na expresi proteinů regulujících buněčný cyklus a apoptózu u buněk DU-145 a LNCaP. Buňky byly ovlivněny testovaným derivátem **10** v koncentraci IC_{50} po dobu 24 h a 48 h. Expres proteinů byla porovnávána s kontrolními buňkami (K, DMSO). Byly sledovány proteiny p21 (21 kDa), p53 (53 kDa), Mcl-1 (36 kDa), PARP (118, 89 kDa), cas-3 (35, 19 kDa), cas-7 (35, 30,20 kDa). Mcm-7 (80 kDa) byl detekován jako kontrola množství nanesených proteinů ve vzorku.

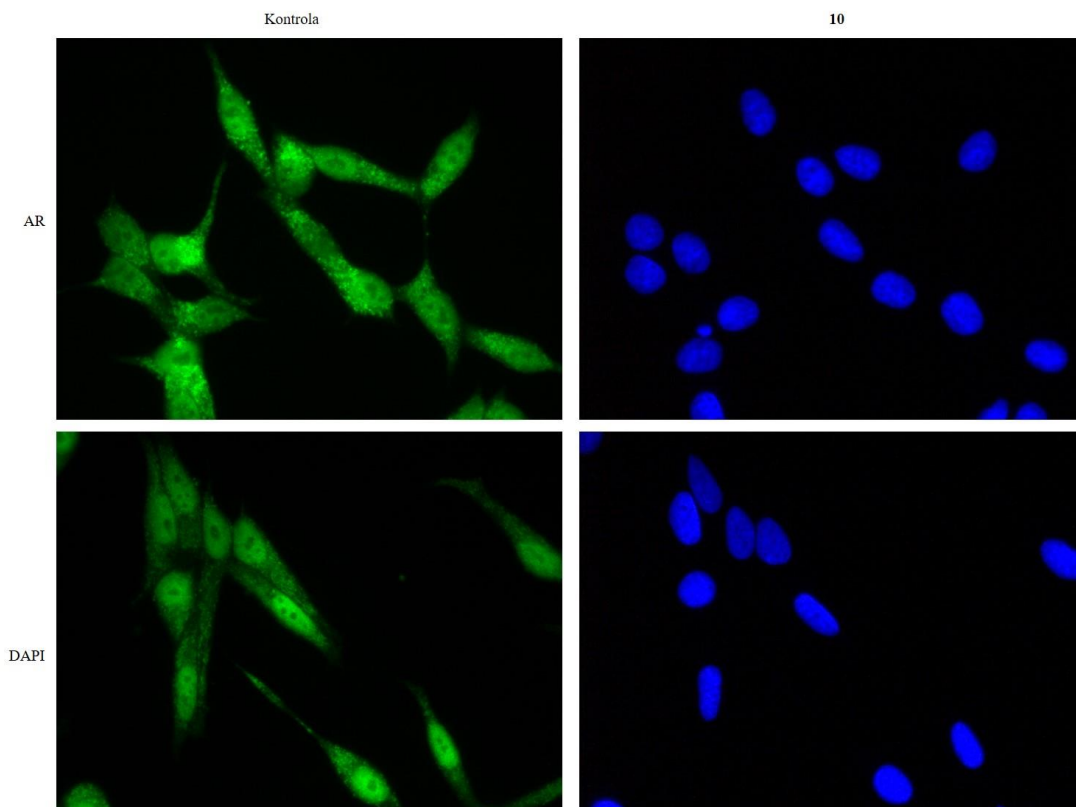
4.2.6 Vliv adrostanového derivátu na expresi receptorů pro steroidní hormony

Western blot analýzou byly sledovány proteiny receptorů pro steroidní hormony a exprese PSA (Obrázek 37). Buňky DU-145 jsou AR negativní, Western blot analýzou u nich nebyla detekována exprese tohoto receptoru. U buněk LNCaP byl zjištěn pokles exprese AR v obou časových intervalech a podobně i pokles exprese PSA, zatímco u buněk DU-145 byla hladina PSA na hranici detekce. Expres PR-B podjednotky byla lehce snížena po 48 h ovlivnění buněk LNCaP. Expres ER- α byla u buněk DU-145 na hranici detekovatelnosti, u buněk LNCaP byla exprese receptoru po ovlivnění derivátem **10** beze změny v porovnání s kontrolními buňkami. Hladina exprese ER- β nebyla u buněk DU-145 pozměněna, u buněk LNCaP byl prokázán pokles hladiny exprese tohoto receptoru po ovlivnění testovaným derivátem v obou časových intervalech.



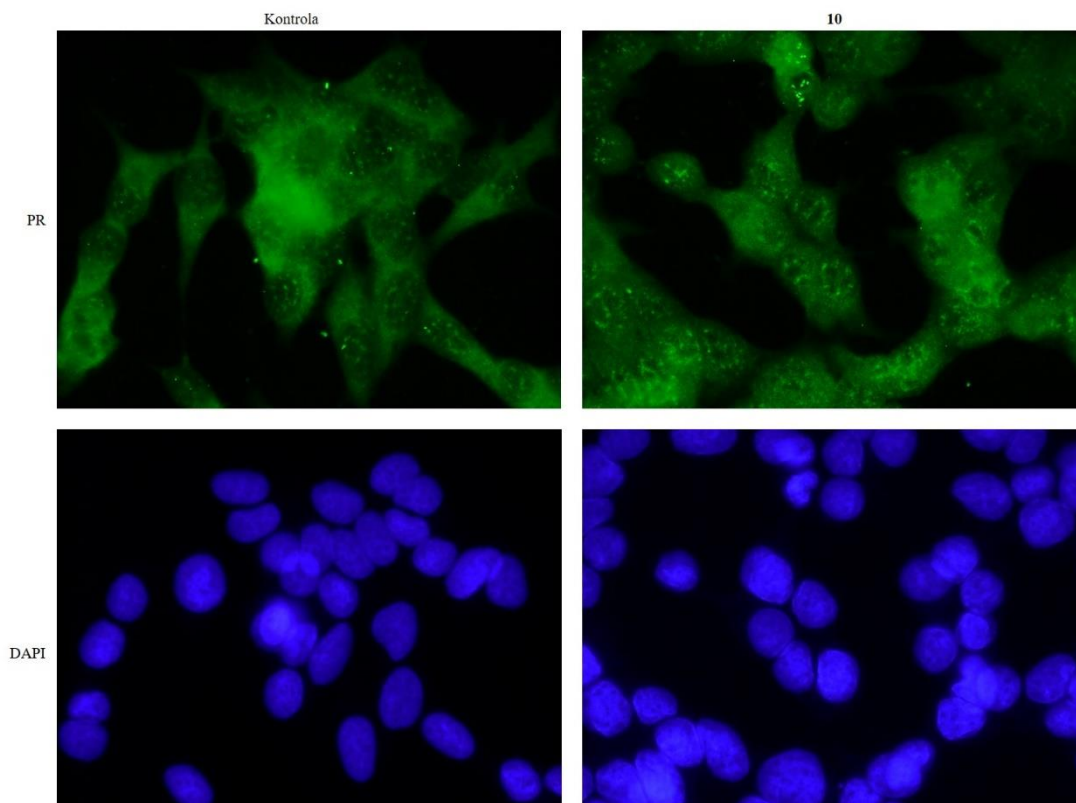
Obrázek 37: Vliv adrostanového derivátu na expresi receptorů pro steroidní hormony u buněk DU-145 a LNCaP. Buňky byly ovlivněny testovaným derivátem **10** v koncentraci IC_{50} po dobu 24 h a 48 h. Expres proteinů byla porovnávána s kontrolními buňkami (K, DMSO). Byly sledovány proteiny AR (110 kDa), PSA (29 kDa), PR (PR-A 90, PR-B 118 kDa), ER- α (66 kDa) a ER- β (56 kDa). Mcm-7 (80 kDa) byl detekován jako kontrola množství nanesených proteinů ve vzorku.

Na základě imunocytochemické detekce byla u kontrolních buněk LNCaP zjištěna výrazná exprese AR jak v cytoplazmě, tak i v jádře buněk. Po ovlivnění buněk derivátem **10** byla lokalizace AR výraznější v buněčném jádře (Obrázek 38).



Obrázek 38: Detekce AR na základě imunofluorescence u buněk LNCaP. Buňky byly ovlivněny testovaným derivátem **10** (IC_{50} , 48 h). Expresa proteinů byla porovnávána s kontrolními buňkami. AR svítí zeleně, buněčná jádra dobarvená pomocí DAPI svítí modře. Jednotlivé obrázky v rámci jednoho vzorku znázorňují stejná zorná pole fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 40 \times .

Na základě imunocytochemické detekce byla zjištěna výrazná exprese PR převážně v cytoplazmě kontrolních buněk LNCaP. Po ovlivnění derivátem **10** buňky vykazovaly výraznou difúzní jadernou lokalizaci PR (Obrázek 39). V cytoplazmě i jádře kontrolních buněk LNCaP byla detekována exprese ER- α i ER- β . Po ovlivnění buněk derivátem **10** nebyla pozorována žádná výrazná změna exprese vzhledem ke kontrole (data nejsou znázorněna). U buněk DU-145 nebyly zaznamenány žádné výrazné změny v lokalizaci či expresi receptorů po ovlivnění testovaným derivátem vzhledem ke kontrolním buňkám (data nejsou znázorněna).



Obrázek 39: Detekce PR na základě imunofluorescence u buněk LNCaP. Buňky byly ovlivněny testovaným derivátem **10** (IC_{50} , 48 h). Exprese proteinů byla porovnávána s kontrolními buňkami. PR svítí zeleně, buněčná jádra dobarvená pomocí DAPI svítí modře. Jednotlivé obrázky v rámci jednoho vzorku znázorňují stejná zorná pole fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 40 \times .

5. Diskuze

Testování biomarkerů v tělních tekutinách souvisejících s nádorovým onemocněním se zdá být dobrou alternativou jako možný screeningový nástroj. Kvůli jednoduchému získávání a skutečnosti, že buňky prostaty jsou přímo uvolňovány do močové trubice po masáži prostaty, se moč může stát zdrojem pro testování biomarkerů u karcinomu prostaty. Tato studie se zaměřila na ověření a vylepšení zavedeného močového testu, validaci metody ve větší kohortě pacientů (N=299, PSA 2,5-10 ng/ml) a dále na testování vybraných klinických parametrů (zánět, % volného PSA v séru, panel kandidátních močových transkriptů). Hlavní výhodou močových biomarkerů je jejich neinvazivní charakter a schopnost detekovat multifokální karcinom prostaty.

Opakovaná analýza stejných vzorků odhalila, že krok preamplifikace vnáší jistou variabilitu do kvantifikace močových markerů, přičemž nezvyšuje procento hodnotitelných vzorků. Z těchto důvodů bylo rozhodnuto z postupu pro aktuální studii vynechat krok preamplifikace. Podrobné studie sice popisují různé metody preamplifikace a aplikaci pro specifické vzorky, jako je analýza jednotlivých buněk nebo sekvenování nové generace (Andersson *et al.*, 2015; Korenková *et al.*, 2015; Kroneis *et al.*, 2017), ale problém vnesení chyb nebyl zatím uspokojivě řešen.

Výsledky naší studie podporují kombinovanou analýzu močových a krevních testů pro přesnější indikaci biopsie prostaty. Nejlepší výsledky byly dosaženy kombinací AMACR, PCA3 a procenta volného PSA. Samostatná analýza PCA3 a % volného PSA již byla popsána v jiných studiích (Ploussard *et al.*, 2010; Auprich *et al.*, 2012). Například, Ploussard *et al.* zjistili, že PCA3 skóre je lepší než % volného PSA u pacientů s hodnotami PSA v „šedé zóně“ (2,5–10 ng/ml) (Ploussard *et al.*, 2010). Auprich *et al.* vyšetřovali pacienty při první, druhé a třetí opakované biopsii (Auprich *et al.*, 2012). Při první opakované biopsii marker PCA3 předpověděl rakovinu prostaty nejlépe, zatímco % volného PSA bylo nejlepší při druhé a třetí opakované biopsii. Urologové i pacienti mají mnoho dalších možností, jak upřesnit rozhodování o biopsii prostaty, ovšem závisí to na financích a dostupných metodách v dané nemocnici. Vedle močových testů Select MDx, ExoDx a TMPRSS2-ERG (Leyten *et al.*, 2014; Van Neste *et al.*, 2016; Hendriks *et al.*, 2017; McKiernan *et al.*, 2018; Tomlins *et al.*, 2016; Sanda *et al.*, 2017) existují i krevní testy Index zdraví prostaty (PHI, prostate health index) a 4KScore (Stephan *et al.*, 2014; Nicholson *et al.*, 2015; Parekh *et al.*, 2015; Vickers *et al.*, 2016). Důležitou

možností je také MRI (magnetic resonance imaging) (Ahmed *et al.*, 2017), kdy kombinace s močovým markerem PCA3 nebo Select MDx nedávno prokázaly potenciál ke snížení zbytečných biopsií (Perlis *et al.*, 2018; Hendriks *et al.*, 2017). Multiparametrická MRI byla nedávno zavedena i v naší nemocnici a také se ji snažíme implementovat do případné validace našich modelů. Zejména hodnota močových transkriptů EpCAM a PSGR si zaslouží další analýzu, protože byly zmíněny pouze v několika studiích (Sequeiros *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2017).

Většina markerů použitých v této studii byla opakovaně studována v literatuře (Raja *et al.*, 2018; Cucchiara *et al.*, 2018; Kearns *et al.*, 2018). Jak se očekávalo, PCA3, AMACR, TRPM8, EZH2 a % volného PSA byly významně odlišné pro BPH a CaP. Kombinované hodnocení PCA3, AMACR a % volného PSA u pacientů s hodnotami PSA v „šedé zóně“ mělo hodnoty senzitivity a specifity srovnatelné s jinými studii (Stephan *et al.*, 2014). Bohužel, hodnoty % volného PSA byly dostupné pouze pro přibližně polovinu vzorků moči a tento model potřebuje další prospektivní validaci. Nicméně aktuální výsledky naznačují, že současný model s PCA3, AMACR a % volného PSA by mohl zabránit 51 % zbytečných biopsií a identifikovat 65 % rakoviny prostaty pT2c s Gleason skóre 7 nebo horším.

Robustnost PCR vyšetření se odrazila v silné korelaci genů souvisejících s prostatou, tj. KLK3, PCA3, AMACR, TRPM8, MSMB a PSGR. Slabší korelace byla pozorována pro EpCAM, což svědčí pro přítomnost dalších epiteliálních buněk z močových cest. Neprokázali jsme význam PA2G4 a Ki67 pro detekci CaP, protože korelovaly pouze slabě s některými markery souvisejícími s rakovinou prostaty (např. AMACR), ale také s CD45 (specifickým pro leukocyty) a housekeeping geny (TBP a RHOA). Exprese CD45 silně korelovala s EZH2 a zejména s housekeeping geny TBP a RHOA, což naznačuje hojnou přítomnost leukocytů v moči. To bylo také patrné z vysokých hladin exprese mRNA CD45, ale ty se nelišily u benigních pacientů se zánětem a bez něj. Měli jsme k dispozici pouze informace o zánětu tkáně prostaty, která je však pravděpodobně pouze minoritním zdrojem leukocytů v moči.

Na základě dřívější pilotní analýzy na našem pracovišti bylo zjištěno, že zánět prostaty může ovlivnit močový PCA3 (Kral *et al.*, 2015, Kucerova *et al.*, 2015). Tato pozorování byla potvrzena v nynější studii, kde byly jak PCA3 ($p=0,041$), tak sérové PSA ($p=0,005$) zvýšené u pacientů se zánětem. To je v souladu s kazuistikou, kdy symptomatická uretrální infekce *Chlamydia trachomatis* vedla k zánětu prostaty a byla spojena se zvýšením jak PSA, tak i PCA3 (Smelov *et al.*, 2013). Ačkoli několik článků

neuvádí žádnou souvislost mezi PCA3 a zánětem, většina z nich zahrnovala pacienty bez sérových hladin PSA. Jedna z prvních studií analyzovala PCA3 u 84 pacientů bez malignity a bez omezení hladin PSA v séru (Hessels *et al.*, 2003). Podle poskytnutých údajů zde nebyla žádná spojitost zánětu s PCA3, ale překvapivě ani se sérovým PSA. Žádná souvislost mezi PCA3 a zánětem také nebyla zmíněna u jiných skupin pacientů bez omezení sérového PSA (Deras *et al.*, 2008; De Luca *et al.*, 2012; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2012). Třetí studie (Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2012) sestávala z mladých pacientů a neposkytovala žádné informace o sérovém PSA, což bylo jako limitace komentováno už dříve (Schaeffer *et al.*, 2012). Poslední studie o PCA3 a zánětu analyzovala podskupinu pacientů se sérovými hladinami PSA 4–10 ng/ml (De Luca *et al.*, 2015). PCA3 se nelišil u pacientů s prostatitidou a pacientů s BPH. Nicméně, skupina s BPH bez zánětu byla poměrně malá (30 pacientů) a přesný počet pacientů s hodnotami PSA „šedé zóny“ nebyl specifikován. I když jsme zjistili mírný nárůst PCA3 u pacientů se zánětem, neovlivnilo to stratifikaci pacientů indikovaných na biopsii prostaty. Problematika zánětu prostaty a jeho hodnocení v moči si nepochybně заслужuje další výzkum novými metodami, jako jsou obrazová analýza nebo hmotnostní spektrometrie.

Tekutá biopsie z periferní krve patří mezi nejnovější a zároveň šetrnější přístupy k získávání informací o nádoru, protože krev obsahuje nejen krevní buňky, ale také cirkulující nádorové buňky, fragmenty buněk, molekuly DNA a RNA nebo malé váčky exozomy (Mithraprabhu *et al.*, 2017). Cirkulující nádorové buňky jsou buňky uvolňované do krevního oběhu z primárního tumoru i metastáz, a jsou schopné zakládat vzdálené metastázy v těle. Zdrojem extracelulárních nukleových kyselin v krvi může být apoptóza, nekróza nebo aktivní sekrece buňkami. ctDNA koreluje s velikostí nádoru a jeho stádiem, klinickými a radiologickými výsledky i progresí nádoru a metastázami (Ondroušková *et al.*, 2015). Bettgowda *et al.* (2014) ve své práci uvedl, že v mnoha studiích byla prokázána přítomnost ctDNA/RNA i CTC v tělních tekutinách u pacientů s pokročilými neoplazmiemi.

V této dizertační práci byla sledována exprese vybraných genů (AMACR, AR, AR-V7, CD45, EpCAM, PCA3, PSA, PTEN, TBP a TMPRSS2-ERG) v tekuté biopsii pacientů s pokročilým karcinomem prostaty. Do této pilotní studie bylo zahrnuto 35 pacientů a z jejich krve byly vyizolovány nukleové kyseliny pocházející jak z cirkulujících nádorových buněk, tak z plazmy. Nejprve byla porovnána exprese studovaných genů z obou zdrojů, tedy CTC a plazmy od jednoho pacienta. Výsledky qPCR byly vyhodnoceny a jako efektivnější metoda pro záchyt exprese zájmových genů

byla vyhodnocena izolace z krevní plazmy. Bettegowda *et al.*, 2014 ve své práci mimo jiné porovnával množství ctDNA a cirkulujících nádorových buněk v krvi stejných pacientů pomocí různých metod. Ve zhruba 80 % případů u téhož pacienta detekovali ctDNA, ale CTC zde nebyly nalezeny. Pouze ve třech případech byly detekovány ctDNA i CTC současně. Vysvětlením by mohlo být, že průměrné množství fragmentů ctDNA v plazmě je více než 50krát vyšší než počet CTC. Ve práci Dawson *et al.* v (2013) zjistili, že ctDNA byla detekována mnohem častěji než CTC. V této studii se jako mnohem efektivnější (> 85 % pacientů) zdála být analýza ctDNA oproti CTC. Důvodem mohla být přítomnost vnějších vlivů, např. nízký počet CTC vyskytujících se v krvi pacientů. S tím souvisí potřeba vyvíjet stále novější a citlivější metody pro jejich záchyt.

V další experimentální části dizertace byla sledována úspěšnost detekce exprese studovaných genů ve vzorcích pacientů z krevní plazmy a posuzovány vztahy jednotlivých zájmových genů s průběhem léčby, přítomností metastáz a úmrtím pacientů. Největší záchyt exprese (téměř 90-100 %) byl pro geny AMACR, CD45, PTEN a TBP.

Silná korelace byla sledována mezi expresí genů TBP a CD45 a také mezi expresí genů AMACR a EpCAM. Podobně silná korelace byla nalezena mezi geny PTEN a TBP. Korelace mezi geny TBP a CD45 může vyplývat z toho, že většina transkriptů nejspíš pochází z leukocytů přítomných v krvi pacienta, ale pro terapii pacienta nemají význam. Rathinavelu *et Levy* (2016) ve své práci uvádějí, že exprese tumor supresorového genu PTEN bývá často u pokročilého karcinomu prostaty snížena nebo potlačena, ale v periferní krvi jsme toto snížení nepozorovali. Protein PTEN může být exprimován i v normálních buňkách včetně leukocytů, což pravděpodobně vysvětluje pozorovanou korelaci.

Zajímavým zjištěním této dizertační práce je, že přítomnost vyšší exprese AMACR má za následek signifikantně kratší dobu užívání ARTA terapie. Nádor prostaty byl u pacientů s vyšší expresí AMACR rychleji progredovaly, což mělo za následek ukončení ARTA terapie a nasazení nové léčby. Také bylo zjištěno, že pacienti s vyšší expresí AMACR vykazovali vyšší úmrtnost než pacienti s nižší expresí tohoto genu. Carnell *et al.* v roce 2013 zveřejnili závěry, že exprese AMACR vzrůstá již brzy při onkogenezi a jeho hladina nadále roste souběžně s progresí tumoru. V jeho studii byla také zmíněna souvislost mezi citlivostí nádoru na terapii androgeny a expresí AMACR. Naznačoval, že inhibice genu AMACR by mohla zvrátit fenotyp některých buněčných linií, které se staly nezávislými na androgenech.

Dále bylo také zjištěno, že vyšší exprese genu EpCAM souvisela s pokročilejším stádiem nemoci v době kastrace, ale ne v době nasazení ARTA terapie. Vyšší exprese EpCAM byla také spojena s přítomností viscerálních metastáz nebo kostních metastáz v době kastrace pacientů. Benko *et al.* provedli v roce 2013 analýzu více než stovky pacientů po radikální prostatektomii kvůli lokalizovanému karcinomu prostaty. Pomocí imunohistochemických metod zjistili, že v nádorové tkáni byla exprese EpCAM několikanásobně vyšší než exprese v benigní tkáni. Vysoká exprese genu byla dále spojena i s horší prognózou a vyšším Gleason skóre a kratší dobou přežití bez biochemického relapsu.

Srdeční glykosidy představují sekundární metabolity rostlin, které se nacházejí v různé míře ve všech jejich částech, kde mají zejména ochrannou úlohu proti škůdcům. Z chemického hlediska se řadí mezi steroidní látky, přičemž nejznámějším a nejlépe prozkoumaným mechanismem jejich bioaktivního působení je inhibice sodno-draselné pumpy, která je spojena s využitím těchto látek jako léčiv srdečních arytmií a srdečního selhání. V poslední době se srdeční glykosidy dostávají do popředí zájmu jako potenciální léčiva nádorových onemocnění (Schneider *et al.*, 2017). V budoucnu by se tyto látky a jejich příbuzné deriváty mohly stát důležitým zdrojem pro vývoj nových protinádorových léčiv, a proto byla tato skupina derivátů odvozených od oleandrigenu vybrána pro studium jejich účinku na buňky karcinomu prostaty.

V této části dizertační práce jsme se zaměřili na studium účinku derivátů odvozených od oleandrigenu na buňky karcinomu prostaty. Experimenty byly prováděny na nádorových prostatických buněčných liniích DU-145 a LNCaP a aktivita testovaných derivátů byla porovnávána s účinky na nenádorovou prostatickou buněčnou linii RWPE-1. Buněčné linie použité v této práci patří mezi jedny z nejčastěji užívaných linií vhodných ke studiu regulace buněčného cyklu, diferenciaci buněk, procesů vedoucích ke vzniku a progresi nádorových onemocnění a k testování účinků léčiv a nových látek. Jejich morfologické, cytogenetické a biochemické vlastnosti jsou dobře charakterizovány (Carroll *et al.*, 1993). Buňky DU-145 představují diferencovaný, agresivní a metastazující typ karcinomu prostaty, jsou odvozeny od metastázy v mozku, jsou androgen necitlivé, tzn. že neexprimují androgenový receptor AR, exprimují pouze slabě estrogenový receptor ER- α , exprimují ER- β , progesteronový receptor PR. Mají mutovaný tumor supresorový gen p53. Buněčná linie LNCaP představuje buněčný model pro dobře diferencované karcinomy prostaty s nízkým metastatickým potenciálem. Je odvozena od metastázy lymfatických uzlin, je citlivá na androgeny, tzn. exprimuje

androgenový receptor, estrogenové receptory α , β a PR. Tato linie má nemutovanou formu p53 (wild type) (Sampson *et al.*, 2013). Buněčná linie RWPE-1 představuje epiteliální buňky, které pocházejí z periferní zóny histologicky normální dospělé lidské prostaty immortalizované lidským papilomavirem 18. V této části práce byl sledován vliv skupiny derivátů odvozených od oleandrigeninů na viabilitu buněk, integritu 3D buněčných sféroidů, buněčný cyklus, apoptózu a expresi jaderných receptorů.

Ze skupiny testovaných derivátů odvozených od oleandrigeninů byla vybrána látka 16 α -acetoxy-14,15 α -epoxy-17 β -(5H-furan-2-on-3-yl)-3 β -methoxy-5 α ,14 α androstan pro zjednodušení označená pod číslem **10**, která snižovala viabilitu obou typů nádorových buněk v závislosti na koncentraci (IC₅₀ 16,8 μ M u buněk DU-145 a 18 μ M u buněk LNCaP), přičemž viabilitu nenádorových buněk RWPE-1 neovlivňovala (IC₅₀ >50 μ M). Některé z testovaných látek vykazovaly výraznou cytotoxicitu, např. látky **1**, **2** (IC₅₀ <0,5). Tento výrazný cytotoxický účinek byl ovšem u těchto látek sledován i u nenádorových buněk RWPE-1. Buňky DU-145 byly ve většině případů na aplikaci testovaných derivátů citlivější než buňky LNCaP. Tyto rozdíly v citlivosti buněk na působení derivátů mohou souviset s rozdílným genetickým základem použitých buněčných linií. Buňky DU-145 obecně rychleji proliferují, mají kratší dobu zdvojnásobení. Na rozdíl od buněk LNCaP, které potřebují až 2 dny, aby se adherovaly a začaly se dělit. Podobná zjištění popisují i práce zaměřené na studium účinku srdečních glykosidů na jiné typy nádorových buněk (Rascón-Valenzuela *et al.*, 2015, Yeh *et al.*, 2003; Winnicka *et al.*, 2006, Xie *et al.*, 2011, Dimas *et al.*, 2014, Diederich *et al.*, 2017, Shen *et al.*, 2020, Varbanov *et al.*, 2017, Kometiani *et al.*, 2005, Bao *et al.*, 2016), Dong *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015, Yu *et al.*, 2008; Zhai *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018, Dimas *et al.*, 2014; Pollard *et al.*, 2019).

V práci Liu *et al.*, (2021) studovali účinek rychle působícího srdečního glykosidu, deslanosidu, který se také používá k léčbě městnavého srdečního selhání a supraventrikulárního tachykardie, na buňky odvozené od karcinomu prostaty. Hodnoty IC₅₀ po 48 hodinovém ovlivnění byly 8410 nM u buněk 22Rv1, 370 nM u buněk PC-3 a 180 nM u buněk DU-145, zatímco u nenádorových buněk RWPE-1 byla 10 μ M. V práci Yeh *et al.* (2003) popsali antiproliferační účinek bufalinu a cinobufaginu na buňky LNCaP, DU-145 a PC-3, přičemž buňky LNCaP byly na aplikaci těchto látek citlivější než zbývající dvě linie.

3D modelové systémy vykazují vlastnosti bližší reálné situaci *in vivo* v porovnání s kultivacemi buněk v monovrstvách (Birgersdotter *et al.*, 2005). V rámci sféroidu

se vytváří gradienty živin, kyslíku a odpadních metabolitů. Přirozenými interakcemi buňky získávají morfologické a jiné buněčné znaky podobné těm v solidních nádorech *in vivo*. Tyto znaky např. zahrnují buněčnou heterogenitu, vnitřní strukturu, mezibuněčné interakce, přirozenou morfologii, komunikaci buněk s extracelulární matrix (ECM), změny v genové expresi a další, přičemž všechny tyto funkce mezi sebou souvisí a vzájemně se ovlivňují (Breslin *et al.*, 2013; Edmondson *et al.*, 2014).

Obecně se 3D buněčné modely kultivují v médiu bez séra se specifickými růstovými faktory za podmínek, které neumožňují buňkám adherovat k povrchu kultivačního plastiku, tím se v systému upřednostňují mezibuněčné interakce a může docházet k přirozené tvorbě agregátů. Nejčastějším typem 3D modelů jsou multicelulární nádorové sféroidy, jejichž zdrojem jsou buněčné linie běžně se vyskytující v laboratořích (Weiswald *et al.*, 2015). Kultivace sféroidů může probíhat ve visící kapce média nebo v povrchově upravených kultivačních nádobách. Technika visící kapky využívá k tvorbě sféroidů povrchového napětí kultivačního media a gravitace (Mehta *et al.*, 2012). Výhodou této metody je vysoká reprodukovatelnost a uniformita velikosti buněčných agregátů, kterou lze ovlivnit počtem vysazených buněk. Metoda je ovšem nepraktická z hlediska manipulace jako je výměna média či ovlivnění testovanými sloučeninami. V této práci byla využita technika povrchově upraveného kultivačního plastu potažením jamek 96-jamkového panelu 1,5% agarózou. Tato metoda umožňuje získat jednoduchým způsobem jeden sféroid stejné velikosti v každé jamce (Langhans, 2018; 2021).

Buněčné sféroidy DU-145 po dobu experimentu (1-7 dní) tvar a velikost výrazně nezměnily. Byly vůči derivátu **10** odolnější i po ovlivnění nejvyšší koncentrací. U buněčných sféroidů LNCaP byl efekt testovaného derivátu výraznější, došlo ke zmenšení a rozpadu sféroidů v závislosti na čase a použité koncentraci. Vliv testovaného derivátu byl pozorován již první den po ovlivnění. Sféroidy nenádorové buněčné linie RWPE-1 nebyly ovlivněny testovanou látkou v daných koncentracích ani časech. Citlivější na aplikaci testované látky byly sféroidy buněk LNCaP, zatímco na základě MTT testu byly na aplikaci derivátu citlivější buňky DU-145 kultivované v monovrstvě.

Trojrozměrné buněčné modely reagují na účinky potenciálních léčiv odlišně než buněčné modely kultivované v monovrstvě, i když jsou oba systémy tvořeny stejnými buňkami. Buněčné sféroidy jsou obecně méně citlivé vůči léčivu. Je to dáno tím, že disponují silnějšími mezibuněčnými kontakty, tím léčivo v rámci sféroidu hůře proniká k buňkám, obsahují neproliferující populaci buněk uvnitř sféroidu, mají

zvýšenou expresí proteinů, které zodpovídají za eflux daného léčiva a další faktory. V práci Wang *et al.* (2016) porovnávali účinek 15 látek ze skupiny bufadienolidů na buňky HCG-27 odvozené od karcinomu žaludku v monovrstvě a ve 3D buněčných sféroidech z HCG-27 buněk. U 8 látek zjistili inhibiční účinky jak u 2D, tak u 3D buněčných modelů, přičemž 3D sféroidy byly vůči účinkům testovaných bufadienolidů více rezistentní. Kyselé vnitřní prostředí sféroidu (pH 6,5-7,2) může mít také nepříznivý vliv na účinek některých protinádorových léčiv, kdy snížené pH může zhoršit vstup do nitra sféroidu a průnik do buněk (Wojtkowiak *et al.*, 2011). Pro další experimenty v rámci 3D buněčných modelů by bylo vhodnější použít komerční tzv. ultra low attachment (ULA) plasty, jejichž povrch (nejčastěji kónický) je potažen blíže nespécifikovaným kovalentně vázaným hydrogelem s neutrálním nábojem.

Na základě zjištění inhibičních účinků testovaného derivátu na viabilitu buněk odvozených od karcinomu prostaty bylo zkoumáno, zda dochází k ovlivnění buněčného cyklu a programované smrti buněk. Byl sledován účinek derivátu v jeho koncentraci IC_{50} stanovené na základě buněčného testu viability po dobu 24 a 48 h. Prostřednictvím analýzy průtokové cytometrie byly po aplikaci derivátu zaznamenány změny distribuce buněk v rámci buněčného cyklu. U buněk DU-145 byla po ovlivnění derivátem zjištěna zástava buněčného cyklu ve fázi G_2/M za současného snížení počtu buněk v G_1 a S fázi cyklu doprovázené poklesem inkorporace bromodeoxyuridinu do proliferaujících buněk nacházejících se v S fázi, zvýšenou expresí inhibitoru cyklin dependentních kináz $p21^{Waf1/Cip1}$ a sníženou expresí p53.

Výsledky průtokové cytometrie ukázaly, že testovaný derivát brání vstupu do fáze S, blokáda buněk v G_1 fázi buněčného cyklu byla zjištěna u buněk LNCaP. Tyto změny průběhu buněčného cyklu byly provázeny poklesem inkorporace bromodeoxyuridinu do proliferaujících buněk nacházejících se v S fázi, zvýšenou expresí inhibitoru cyklin dependentních kináz $p21^{Waf1/Cip1}$. Buněčný cyklus je v kontrolních bodech fází G_1 a G_2 regulován nádorovým supresorem p53. Při poškození DNA reaguje na abnormální signály proliferace a reguluje apoptotickou smrt buněk. U ovlivněných buněk LNCaP testovaným derivátem byla zjištěna indukce p53 v obou časových intervalech.

Výsledky Western blot analýzy přinesly zjištění, že testovaný derivát **10** může u buněk odvozených od karcinomu prostaty navodit apoptotickou buněčnou smrt. U ovlivněných buněk byl pozorován pokles exprese anti-apoptického proteinu Mcl-1, byly detekovány aktivní fragmenty caspázy-3, které vznikly částečným štěpením neaktivní formy pro-caspázy-3, a u buněk LNCaP po 48 h doprovázené i aktivací

caspázy-7. Tyto změny se rovněž projeví zvýšeným zastoupením buněk v subG₁ frakci. Výsledky detekce programované buněčné smrti by bylo pro další studium vhodné doplnit, aby bylo zřejmé, zda je zapojena mitochondriální cesta aktivace dalších kaspáz. V práci Liu *et al.* (2021) zjistili účinek glykosidu, deslanosidu, na nádorové prostatické buňky (22Rv1, PC-3 a DU-145), u kterých byla zjištěna zástava buněčného cyklu v G₂/M fázi doprovázená změnami exprese klíčových regulačních proteinů buněčného cyklu (p21, cyklinu B₁, cyklinu D₁, CDK1) a indukce apoptózy doprovázená změnami exprese apoptotických proteinů (detekce štěpných fragmentů caspázy-3, 9 a PARP). Protinádorové účinky některých srdečních glykosidů mohou být dány aktivací a zapojením MAPK, Wnt, JAK-STAT a PI3/AKT/mTOR signálních drah (Reddy *et al.*, 2019; Hossan *et al.*, 2019; Weng *et al.*, 2020).

Dále byl u buněk karcinomu prostaty studován vliv derivátu na expresi a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony. Výsledky Western blot analýzy prokázaly u buněk LNCaP mírný pokles exprese receptorů AR, PR, ER-β doprovázený poklesem hladiny proteinu kalikreinové rodiny - PSA po aplikaci derivátu **10** v obou časových intervalech. Buněčná linie DU-145 nezávislá na androgenech byla popsána jako AR negativní nebo slabě pozitivní (Culig *et al.*, 1996). V našich experimentech nebyla u buněk DU-145 zaznamenána exprese AR, hladina PSA byla na hranici detekovatelnosti. Imunofluorescenční detekce potvrdila expresi AR v jádře i cytoplazmě kontrolních buněk LNCaP. Ovlivnění buněk testovaným derivátem byla zjištěna výraznější lokalizace AR v jádře buněk. V případě detekce PR byla zjištěna výrazná exprese receptoru převážně v cytoplazmě kontrolních buněk LNCaP. Po ovlivnění derivátem **10** buňky vykazovaly výraznou difúzní jadernou lokalizaci PR. Tyto výsledky mohou poukázat na schopnost derivátů ovlivnit expresi genů, které mají důležitou úlohu v karcinogenezi a proliferaci nádorových buněk prostaty. Některé práce se zabývaly podobností struktury bufalinu a jeho derivátů se steroidními AR antagonisty u nádorových prostatických buněk, tyto deriváty by mohly zvýšit interakce s androgenovými receptory (Gauthier *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2014).

Výzkum nádorových onemocnění dosáhl v posledních letech obrovského pokroku, což napomohlo lépe porozumět příčinám jednotlivých typů nádorů i systematickému návrhu nových protinádorových léčiv, která by mohla mít vyšší účinnost i selektivitu než ta současná. V posledních letech bylo v řadě studií publikováno, že některé z přírodních látek ze skupiny srdečních glykosidů by bylo možné využít při léčbě nádorů (Einbond *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Elbaz *et al.*, 2012;

Pongrakhananon *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2020; Chou *et al.*, 2021; Mi *et al.*, 2022). Bylo popsáno, že některé z těchto látek mají antiproliferační účinky při nízkých nanomolárních koncentracích a do jisté míry vykazují selektivitu pro nádorové buňky, a to díky vazbě na α podjednotku sodno-draselné pumpy. Kromě toho mohou indukovat imunogenní buněčnou smrt a aktivovat imunitní systém nemocného (Menger *et al.*, 2012). Některé látky jako digoxin a digitoxin jsou v klinické praxi používány již dlouhou dobu pro léčbu srdečních onemocnění. Nabízí se nový terapeutický protokol, ve kterém by mohly být tyto látky ze skupiny srdečních glykosidů kombinovány s již používanými protinádorovými léčivy či imunoterapeutiky a významně tak zvýšit dobu přežití pacientů s nádorovým onemocněním. Studium látek srdečních glykosidů a jejich derivátů jako potenciálních léčiv má proto velký význam. Další studie zaměřené na mechanismus účinku těchto derivátů u nádorových a normálních buněk by mohly přispět nejen k objasnění genetických a proteomických změn, ale i k upřesnění regulačních drah zahrnutých do procesu buněčného dělení a programované buněčné smrti u řady onemocnění.

6. Závěr

V této studii bylo zjištěno, že kombinace močových a krevních testů přináší přesnější indikaci biopsie prostaty. Nejlepších výsledků bylo dosaženo kombinací AMACR, PCA3 a % volného PSA, které také identifikovaly nejagresivnější tumory. Tato zjištění je třeba dále ověřit, stejně jako hodnotu transkriptů EpCAM a PSGR. PCA3 byl mírně zvýšen zánětem tkáně, ale bez vlivu na interpretaci močového testu. Silná korelace byla pozorována mezi prostatickými markery (tj. PCA3, AMACR, TRPM8, MSMB a PSGR), zatímco korelace mezi CD45 a housekeeping geny indikovala velký počet leukocytů v moči. Experimenty s ředěním leukocytů a buněk rakoviny prostaty se shodovaly s výsledky získanými z klinických vzorků. V neposlední řadě byly také zjištěny důležité technické podrobnosti o potenciálním zkreslení PCR z důvodu preamplifikace. Procento volného PSA a močové markery odlišují karcinom prostaty od benigní hyperplazie a přispívají k přesnější indikaci biopsie prostaty. Stručně řečeno, naše studie podporuje kombinovanou analýzu močových a krevních testů pro přesnější indikaci biopsie prostaty. Nejlepších výsledků bylo dosaženo kombinací AMACR, PCA3 a % volného PSA. PCA3 byl mírně zvýšen zánětem tkáně, ale bez vlivu na interpretaci močového testu.

Dále byla studována analýza exprese vybraných genů u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty za použití tekuté biopsie. Byla zjištěna klinicky významná data týkající se exprese genů AMACR a EpCAM, jež by v budoucnosti mohla být využita pro predikci odpovědi pacientů s pokročilým karcinomem prostaty na terapii a prognózu tohoto onemocnění. Jako signifikantní a klinicky potenciálně významný se ukázal vztah mezi expresí genu AMACR a dobou užívání ARTA terapie. Nádor prostaty u pacientů s vyšší expresí AMACR byl agresivnější a rychleji progredoval, což vyžadovalo ukončení ARTA terapie a nasazení další léčby. Rovněž vyšší exprese genu AMACR souvisela s vyšší mortalitou pacientů. Vyšší exprese tohoto genu byla spojena s pokročilým stádiem onemocnění v době kastrace. Význam genů EpCAM a AMACR je podpořen jejich vzájemnou korelací.

V poslední době se srdeční glykosidy dostávají do popředí zájmu jako potenciální léčiva nádorových onemocnění. Ze skupiny testovaných derivátů odvozených od oleandrigenu byl vybrán androstanový derivát, který snižoval viabilitu obou typů nádorových buněk v závislosti na koncentraci, ale viabilitu nenádorových prostatických buněk RWPE-1 neovlivňoval. Některé z testovaných látek vykazovaly výraznou

cytotoxicitu, ovšem tento účinek byl sledován i u nenádorových buněk RWPE-1. Buňky DU-145 byly ve většině případů na aplikaci testovaných derivátů citlivější než buňky LNCaP. Trojrozměrné buněčné modely reagovaly na účinky testovaných látek odlišně než buněčné modely kultivované v monovrstvě, i když jsou oba systémy tvořeny stejnými buňkami. Buněčné sféroidy byly obecně méně citlivé vůči testované látce. U buněčných sféroidů linie LNCaP byl efekt testovaného derivátu nejvýraznější, došlo ke zmenšení a rozpadu sféroidů v závislosti na čase a použité koncentraci. Sféroidy nenádorové buněčné linie RWPE-1 nebyly testovanou látkou ovlivněny v daných koncentracích ani časech. Pomocí průtokové cytometrie byly po aplikaci derivátu zaznamenány změny distribuce buněk v rámci buněčného cyklu. U buněk DU-145 byla po ovlivnění derivátem zjištěna zástava buněčného cyklu ve fázi G₂/M za současného snížení počtu buněk v G₁ a S fázi cyklu doprovázené poklesem inkorporace bromodeoxyuridinu do proliferujících buněk nacházejících se v S fázi, změnami exprese klíčových proteinů regulujících buněčný cyklus. U buněk LNCaP bylo zjištěno, že testovaný derivát blokuje buňky v G₁ fázi a brání vstupu buněk do fáze S, rovněž tyto změny byly doprovázené poklesem inkorporace bromodeoxyuridinu do proliferujících buněk v S fázi, zvýšenou expresí p21^{Waf1/Cip1} a p53. Výsledky Western blot analýzy ukázaly, že testovaný derivát může aktivovat apoptotickou buněčnou smrt provázenou poklesem anti-apoptotických proteinů, přítomností aktivních fragmentů caspázy-3 a zvýšeným zastoupením buněk v subG₁ frakci. U hormonálně závislé buněčné linie byly zaznamenány změny v lokalizaci a expresi některých jaderných receptorů pro steroidní hormony po ovlivnění buněk testovaným derivátem. Další studie zaměřené na mechanismus účinku těchto derivátů u nádorových a normálních buněk by mohly přispět nejen k objasnění genetických a proteomických změn, ale i k upřesnění regulačních drah zahrnutých do procesu buněčného dělení a programované buněčné smrti u řady onemocnění.

7. Summary

In this study, it was found that a combination of urine and blood tests provides a more accurate indication of prostate biopsy. The best results were obtained with a combination of AMACR, PCA3 and %free PSA, which also identified the most aggressive tumors. These findings need to be further verified, as well as the value of the EpCAM and PSGR transcripts. PCA3 was slightly increased by tissue inflammation, but had no effect on urine test interpretation. A strong correlation was observed between prostate markers (PCA3, AMACR, TRPM8, MSMB and PSGR), while a correlation between CD45 and housekeeping genes indicated a large number of leukocytes in the urine. Leukocyte and prostate cancer cell dilution experiments were consistent with results obtained from clinical specimens. Last but not least, important technical details about potential PCR bias due to preamplification were also identified. The percentage of free PSA and urinary markers distinguish prostate cancer from benign hyperplasia and contribute to a more accurate indication of prostate biopsy. Our study supports a combined analysis of urine and blood tests for a more accurate indication of prostate biopsy. The best results were obtained with a combination of AMACR, PCA3 and %free PSA. PCA3 was slightly increased by tissue inflammation, but had no effect on urine test interpretation.

Furthermore, the analysis of the expression of selected genes in patients with advanced prostate cancer was studied using liquid biopsy. Clinically relevant data have been identified regarding the expression of the AMACR and EpCAM genes, which could be used in the future to predict the response of patients with advanced prostate cancer to therapy and the prognosis of this disease. The relationship between AMACR gene expression and the duration of ARTA therapy has been shown to be clinically significant. Prostate cancer in patients with higher AMACR expression was more aggressive and progressed more rapidly, requiring discontinuation of ARTA therapy and further treatment. Higher AMACR gene expression was also associated with higher patient mortality. Higher expression of this gene was associated with advanced disease at the time of castration. The importance of the EpCAM and AMACR genes is supported by their correlation.

Recently, cardiac glycosides have come to the forefront of interest as potential drugs for cancer. From the group of tested oleanderigenin derivatives, an androstane derivative was selected, which reduced the viability of both types of tumor cells in

a concentration-dependent manner, but did not affect the viability of non-tumor prostate cells RWPE-1. Some of the tested substances showed significant cytotoxicity, but this effect was also observed in non-tumor RWPE-1 cells. DU-145 cells were in most cases more sensitive than LNCaP cells to the application of the tested derivatives. Three-dimensional cell models responded to the effects of test substances differently than cell models cultured in a monolayer, even though both systems are composed of the same cells. Cell spheroids were generally less sensitive to the test substance. In the cell spheroids of the LNCaP line, the effect of the tested derivative was most pronounced, the spheroids decreased and disintegrated depending on the time and the concentration used. The spheroids of the non-tumor cell line RWPE-1 were not affected by the test substance at the given concentrations or times. Changes in cell distribution within the cell cycle were observed by flow cytometry after application of the derivative. In DU-145 cells, G₂/M cell cycle arrest was observed after derivative treatment, with a concomitant decrease in G₁ and S phase cells, accompanied by a decrease in bromodeoxyuridine incorporation into S phase proliferating cells by changes in the expression of key cell cycle regulating proteins. In LNCaP cells, the tested derivative was found to block G₁ phase cells and prevent cells from entering S phase, also these changes were accompanied by a decrease in bromodeoxyuridine incorporation into proliferating S phase cells, increased expression of p21^{Waf1/Cip1} and p53. The results of western blot analysis showed that the tested derivative can activate apoptotic cell death accompanied by a decrease in anti-apoptotic proteins, the presence of active caspase-3 fragments and an increased proportion of cells in the subG₁ fraction. In a hormone-dependent cell line, changes in the localization and expression of some nuclear receptors for steroid hormones have been observed after treatment of the cells with the test derivative. Further studies on the mechanism of action of these derivatives in tumor and normal cells could help not only to elucidate genetic and proteomic changes, but also to clarify the regulatory pathways involved in the process of cell division and programmed cell death in many diseases.

8. Seznam použitých zkratk

ACTH	adrenocorticotropic hormone
ADT	androgen deprivation therapy
AMACR	alpha-methylacyl-CoA racemase
AR	androgen receptor
ARTA	androgen receptor targeted agents
AR-V7	androgen receptor splice variant 7
AUC	area under curve
BHQ1	black hole quencher 1
BPE	bovine pituitary extract
BPH	benign prostatic hyperplasia
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
CaP	prostate cancer
CD45	lymphocyte common antigen
CDK	cyclin dependent kinases
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cfDNA	cell-free DNA
CRPC	castration-resistant prostate cancer
Ct	cycle threshold
CTC	circulating tumor cells
ctDNA	circulating tumor DNA
DBD	DNA-binding domain
DHT	dihydrotestosterone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DRE	digital rectal examination

DTC	disseminated tumor cells
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	epithelial–mesenchymal transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ERG	ETS-related gene
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FAM	fluorescein amidite
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food nad drug administration
FISH	fluorescent in situ hybridizace
FSH	follicle stimulating hormone
GS	Gleason score
<i>hERG</i>	human ether-à-go-go related gene
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRE	hormone response element
HSP	heat shock protein
IGF	insulin-like growth factor
KLK3	kallikrein related peptidase 3
LBD	ligand binding domain
LDH	lactate dehydrogenase
LH	luteinizing hormone
LHRH	LH-releasing hormone
MGB	minor groove binder
MKI67	marker of proliferation Ki67
MSMB	beta-microseminoprotein
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MVB	multivesicular bodies
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
NLS	nuclear localization signal
NMR	nuclear magnetic resonance
NTD	N-terminal domain
OR	odds ratio
OR51E2	olfactory receptor 51E2
PA2G4	proliferation associated protein 2G4
PBS	phosphate buffered saline
PCA3	prostate cancer antigen 3
PCR	polymerase chain reaction
PHI	prostate health index
PIA	proliferative inflammatory atrophy
PIN	prostatic intraepithelial neoplasia
PSA	prostate specific antigen
PSGR	prostate-specific G-protein coupled receptor
PSMA	prostate specific membrane antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type C
Ras/MAPK	Rat sarcoma protein/mitogen activated protein kinase
RHOA	Ras homolog gene family member A
RNA	ribonucleic acid
ROC	receiver-operating characteristic
RPM	rotation per minute
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SFM	serum-free medium

SHGB	sex hormone-binding globulin
TBP	TATA binding protein
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
NF-κB	nuclear factor kappa B
TNM	tumor, node, metastasis
TRPM8	transient receptor potential cation channel subfamily M member 8
TRUS	transrectal ultrasound
UPL	universal probe library

9. Původní vědecké publikace uveřejněné v časopise s IF

1. Hofmanová J, Slavík J, Ciganek M, Ovesná P, Tylichová Z, Karasová M, Zapletal O, Straková N, Procházková J, Bouchal J, Kolář Z, Ehrmann J, Levková M, **Hušková Z**, Skalický P, Kozubík A, Machala M, Vondráček J. Complex Alterations of Fatty Acid Metabolism and Phospholipidome Uncovered in Isolated Colon Cancer Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 22;22(13):6650. IF 5,924
2. Procházková J, Slavík J, Bouchal J, Levková M, **Hušková Z**, Ehrmann J, Ovesná P, Kolář Z, Skalický P, Straková N, Zapletal O, Kozubík A, Hofmanová J, Vondráček J, Machala M. Specific alterations of sphingolipid metabolism identified in EpCAM-positive cells isolated from human colon tumors. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020 Sep;1865(9):158742. IF 4,402
3. **Huskova Z**, Knillova J, Kolar Z, Vrbkova J, Kral M, Bouchal J. The Percentage of Free PSA and Urinary Markers Distinguish Prostate Cancer from Benign Hyperplasia and Contribute to a More Accurate Indication for Prostate Biopsy. *Biomedicines.* 2020 Jun 25;8(6):173. IF 4,717
4. **Huskova Z**, Steigerova J, Oklestkova J, Rarova L, Kolar Z, Strnad M. Molecular mechanisms of plant steroids and study of their interaction with nuclear receptors in prostate cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2020 Mar;137:111164. IF 4,679
5. Cizkova K, Birke P, Malohlava J, Tauber Z, **Huskova Z**, Ehrmann J. HT-29 and Caco2 Cell Lines Are Suitable Models for Studying the Role of Arachidonic Acid-Metabolizing Enzymes in Intestinal Cell Differentiation. *Cells Tissues Organs.* 2019;208(1-2):37-47. IF 1,333
6. Jorda R, Navrátilová J, **Hušková Z**, Schütznerová E, Cankař P, Strnad M, Kryštof V. Arylazopyrazole AAP1742 inhibits CDKs and induces apoptosis in multiple myeloma cells via Mcl-1 downregulation. *Chem Biol Drug Des.* 2014 Oct;84(4):402-8. IF 2,256

Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

1. Poster: *Inflammation slightly increase PCA3 which does not affect its contribution to the refinement of prostate biopsy decision making in combination with percentage of free PSA, AMACR, EpCAM and PSGR*, **Hušková Z.**, Knillová J., Král M., Kolář Z., Bouchal J. 31st European Congress of Pathology, konané 7.-11.09.2020 v Nice ve Francii.
2. Poster: *Assessment of inflammation, percentage free PSA and urinary transcripts in decision-making for the prostate biopsy*, **Hušková Z.**, Knillová J., Král M., Kolář Z., Bouchal J. Dni molekulovej patológie, konané 23.-24.5.2019 v Martině.
3. Poster: *Assesment of percentage free PSA and urinary transcripts in decision-making for the prostate biopsy*, **Hušková Z.**, Knillová J., Král M., Kolář Z., Bouchal J. 25th Meeting of the EAU section of urological research (ESUR18), konané 4.-6.10.2018 v Athénách v Řecku.
4. Přednáška: *PSA index a močové markery rozlišují karcinom prostaty od benigní hyperplazie a přispívají ke zpřesnění indikace biopsie prostaty*, **Hušková Z.** Meeting mladých vědců, konaný 21.-22.6.2018 v Olomouci.
5. Poster: *Společné hodnocení procenta volného PSA a močových transkriptů přispívá ke zpřesnění indikace biopsie prostaty*, **Hušková Z.**, Knillová J., Král M., Kolář Z., Bouchal J. Dny molekulární patologie, konané 14.-15.6.2018 v Olomouci.
6. Přednáška: *Společné hodnocení procenta volného PSA a močových transkriptů přispívá ke zpřesnění indikace biopsie prostaty*, **Hušková Z.** Brněnské onkologické dny, konané 16.-18.5.2018 v Brně.

10. Seznam použité literatury

Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am*. 2016 Aug;43(3):279-88. doi: 10.1016/j.ucl.2016.04.012. PMID: 27476121; PMCID: PMC4968575.

Ahmed HU, El-Shater Bosaily A, Brown LC, Gabe R, Kaplan R, Parmar MK, Collaco-Moraes Y, Ward K, Hindley RG, Freeman A, Kirkham AP, Oldroyd R, Parker C, Emberton M; PROMIS study group. Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *Lancet*. 2017 Feb 25;389(10071):815-822. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32401-1. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28110982.

Andersson D, Akrap N, Svec D, Godfrey TE, Kubista M, Landberg G, Ståhlberg A. Properties of targeted preamplification in DNA and cDNA quantification. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(8):1085-100. doi: 10.1586/14737159.2015.1057124. Epub 2015 Jul 1. PMID: 26132215; PMCID: PMC4673511.

Andriole G, Bruchofsky N, Chung LW, Matsumoto AM, Rittmaster R, Roehrborn C, Russell D, Tindall D. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 2004 Oct;172(4 Pt 1):1399-403. doi: 10.1097/01.ju.0000139539.94828.29. PMID: 15371854.

Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, De Marzo AM, Isaacs JT, Isaacs WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2014 Sep 11;371(11):1028-38. doi: 10.1056/NEJMoa1315815. Epub 2014 Sep 3. PMID: 25184630; PMCID: PMC4201502.

Auprich M, Augustin H, Budäus L, Kluth L, Mannweiler S, Shariat SF, Fisch M, Graefen M, Pummer K, Chun FK. A comparative performance analysis of total prostate-specific antigen, percentage free prostate-specific antigen, prostate-specific antigen velocity and urinary prostate cancer gene 3 in the first, second and third repeat prostate biopsy. *BJU Int*. 2012 Jun;109(11):1627-35. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10584.x. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21939492.

Aus, G, Abbou CC, Pacik D, Schmid H-P, Van Poppel H, Wolff JM, Zattoni AF. Guidelines Eau pro diagnostiku a Terapii Karcinomu Prostaty. *Urologické listy [online]*. 2003(1), 32-69 [cit. 2018-03-19].

Balík M, Broďák M. Lokalizovaný karcinom prostaty – diagnostika a léčba. *Urol. Praxi*. 2011;12(2):105-110.

Bao Z, Tian B, Wang X, Feng H, Liang Y, Chen Z, Li W, Shen H, Ying S. Oleandrin induces DNA damage responses in cancer cells by suppressing the expression of Rad51. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):59572-59579. doi: 10.18632/oncotarget.10726. PMID: 27449097; PMCID: PMC5312332.

Barata PC, Sartor AO. Metastatic castration-sensitive prostate cancer: Abiraterone, docetaxel, or... *Cancer*. 2019 Jun 1;125(11):1777-1788. doi: 10.1002/cncr.32039. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30933324.

Barchánková L, Magdolenová A, Hájek M. 3D buněčné sféroidy jako modely solidních nádorů. *Bioprospect* 2019 Feb, 29:35-38.

Bejček J, Spiwok V, Kmoníčková E, Ruml T, Rimpelová S. Kardioglykosidy: terapeutický potenciál pro léčbu nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2021;115,4-12.

Benko G, Spajić B, Krušlin B, Tomas D. Impact of the EpCAM expression on biochemical recurrence-free survival in clinically localized prostate cancer. *Urol Oncol*. 2013 May;31(4):468-74. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.03.007. Epub 2011 Apr 21. PMID: 21514185.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094. PMID: 24553385; PMCID: PMC4017867.

Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro-- a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol*. 2005 Oct;15(5):405-12. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.06.009. PMID: 16055341.

Boyukozer FB, Tanoglu EG, Ozen M, Ittmann M, Aslan ES. Kallikrein gene family as biomarkers for recurrent prostate cancer. *Croat Med J*. 2020 Oct 31;61(5):450-456. doi: 10.3325/cmj.2020.61.450. PMID: 33150763; PMCID: PMC7684543.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.

Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013 Mar;18(5-6):240-9. doi: 10.1016/j.drudis.2012.10.003. Epub 2012 Oct 13. PMID: 23073387.

Cao C, Wang Q, Li Q, Zhao Q, Wang JQ, Liu Y. Development and Preliminary Clinical Application of Circulating Tumor Cell Detection System for Prostate Cancer. *J Biomed Nanotechnol*. 2019 Mar 1;15(3):612-620. doi: 10.1166/jbn.2019.2706. PMID: 31165705.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987 Feb 15;47(4):936-42. PMID: 3802100.

Carnell AJ, Kirk R, Smith M, McKenna S, Lian LY, Gibson R. Inhibition of human α -methylacyl CoA racemase (AMACR): a target for prostate cancer. *ChemMedChem*. 2013 Oct;8(10):1643-7. doi: 10.1002/cmdc.201300179. Epub 2013 Aug 8. PMID: 23929631.

Carroll AG, Voeller HJ, Sugars L, Gelmann EP. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate*. 1993;23(2):123-34. doi: 10.1002/pros.2990230206. PMID: 8104329.

Cucchiara V, Cooperberg MR, Dall'Era M, Lin DW, Montorsi F, Schalken JA, Evans CP. Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making. *Eur Urol*. 2018 Apr;73(4):572-582. doi: 10.1016/j.eururo.2017.10.036. Epub 2017 Nov 10. PMID: 29129398.

Culig Z, Stober J, Gast A, Peterziel H, Hobisch A, Radmayr C, Hittmair A, Bartsch G, Cato AC, Klocker H. Activation of two mutant androgen receptors from human prostatic carcinoma by adrenal androgens and metabolic derivatives of testosterone. *Cancer Detect Prev*. 1996;20(1):68-75. PMID: 8907206.

Dasgupta A, Trejo O. Suppression of total digoxin concentrations by digoxin-like immunoreactive substances in the MEIA digoxin assay. Elimination of negative interference by monitoring free digoxin concentrations. *Am J Clin Pathol*. 1999 Mar;111(3):406-10. doi: 10.1093/ajcp/111.3.406. PMID: 10078117.

Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forsheo T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2013 Mar 28;368(13):1199-209. doi: 10.1056/NEJMoa1213261. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23484797.

De Luca S, Passera R, Fiori C, Bollito E, Cappia S, Mario Scarpa R, Sottile A, Franco Randone D, Porpiglia F. Prostate health index and prostate cancer gene 3 score but not percent-free Prostate Specific Antigen have a predictive role in differentiating histological prostatitis from PCa and other nonneoplastic lesions (BPH and HG-PIN) at repeat biopsy. *Urol Oncol*. 2015 Oct;33(10):424.e17-23. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.05.032. Epub 2015 Jul 7. PMID: 26162485.

De Luca S, Passera R, Milillo A, Coda R, Randone DF. Histological chronic prostatitis and high-grade prostate intra-epithelial neoplasia do not influence urinary prostate cancer gene 3 score. *BJU Int*. 2012 Dec;110(11 Pt B):E778-82. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11645.x. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23116408.

Deras IL, Aubin SM, Blase A, Day JR, Koo S, Partin AW, Ellis WJ, Marks LS, Fradet Y, Rittenhouse H, Groskopf J. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *J Urol*. 2008 Apr;179(4):1587-92. doi: 10.1016/j.juro.2007.11.038. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18295257.

Diederich M, Muller F, Cerella C. Cardiac glycosides: From molecular targets to immunogenic cell death. *Biochem Pharmacol*. 2017 Feb 1;125:1-11. doi: 10.1016/j.bcp.2016.08.017. Epub 2016 Aug 20. PMID: 27553475.

Dimas K, Papadopoulou N, Baskakis C, Prousis KC, Tsakos M, Alkahtani S, Honisch S, Lang F, Calogeropoulou T, Alevizopoulos K, Stournaras C. Steroidal cardiac Na⁺/K⁺ ATPase inhibitors exhibit strong anti-cancer potential in vitro and in prostate and lung cancer xenografts in vivo. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014 Jun;14(5):762-70. doi: 10.2174/18715206113136660338. PMID: 24066843.

DiPaola RS, Aisner J. Overcoming bcl-2- and p53-mediated resistance in prostate cancer. *Semin Oncol.* 1999 Feb;26(1 Suppl 2):112-6. PMID: 10190792.

Dong Y, Yin S, Li J, Jiang C, Ye M, Hu H. Bufadienolide compounds sensitize human breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of STAT3/Mcl-1 pathway. *Apoptosis.* 2011 Apr;16(4):394-403. doi: 10.1007/s10495-011-0573-5. PMID: 21259053.

dos Santos JC, Weber LP, Perez LR. Evaluation of urinalysis parameters to predict urinary-tract infection. *Braz J Infect Dis.* 2007 Oct;11(5):479-81. doi: 10.1590/s1413-86702007000500008. PMID: 17962874.

Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol.* 2014 May;12(4):207-18. doi: 10.1089/adt.2014.573. PMID: 24831787; PMCID: PMC4026212.

Einbond LS, Wu HA, Su T, Chang T, Panjikaran M, Wang X, Goldsberry S. Digitoxin activates EGR1 and synergizes with paclitaxel on human breast cancer cells. *J Carcinog.* 2010 Nov 18;9:10. doi: 10.4103/1477-3163.72578. PMID: 21139994; PMCID: PMC2997271.

Elbaz HA, Stueckle TA, Wang HY, O'Doherty GA, Lowry DT, Sargent LM, Wang L, Dinu CZ, Rojanasakul Y. Digitoxin and a synthetic monosaccharide analog inhibit cell viability in lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012 Jan 1;258(1):51-60. doi: 10.1016/j.taap.2011.10.007. Epub 2011 Oct 18. PMID: 22037315; PMCID: PMC3254807.

Esfahani M, Ataei N, Panjehpour M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(7):2601-11. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.7.2601. PMID: 25854335.

Fernandez-Serra A, Casanova-Salas I, Rubio L, Calatrava A, García-Flores M, García-Casado Z, López-Guerrero JA, Rubio-Briones J. Actualización en el diagnóstico del CaP en orina. Papel actual de los marcadores urinarios [Update on the diagnosis of PCa in urine. The current role of urine markers]. *Arch Esp Urol.* 2015 Apr;68(3):240-9. Spanish. PMID: 25948797.

Frame FM, Maitland NJ. Cancer stem cells, models of study and implications of therapy resistance mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2011;720:105-18. doi: 10.1007/978-1-4614-0254-1_9. PMID: 21901622.

Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell.* 2011 Nov 23;147(5):992-1009. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.016. PMID: 22118458.

Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jul;10(7):445-57. doi: 10.1038/nrm2720. PMID: 19546857.

Fuentes AV, Pineda MD, Venkata KCN. Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice. *Pharmacy (Basel).* 2018 May 14;6(2):43. doi: 10.3390/pharmacy6020043. PMID: 29757930; PMCID: PMC6025009.

Fujita K, Landis P, McNeil BK, Pavlovich CP. Serial prostate biopsies are associated with an increased risk of erectile dysfunction in men with prostate cancer on active surveillance. *J Urol*. 2009 Dec;182(6):2664-9. doi: 10.1016/j.juro.2009.08.044. PMID: 19836757.

Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health*. 2019 Sep;37(3):288-295. doi: 10.5534/wjmh.180040. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30209899; PMCID: PMC6704300.

Fujita K, Nonomura N. Urinary biomarkers of prostate cancer. *Int J Urol*. 2018 Sep;25(9):770-779. doi: 10.1111/iju.13734. Epub 2018 Aug 21. PMID: 30129068.

Fujita K, Pavlovich CP, Netto GJ, Konishi Y, Isaacs WB, Ali S, De Marzo A, Meeker AK. Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence cytology. *Hum Pathol*. 2009 Jul;40(7):924-33. doi: 10.1016/j.humpath.2009.01.004. Epub 2009 Apr 14. PMID: 19368959; PMCID: PMC2757169.

Gardner DG, 2011. Greenspan's basic & clinical endocrinology. 9th edition, New York: The McGraw-Hill ISBN 13: 978-0- 07-178497-9.

Gauthier S, Martel C, Labrie F. Steroid derivatives as pure antagonists of the androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012 Oct;132(1-2):93-104. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.02.006. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22449547.

Gusdon JP Jr, Buckalew VM Jr, Hennessy JF. A digoxin-like immunoreactive substance in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1984 Sep 1;150(1):83-5. doi: 10.1016/s0002-9378(84)80114-3. PMID: 6540989.

Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27832-7. doi: 10.1074/jbc.M002951200. PMID: 10874030.

Haberkorn U, Eder M, Kopka K, Babich JW, Eisenhut M. New Strategies in Prostate Cancer: Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Ligands for Diagnosis and Therapy. *Clin Cancer Res*. 2016 Jan 1;22(1):9-15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0820. PMID: 26728408.

Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 15;88(14):6259-63. doi: 10.1073/pnas.88.14.6259. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Nov 1;88(21):9907. PMID: 1648735; PMCID: PMC52062.

Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J, Mason MD. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2007 May;8(5):411-9. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70136-5. PMID: 17466898.

Haux J, Klepp O, Spigset O, Tretli S. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. *BMC Cancer*. 2001;1:11. doi: 10.1186/1471-2407-1-11. Epub 2001 Aug 10. PMID: 11532201; PMCID: PMC48150.

Haux J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med Hypotheses*. 1999 Dec;53(6):543-8. doi: 10.1054/mehy.1999.0985. PMID: 10687899.

Hendriks RJ, van der Leest MMG, Dijkstra S, Barentsz JO, Van Criekinge W, Hulsbergen-van de Kaa CA, Schalken JA, Mulders PFA, van Oort IM. A urinary biomarker-based risk score correlates with multiparametric MRI for prostate cancer detection. *Prostate*. 2017 Oct;77(14):1401-1407. doi: 10.1002/pros.23401. Epub 2017 Aug 29. PMID: 28853167.

Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 2003 Jul;44(1):8-15; discussion 15-6. doi: 10.1016/s0302-2838(03)00201-x. PMID: 12814669.

Hessels D, Schalken JA. Urinary biomarkers for prostate cancer: a review. *Asian J Androl*. 2013 May;15(3):333-9. doi: 10.1038/aja.2013.6. Epub 2013 Mar 25. PMID: 23524531; PMCID: PMC3739649.

Hossan MS, Chan ZY, Collins HM, Shipton FN, Butler MS, Rahmatullah M, Lee JB, Gershkovich P, Kagan L, Khoo TJ, Wiart C, Bradshaw TD. Cardiac glycoside cerberin exerts anticancer activity through PI3K/AKT/mTOR signal transduction inhibition. *Cancer Lett*. 2019 Jul 1;453:57-73. doi: 10.1016/j.canlet.2019.03.034. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30930233.

Hradil D, Študent V jr., Král M, Študent V. Diagnostika a staging karcinomu prostaty. *Onkologie*. 2014;8(1):15-18.

Chan SW, Nguyen PN, Violette P, Brimo F, Taguchi Y, Aprikian A, Chen JZ. Early detection of clinically significant prostate cancer at diagnosis: a prospective study using a novel panel of TMPRSS2:ETS fusion gene markers. *Cancer Med*. 2013 Feb;2(1):63-75. doi: 10.1002/cam4.49. Epub 2013 Feb 3. PMID: 24133629; PMCID: PMC3797559.

Chen W, Delongchamps NB, Mao K, Beuvon F, Peyromaure M, Liu Z, Dinh-Xuan AT. High RhoA expression at the tumor front in clinically localized prostate cancer and association with poor tumor differentiation. *Oncol Lett*. 2016 Feb;11(2):1375-1381. doi: 10.3892/ol.2015.4070. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26893746; PMCID: PMC4734255.

Cheng L, Montironi R, Bostwick DG, Lopez-Beltran A, Berney DM. Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):87-117. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04025.x. PMID: 22212080.

Chou JC, Li JH, Chen CC, Chen CW, Lin H, Wang PS. Inhibitory Effects of Digoxin and Digitoxin on Cell Growth in Human Ovarian Cancer Cell Line SKOV-3. *Integr Cancer Ther*. 2021 Jan-Dec;20:15347354211002662. doi: 10.1177/15347354211002662. PMID: 33736483; PMCID: PMC7983234.

Ishida J, Konishi M, Ebner N, Springer J. Repurposing of approved cardiovascular drugs. *J Transl Med*. 2016 Sep 20;14:269. doi: 10.1186/s12967-016-1031-5. PMID: 27646033; PMCID: PMC5029061.

Jamaspishvili T, Kral M, Khomeriki I, Vyhnankova V, Mgebrishvili G, Student V, Kolar Z, Bouchal J. Quadriplex model enhances urine-based detection of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2011 Dec;14(4):354-60. doi: 10.1038/pcan.2011.32. Epub 2011 Jul 26. PMID: 21788966.

Joose SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2015 Jan;7(1):1-11. doi: 10.15252/emmm.201303698. PMID: 25398926; PMCID: PMC4309663.

Kaplan SA, Roehrborn CG, Abrams P, Chapple CR, Bavendam T, Guan Z. Antimuscarinics for treatment of storage lower urinary tract symptoms in men: a systematic review. *Int J Clin Pract.* 2011 Apr;65(4):487-507. doi: 10.1111/j.1742-1241.2010.02611.x. Epub 2011 Jan 7. PMID: 21210910.

Kapoor A, Cai H, Forman M, He R, Shamay M, Arav-Boger R. Human cytomegalovirus inhibition by cardiac glycosides: evidence for involvement of the HERG gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep;56(9):4891-9. doi: 10.1128/AAC.00898-12. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22777050; PMCID: PMC3421849.

Katolická J, Hormonální léčba karcinomu prostaty. *Onkologie* 2014;8(5):228–230.

Kearns JT, Lin DW. Improving the Specificity of PSA Screening with Serum and Urine Markers. *Curr Urol Rep.* 2018 Aug 13;19(10):80. doi: 10.1007/s11934-018-0828-6. PMID: 30105509.

Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2019 Oct;19(10):553-567. doi: 10.1038/s41568-019-0180-2. Epub 2019 Aug 27. PMID: 31455893.

Ko YS, Rugira T, Jin H, Park SW, Kim HJ. Oleandrin and Its Derivative Odoroside A, Both Cardiac Glycosides, Exhibit Anticancer Effects by Inhibiting Invasion via Suppressing the STAT-3 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 26;19(11):3350. doi: 10.3390/ijms19113350. PMID: 30373171; PMCID: PMC6274837.

Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2005 Mar;67(3):929-36. doi: 10.1124/mol.104.007302. Epub 2004 Dec 15. PMID: 15602003.

Korenková V, Scott J, Novosadová V, Jindřichová M, Langerová L, Švec D, Šídová M, Sjöback R. Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment. *BMC Mol Biol.* 2015 Mar 11;16:5. doi: 10.1186/s12867-015-0033-9. PMID: 25888347; PMCID: PMC4365555.

Kral M, Grepl M, Hruska F, Hradil D, Rajmon P, Student V, Knillova J, Bouchal J. Effect of prostatic tissue inflammation on prostate cancer markers in urine. *Eur. Urol. Suppl.* 2015;14:e1285.

Král M, Vyhnánková V, Študent V, Bouchal J. Genetické riziko karcinomu prostaty. *Česká Urologie.* 2010;14(3):139-147.

Kroneis T, Jonasson E, Andersson D, Dolatabadi S, Ståhlberg A. Global preamplification simplifies targeted mRNA quantification. *Sci Rep.* 2017 Mar 23;7:45219. doi: 10.1038/srep45219. PMID: 28332609; PMCID: PMC5362892.

Kubackzová V, Sedlarikova L, Bollová B, Sandecká V, Stork M, Pour L, Sevcikova S. Liquid Biopsies - the Clinics and the Molecules. *Klin Onkol.* 2017 Summer;30(Supplementum2):13-20. English. doi: 10.14735/amko20172S13. PMID: 28903565.

Kucerova R, Bienova M, Kral M, Bouchal J, Trtkova KS, Burdova A, Student V, Kolar Z. Androgenetic alopecia and polymorphism of the androgen receptor gene (SNP rs6152) in patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2015 Jan;29(1):91-6. doi: 10.1111/jdv.12468. Epub 2014 Mar 25. PMID: 24665929.

Kumar A, De T, Mishra A, Mishra AK. Oleandrin: A cardiac glycosides with potent cytotoxicity. *Pharmacogn Rev*. 2013 Jul;7(14):131-9. doi: 10.4103/0973-7847.120512. Retraction in: *Pharmacogn Rev*. 2016 Jul-Dec;10 (20):147. PMID: 24347921; PMCID: PMC3841991.

Kurapati KR, Atluri VS, Samikkannu T, Garcia G, Nair MP. Natural Products as Anti-HIV Agents and Role in HIV-Associated Neurocognitive Disorders (HAND): A Brief Overview. *Front Microbiol*. 2016 Jan 12;6:1444. doi: 10.3389/fmicb.2015.01444. PMID: 26793166; PMCID: PMC4709506.

Langhans SA. Three-Dimensional *in Vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol*. 2018 Jan 23;9:6. doi: 10.3389/fphar.2018.00006. PMID: 29410625; PMCID: PMC5787088.

Langhans SA. Using 3D *in vitro* cell culture models in anti-cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2021 Aug;16(8):841-850. doi: 10.1080/17460441.2021.1912731. Epub 2021 Apr 26. PMID: 33823728.

Laursen M, Gregersen JL, Yatime L, Nissen P, Fedosova NU. Structures and characterization of digoxin- and bufalin-bound Na⁺,K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 10;112(6):1755-60. doi: 10.1073/pnas.1422997112. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25624492; PMCID: PMC4330780.

Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, Lonigro RJ, Tsodikov A, Wei JT, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):645-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3224. PMID: 18245462; PMCID: PMC2998181.

Lei Y, Gan H, Huang Y, Chen Y, Chen L, Shan A, Zhao H, Wu M, Li X, Ma Q, Wang J, Zhang E, Zhang J, Li Y, Xue F, Deng L. Digitoxin inhibits proliferation of multidrug-resistant HepG2 cells through G₂/M cell cycle arrest and apoptosis. *Oncol Lett*. 2020 Oct;20(4):71. doi: 10.3892/ol.2020.11932. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32863904; PMCID: PMC7436926.

Leyten GH, Hessels D, Jannink SA, Smit FP, de Jong H, Cornel EB, de Reijke TM, Vergunst H, Kil P, Knipscheer BC, van Oort IM, Mulders PF, Hulsbergen-van de Kaa CA, Schalken JA. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol*. 2014 Mar;65(3):534-42. doi: 10.1016/j.eururo.2012.11.014. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23201468.

Lichtstein D, Steinitz M, Gati I, Samuelov S, Deutsch J, Orly J. Biosynthesis of digitalis-like compounds in rat adrenal cells: hydroxycholesterol as possible precursor. *Life Sci*. 1998;62(23):2109-26. doi: 10.1016/s0024-3205(98)00186-6. PMID: 9627090.

Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017 Jun 27;317(24):2532-2542. doi: 10.1001/jama.2017.7248. PMID: 28655021.

Liu M, Huang Q, A J, Li L, Li X, Zhang Z, Dong JT. The Cardiac Glycoside Deslanoside Exerts Anticancer Activity in Prostate Cancer Cells by Modulating Multiple Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 19;13(22):5809. doi: 10.3390/cancers13225809. PMID: 34830961; PMCID: PMC8616045.

Liu T, Brown DA, O'Rourke B. Role of mitochondrial dysfunction in cardiac glycoside toxicity. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Nov;49(5):728-36. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.06.012. Epub 2010 Jul 8. PMID: 20620145; PMCID: PMC2949492.

Liu X, Wu Q, Li L. Functional and therapeutic significance of EZH2 in urological cancers. *Oncotarget*. 2017 Jun 6;8(23):38044-38055. doi: 10.18632/oncotarget.16765. PMID: 28410242; PMCID: PMC5514970.

Liu Z, Wu H, Wei Z, Wang X, Shen P, Wang S, Wang A, Chen W, Lu Y. TRPM8: a potential target for cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Sep;142(9):1871-81. doi: 10.1007/s00432-015-2112-1. Epub 2016 Jan 23. PMID: 26803314.

López-Lázaro M, Palma De La Peña N, Pastor N, Martín-Cordero C, Navarro E, Cortés F, Ayuso MJ, Toro MV. Anti-tumour activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *heywoodii*. *Planta Med*. 2003 Aug;69(8):701-4. doi: 10.1055/s-2003-42789. PMID: 14531018.

López-Lázaro M, Pastor N, Azrak SS, Ayuso MJ, Austin CA, Cortés F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *J Nat Prod*. 2005 Nov;68(11):1642-5. doi: 10.1021/np050226l. PMID: 16309315.

López-Lázaro M. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Aug;11(8):1043-53. doi: 10.1517/14728222.11.8.1043. PMID: 17665977.

Lukeš M, Záleský M, Zachoval R, Heráček J, Sachová J, Urban M. Nové trendy v chirurgické léčbě benigní hyperplazie prostaty - méně invazivní postupy. *Urologie pro praxi*. 2006;2:56-59.

Magpusao AN, Omolloh G, Johnson J, Gascón J, Peczuh MW, Fenteany G. Cardiac glycoside activities link Na(+)/K(+) ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR. *ACS Chem Biol*. 2015 Feb 20;10(2):561-9. doi: 10.1021/cb500665r. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25334087; PMCID: PMC4340362.

Maitland NJ, Stem Cells in the Normal and Malignant Prostate, in: D.J. Tindall (Ed.), *Prostate Cancer — Biochemistry, Molecular Biology and Genetics*, Springer, New York 2013, pp. 3–41.

Manna SK, Sah NK, Newman RA, Cisneros A, Aggarwal BB. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res*. 2000 Jul 15;60(14):3838-47. PMID: 10919658.

Marberger M, Roehrborn CG, Marks LS, Wilson T, Rittmaster RS. Relationship among serum testosterone, sexual function, and response to treatment in men receiving dutasteride for benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Apr;91(4):1323-8. doi: 10.1210/jc.2005-1947. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16434455.

Matoušková M. Farmakoterapie karcinomu prostaty. *Remedia*. 2006;16(1):84-90.

Matoušková M. Zhoubné nádory prostaty. *Vesmír*. 2004;83:263-267.

McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res*. 2000 Jul 15;60(14):3807-12. PMID: 10919654.

McKiernan J, Donovan MJ, Margolis E, Partin A, Carter B, Brown G, Torkler P, Noerholm M, Skog J, Shore N, Andriole G, Thompson I, Carroll P. A Prospective Adaptive Utility Trial to Validate Performance of a Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer in Patients with Prostate-specific Antigen 2-10ng/ml at Initial Biopsy. *Eur Urol*. 2018 Dec;74(6):731-738. doi: 10.1016/j.eururo.2018.08.019. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30237023.

Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release*. 2012 Dec 10;164(2):192-204. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.045. Epub 2012 May 18. PMID: 22613880; PMCID: PMC3436947.

Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, Martins I, Ma Y, Shen S, Yamazaki T, Sukkurwala AQ, Michaud M, Mignot G, Schlemmer F, Sulpice E, Locher C, Gidrol X, Ghiringhelli F, Modjtahedi N, Galluzzi L, André F, Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med*. 2012 Jul 18;4(143):143ra99. doi: 10.1126/scitranslmed.3003807. PMID: 22814852.

Mi C, Cao X, Ma K, Wei M, Xu W, Lin Y, Zhang J, Wang TY. Digitoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and migration by reducing HIF-1 α and STAT3 in KRAS mutant human colon cancer cells. *Chem Biol Interact*. 2022 Jan 5;351:109729. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109729. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34717917.

Mijatovic T, Roland I, Van Quaquebeke E, Nilsson B, Mathieu A, Van Vynckt F, Darro F, Blanco G, Facchini V, Kiss R. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non-small cell lung cancers. *J Pathol*. 2007 Jun;212(2):170-9. doi: 10.1002/path.2172. PMID: 17471453.

Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Sep;1776(1):32-57. doi: 10.1016/j.bbcan.2007.06.002. Epub 2007 Jul 4. PMID: 17706876.

Miller WL. Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends Endocrinol Metab*. 2017 Nov;28(11):771-793. doi: 10.1016/j.tem.2017.09.002. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29031608.

Mithraprabhu S, Khong T, Ramachandran M, Chow A, Klarica D, Mai L, Walsh S, Broemeling D, Marziali A, Wiggin M, Hocking J, Kalff A, Durie B, Spencer A. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma. *Leukemia*. 2017 Aug;31(8):1695-1705. doi: 10.1038/leu.2016.366. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27899805.

Mitra I, Nair NK, Mishra PK. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J Biosci.* 2012 Jun;37(2):301-12. doi: 10.1007/s12038-012-9192-8. PMID: 22581336.

Musher DM, Thorsteinsson SB, Airola VM II. Quantitative urinalysis. Diagnosing urinary tract infection in men. *JAMA.* 1976 Nov 1;236(18):2069-72. doi: 10.1001/jama.236.18.2069. PMID: 989790.

Nastaly P, Stoupiec S, Popęda M, Smentoch J, Schlomm T, Morrissey C, Żaczek AJ, Beyer B, Tennstedt P, Graefen M, Eltze E, Maiuri P, Semjonow A, Pantel K, Brandt B, Bednarz-Knoll N. EGFR as a stable marker of prostate cancer dissemination to bones. *Br J Cancer.* 2020 Dec;123(12):1767-1774. doi: 10.1038/s41416-020-01052-8. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32901137; PMCID: PMC7722745.

Nguyen PN, Violette P, Chan S, Tanguay S, Kassouf W, Aprikian A, Chen JZ. A panel of TMPRSS2:ERG fusion transcript markers for urine-based prostate cancer detection with high specificity and sensitivity. *Eur Urol.* 2011 Mar;59(3):407-14. doi: 10.1016/j.eururo.2010.11.026. Epub 2010 Nov 26. PMID: 21144642.

Ni J, Cozzi PJ, Duan W, Shigdar S, Graham PH, John KH, Li Y. Role of the EpCAM (CD326) in prostate cancer metastasis and progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Dec;31(3-4):779-91. doi: 10.1007/s10555-012-9389-1. PMID: 22718399.

Nicholson A, Mahon J, Boland A, Beale S, Dwan K, Fleeman N, Hockenhull J, Dundar Y. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of the PROGENSA® 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 Oct;19(87):i-xxxi, 1-191. doi: 10.3310/hta19870. PMID: 26507078; PMCID: PMC4780983.

Oesterling JE, Jacobsen SJ, Klee GG, Pettersson K, Piironen T, Abrahamsson PA, Stenman UH, Dowell B, Lövgren T, Lilja H. Free, complexed and total serum prostate specific antigen: the establishment of appropriate reference ranges for their concentrations and ratios. *J Urol.* 1995 Sep;154(3):1090-5. doi: 10.1016/s0022-5347(01)66984-2. PMID: 7543605.

Ondroušková E, Hrstka R. Cirkulující nádorová DNA v krvi a její využití jako potenciálního bio-markeru nádorových onemocnění [Circulating Tumor DNA in Blood and Its Utilization as a Potential Biomarker for Cancer]. *Klin Onkol.* 2015;28 Suppl 2:2S69-74. Czech. doi: 10.14735/amko20152s69. PMID: 26374161.

Ozturk S, Mathur D, Zhou RW, Mulholland D, Parsons R. Leflunomide triggers synthetic lethality in PTEN-deficient prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2020 Dec;23(4):718-723. doi: 10.1038/s41391-020-0251-1. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32661432; PMCID: PMC7666085.

Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jun;1863(6 Pt A):1238-60. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.02.016. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26921821.

Pádua RM, Meitinger N, Hennemann M, Schebitz P, Waibel R, Löber S, Gmeiner P, Clark T, Kreis W. *Tetrahedron* 2016;72,4556.

Pan Y, Rhea P, Tan L, Cartwright C, Lee HJ, Ravoori MK, Addington C, Gagea M, Kundra V, Kim SJ, Newman RA, Yang P. PBI-05204, a supercritical CO₂ extract of *Nerium oleander*, inhibits growth of human pancreatic cancer via targeting the

PI3K/mTOR pathway. *Invest New Drugs*. 2015 Apr;33(2):271-9. doi: 10.1007/s10637-014-0190-6. Epub 2014 Dec 6. PMID: 25476893; PMCID: PMC4387257.

Parekh DJ, Punnen S, Sjoberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS, Concepcion R, David RD, Deck KB, Dumbadze I, Gambla M, Grable MS, Henderson RJ, Karsh L, Krisch EB, Langford TD, Lin DW, McGee SM, Munoz JJ, Pieczonka CM, Rieger-Christ K, Saltzstein DR, Scott JW, Shore ND, Sieber PR, Waldmann TM, Wolk FN, Zappala SM. A multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4Kscore accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol*. 2015 Sep;68(3):464-70. doi: 10.1016/j.eururo.2014.10.021. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25454615.

Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fosså SD, Chodacki A, Wiechno P, Logue J, Seke M, Widmark A, Johannessen DC, Hoskin P, Bottomley D, James ND, Solberg A, Syndikus I, Kliment J, Wedel S, Boehmer S, Dall'Oglio M, Franzén L, Coleman R, Vogelzang NJ, O'Bryan-Tear CG, Staudacher K, Garcia-Vargas J, Shan M, Bruland ØS, Sartor O; ALSYMPCA Investigators. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jul 18;369(3):213-23. doi: 10.1056/NEJMoa1213755. PMID: 23863050.

Pascale M, Aversa C, Barbazza R, Marongiu B, Siracusano S, Stoffel F, Sulfaro S, Roggero E, Bonin S, Stanta G. The proliferation marker Ki67, but not neuroendocrine expression, is an independent factor in the prediction of prognosis of primary prostate cancer patients. *Radiol Oncol*. 2016 Jul 19;50(3):313-20. doi: 10.1515/raon-2016-0033. PMID: 27679548; PMCID: PMC5030813.

Peng T, Zhang L, Zhu L, Mi YY. MSMB gene rs10993994 polymorphism increases the risk of prostate cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 25;8(17):28494-28501. doi: 10.18632/oncotarget.15312. PMID: 28212531; PMCID: PMC5438667.

Perlis N, Al-Kasab T, Ahmad A, Goldberg E, Fadak K, Sayyid R, Finelli A, Kulkarni G, Hamilton R, Zlotta A, Ghai S, Fleshner N. Defining a Cohort that May Not Require Repeat Prostate Biopsy Based on PCA3 Score and Magnetic Resonance Imaging: The Dual Negative Effect. *J Urol*. 2018 May;199(5):1182-1187. doi: 10.1016/j.juro.2017.11.074. Epub 2017 Nov 23. Erratum in: *J Urol*. 2018 Sep;200(3):660. PMID: 29175542.

Pierre SV, Xie Z. The Na,K-ATPase receptor complex: its organization and membership. *Cell Biochem Biophys*. 2006;46(3):303-16. doi: 10.1385/cbb:46:3:303. PMID: 17272855.

Platz EA, Yegnasubramanian S, Liu JO, Chong CR, Shim JS, Kenfield SA, Stampfer MJ, Willett WC, Giovannucci E, Nelson WG. A novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment. *Cancer Discov*. 2011 Jun;1(1):68-77. doi: 10.1158/2159-8274.CD-10-0020. PMID: 22140654; PMCID: PMC3227223.

Ploussard G, Haese A, Van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, Huland H, Bastien L, Abbou CC, Remzi M, Tinzl M, Feyerabend S, Stillebroer AB, Van Gils MP, Schalken JA, de La Taille A. The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies? *BJU Int*. 2010 Oct;106(8):1143-7. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09286.x. PMID: 20230386.

Pollard BS, Suckow MA, Wolter WR, Starr JM, Eidelman O, Dalgard CL, Kumar P, Battacharyya S, Srivastava M, Biswas R, Wilkerson MD, Zhang X, Yang Q, Pollard HB. Digitoxin Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal-Transition in Hereditary Castration Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2019 Aug 2;9:630. doi: 10.3389/fonc.2019.00630. PMID: 31428571; PMCID: PMC6687970.

Pongrakhananon V, Stueckle TA, Wang HL, O'Doherty GA, Dinu CZ, Chanvorachote P, Rojanasakul Y. Monosaccharide digitoxin derivative sensitize human non-small cell lung cancer cells to anoikis through Mcl-1 proteasomal degradation. *Biochem Pharmacol.* 2014 Mar 1;88(1):23-35. doi: 10.1016/j.bcp.2013.10.027. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24231508; PMCID: PMC3970117.

Prassas I, Diamandis EP. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Nov;7(11):926-35. doi: 10.1038/nrd2682. Epub 2008 Oct 24. PMID: 18948999.

Qi F, Inagaki Y, Gao B, Cui X, Xu H, Kokudo N, Li A, Tang W. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways. *Cancer Sci.* 2011 May;102(5):951-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01900.x. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21288283.

Raghu D, Paul PJ, Gulati T, Deb S, Khoo C, Russo A, Gallo E, Blandino G, Chan AL, Takano E, Sandhu SK, Fox SB, Williams S, Haupt S, Gamell C, Haupt Y. E6AP promotes prostate cancer by reducing p27 expression. *Oncotarget.* 2017 Jun 27;8(26):42939-42948. doi: 10.18632/oncotarget.17224. PMID: 28477016; PMCID: PMC5522117.

Raja N, Russell CM, George AK. Urinary markers aiding in the detection and risk stratification of prostate cancer. *Transl Androl Urol.* 2018 Sep;7(Suppl 4):S436-S442. doi: 10.21037/tau.2018.07.01. PMID: 30363496; PMCID: PMC6178315.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013 Feb 18;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138. PMID: 23420871; PMCID: PMC3575529.

Rascón-Valenzuela L, Velázquez C, Garibay-Escobar A, Medina-Juárez LA, Vilegas W, Robles-Zepeda RE. Antiproliferative activity of cardenolide glycosides from *Asclepias subulata*. *J Ethnopharmacol.* 2015 Aug 2;171:280-6. doi: 10.1016/j.jep.2015.05.057. Epub 2015 Jun 9. PMID: 26068432.

Rathinavelu A et Levy A. Key Genes in Prostate Cancer Progression: Role of MDM2, PTEN, and TMPRSS2-ERG Fusions, Prostate Cancer - Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments. *InTech*, 2016:178–188. doi: 10.5772/64337.

Reddy D, Kumavath R, Ghosh P, Barh D. Lanatoside C Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Suppresses Cancer Cell Growth by Attenuating MAPK, Wnt, JAK-STAT, and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathways. *Biomolecules.* 2019 Nov 27;9(12):792. doi: 10.3390/biom9120792. PMID: 31783627; PMCID: PMC6995510.

Rennie PS, Bruchovsky N, Goldenberg SL. Relationship of androgen receptors to the growth and regression of the prostate. *Am J Clin Oncol.* 1988;11 Suppl 2:S13-7. doi: 10.1097/00000421-198801102-00004. PMID: 3071950.

Rodriguez M, Luo W, Weng J, Zeng L, Yi Z, Siwko S, Liu M. PSGR promotes prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer xenograft growth through NF- κ B. *Oncogenesis*. 2014 Aug 11;3(8):e114. doi: 10.1038/oncsis.2014.29. PMID: 25111863; PMCID: PMC5189964.

Roehrborn CG. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Int J Impot Res*. 2008 Dec;20 Suppl 3:S11-8. doi: 10.1038/ijir.2008.55. PMID: 19002119.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sampson N, Neuwirt H, Puhr M, Klocker H, Eder IE. In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2013 Mar 26;20(2):R49-64. doi: 10.1530/ERC-12-0401. PMID: 23447570.

Sanda MG, Feng Z, Howard DH, Tomlins SA, Sokoll LJ, Chan DW, Regan MM, Groskopf J, Chipman J, Patil DH, Salami SS, Scherr DS, Kagan J, Srivastava S, Thompson IM Jr, Siddiqui J, Fan J, Joon AY, Bantis LE, Rubin MA, Chinnayian AM, Wei JT; and the EDRN-PCA3 Study Group, Bidair M, Kibel A, Lin DW, Lotan Y, Partin A, Taneja S. Association Between Combined TMPRSS2:ERG and PCA3 RNA Urinary Testing and Detection of Aggressive Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2017 Aug 1;3(8):1085-1093. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0177. PMID: 28520829; PMCID: PMC5710334.

Sequeiros T, Bastarós JM, Sánchez M, Rigau M, Montes M, Placer J, Planas J, de Torres I, Reventós J, Pegtel DM, Doll A, Morote J, Olivan M. Urinary biomarkers for the detection of prostate cancer in patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate*. 2015 Jul 1;75(10):1102-13. doi: 10.1002/pros.22995. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25845829.

Sharma A, Purkait B. Identification of Medicinally Active Ingredient in Ultradiluted *Digitalis purpurea*: Fluorescence Spectroscopic and Cyclic-Voltammetric Study. *J Anal Methods Chem*. 2012;2012:109058. doi: 10.1155/2012/109058. Epub 2012 Mar 26. PMID: 22606641; PMCID: PMC3347722.

Shen JJ, Zhan YC, Li HY, Wang Z. Ouabain impairs cancer metabolism and activates AMPK-Src signaling pathway in human cancer cell lines. *Acta Pharmacol Sin*. 2020 Jan;41(1):110-118. doi: 10.1038/s41401-019-0290-0. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31515527; PMCID: PMC7468359.

Schaeffer EM. Re: Chronic prostatitis does not influence urinary PCA3 score. *J Urol*. 2012 Dec;188(6):2242. doi: 10.1016/j.juro.2012.08.077. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23141232.

Schneider NFZ, Cerella C, Simões CMO, Diederich M. Anticancer and Immunogenic Properties of Cardiac Glycosides. *Molecules*. 2017 Nov 8;22(11):1932. doi: 10.3390/molecules22111932. PMID: 29117117; PMCID: PMC6150164.

Skalníková Kupcová H, Kovářová H. Extracelulární váčky II. Exozomy a jejich význam u patofyziologických stavů člověka. *Živa* 2017;1:4-7.

Slingerland M, Cerella C, Guchelaar HJ, Diederich M, Gelderblom H. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. *Invest*

New Drugs. 2013 Aug;31(4):1087-94. doi: 10.1007/s10637-013-9984-1. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23748872.

Smelov V, Novikov A, Brown LJ, Eklund C, Strokova L, Ouburg S, Morre SA, Dillner J. False-positive prostate cancer markers in a man with symptomatic urethral *Chlamydia trachomatis* infection. *Int J STD AIDS*. 2013 Jun;24(6):501-2. doi: 10.1177/0956462412472805. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23970757.

Smith JA, Madden T, Vijjeswarapu M, Newman RA. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. *Biochem Pharmacol*. 2001 Aug 15;62(4):469-72. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00690-6. PMID: 11448457.

Song X, Zhang C, Zhao M, Chen H, Liu X, Chen J, Lonard DM, Qin L, Xu J, Wang X, Li F, O'Malley BW, Wang J. Steroid Receptor Coactivator-3 (SRC-3/AIB1) as a Novel Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer and Its Inhibition with a Phospho-Bufalin Prodrug. *PLoS One*. 2015 Oct 2;10(10):e0140011. doi: 10.1371/journal.pone.0140011. PMID: 26431029; PMCID: PMC4592245.

Sreenivasan Y, Sarkar A, Manna SK. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1 and potentiates apoptosis induced by ceramide. *Biochem Pharmacol*. 2003 Dec 1;66(11):2223-39. doi: 10.1016/j.bcp.2003.07.010. PMID: 14609747.

Stein MN, Jang TL. Striving Toward a Cure for Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2016 Jun 20;34(18):2075-8. doi: 10.1200/JCO.2015.66.3146. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27022121.

Stenkvist B. Cardenolides and cancer. *Anticancer Drugs*. 2001 Aug;12(7):635-8. doi: 10.1097/00001813-200108000-00012. PMID: 11487722.

Stenkvist B. Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncol Rep*. 1999 May-Jun;6(3):493-6. PMID: 10203580.

Stephan C, Ralla B, Jung K. Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1846(1):99-112. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.04.001. Epub 2014 Apr 13. PMID: 24727384.

Stevenson BW, Gorman MA, Koach J, Cheung BB, Marshall GM, Parker MW, Holien JK. A structural view of PA2G4 isoforms with opposing functions in cancer. *J Biol Chem*. 2020 Nov 20;295(47):16100-16112. doi: 10.1074/jbc.REV120.014293. Epub 2020 Sep 20. PMID: 32952126; PMCID: PMC7681029.

Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987 Jun;23(6):707-12. doi: 10.1016/0277-5379(87)90266-5. PMID: 3653190.

Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 2015 Jan;36(1):3-23. doi: 10.1038/aps.2014.18. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24909511; PMCID: PMC4571323.

Thomas CE, Sexton W, Benson K, Sutphen R, Koomen J. Urine collection and processing for protein biomarker discovery and quantification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Apr;19(4):953-9. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0069. Epub 2010 Mar 23. PMID: 20332277; PMCID: PMC2852495.

Tian HY, Yuan XF, Jin L, Li J, Luo C, Ye WC, Jiang RW. A bufadienolide derived androgen receptor antagonist with inhibitory activities against prostate cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2014 Jan 25;207:16-22. doi: 10.1016/j.cbi.2013.10.020. Epub 2013 Nov 5. PMID: 24211617.

Tomlins SA, Day JR, Lonigro RJ, Hovelson DH, Siddiqui J, Kunju LP, Dunn RL, Meyer S, Hodge P, Groskopf J, Wei JT, Chinnaiyan AM. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur Urol.* 2016 Jul;70(1):45-53. doi: 10.1016/j.eururo.2015.04.039. Epub 2015 May 16. PMID: 25985884; PMCID: PMC4644724.

Tosoian JJ, Ross AE, Sokoll LJ, Partin AW, Pavlovich CP. Urinary Biomarkers for Prostate Cancer. *Urol Clin North Am.* 2016 Feb;43(1):17-38. doi: 10.1016/j.ucl.2015.08.003. PMID: 26614026.

Valeri A, Briollais L, Azzouzi R, Fournier G, Mangin P, Berthon P, Cussenot O, Demenais F. Segregation analysis of prostate cancer in France: evidence for autosomal dominant inheritance and residual brother-brother dependence. *Ann Hum Genet.* 2003 Mar;67(Pt 2):125-37. doi: 10.1046/j.1469-1809.2003.00022.x. PMID: 12675688.7

Van Neste L, Hendriks RJ, Dijkstra S, Trooskens G, Cornel EB, Jannink SA, de Jong H, Hessels D, Smit FP, Melchers WJ, Leyten GH, de Reijke TM, Vergunst H, Kil P, Knipscheer BC, Hulsbergen-van de Kaa CA, Mulders PF, van Oort IM, Van Criekinge W, Schalken JA. Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. *Eur Urol.* 2016 Nov;70(5):740-748. doi: 10.1016/j.eururo.2016.04.012. Epub 2016 Apr 20. PMID: 27108162.

Varbanov HP, Kuttler F, Banfi D, Turcatti G, Dyson PJ. Repositioning approved drugs for the treatment of problematic cancers using a screening approach. *PLoS One.* 2017 Feb 6;12(2):e0171052. doi: 10.1371/journal.pone.0171052. PMID: 28166232; PMCID: PMC5293254.

Verma SK, Das AK, Cingoz GS, Uslu E, Gurel E. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected Turkish crocus species. *Biotechnol Rep (Amst).* 2016 Mar 26;10:66-74. doi: 10.1016/j.btre.2016.03.006. PMID: 28352526; PMCID: PMC5040870.

Vickers AJ, Eastham JA, Scardino PT, Lilja H. The Memorial Sloan Kettering Cancer Center Recommendations for Prostate Cancer Screening. *Urology.* 2016 May;91:12-8. doi: 10.1016/j.urology.2015.12.054. Epub 2016 Feb 2. PMID: 26850815; PMCID: PMC4842100.

Vlaeminck-Guillem V, Bandel M, Cottancin M, Rodriguez-Lafrasse C, Bohbot JM, Sednaoui P. Chronic prostatitis does not influence urinary PCA3 score. *Prostate.* 2012 Apr;72(5):549-54. doi: 10.1002/pros.21457. Epub 2011 Jul 14. PMID: 21761426.

Wang HY, Xin W, Zhou M, Stueckle TA, Rojanasakul Y, O'Doherty GA. Stereochemical survey of digitoxin monosaccharides: new anticancer analogues with enhanced apoptotic activity and growth inhibitory effect on human non-small cell lung cancer cell. *ACS Med Chem Lett.* 2011 Jan 13;2(1):73-78. doi: 10.1021/ml100219d. PMID: 21643465; PMCID: PMC3105780.

Wang J, Chang S, Li G, Sun Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Front Med.* 2017 Dec;11(4):522-527. doi: 10.1007/s11684-017-0526-7. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28744793.

Wang J, Zhang X, Li X, Zhang Y, Hou T, Wei L, Qu L, Shi L, Liu Y, Zou L, Liang X. Anti-gastric cancer activity in three-dimensional tumor spheroids of bufadienolides. *Sci Rep.* 2016 Apr 21;6:24772. doi: 10.1038/srep24772. PMID: 27098119; PMCID: PMC4838868.

Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015 Jan;17(1):1-15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004. PMID: 25622895; PMCID: PMC4309685.

Weng JR, Lin WY, Bai LY, Hu JL, Feng CH. Antitumor Activity of the Cardiac Glycoside α Diginoside by Modulating Mcl-1 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 26;21(21):7947. doi: 10.3390/ijms21217947. PMID: 33114727; PMCID: PMC7663359.

Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis.* 2004 Apr 15;38(8):1150-8. doi: 10.1086/383029. Epub 2004 Apr 6. PMID: 15095222.

Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol Pharm.* 2006 Mar-Apr;63(2):109-15. PMID: 17514873.

Withering W. An account on the foxglove, and some of its medical uses with practical remark on dropsy and other diseases. G. G. J. and J. Robinson, London, 1785.

Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Mol Pharm.* 2011 Dec 5;8(6):2032-8. doi: 10.1021/mp200292c. Epub 2011 Oct 26. PMID: 21981633; PMCID: PMC3230683.

Wu B, Li Y, Yan H, Ma Y, Luo H, Yuan L, Chen S, Lu S. Comprehensive transcriptome analysis reveals novel genes involved in cardiac glycoside biosynthesis and mlncRNAs associated with secondary metabolism and stress response in *Digitalis purpurea*. *BMC Genomics.* 2012 Jan 10;13:15. doi: 10.1186/1471-2164-13-15. PMID: 22233149; PMCID: PMC3269984.

Wu D, Ni J, Beretov J, Cozzi P, Willcox M, Wasinger V, Walsh B, Graham P, Li Y. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Oct;118:15-26. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.002. Epub 2017 Aug 19. PMID: 28917266.

Xie CM, Chan WY, Yu S, Zhao J, Cheng CH. Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation. *Free Radic Biol Med.* 2011 Oct 1;51(7):1365-75. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.016. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21763418.

Yang Z, Yu L, Wang Z. PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Chin J Cancer Res.* 2016 Feb;28(1):65-71. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.01.05. PMID: 27041928; PMCID: PMC4779752.

Yeh JY, Huang WJ, Kan SF, Wang PS. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Prostate*. 2003 Feb 1;54(2):112-24. doi: 10.1002/pros.10172. PMID: 12497584.

Yu CH, Kan SF, Pu HF, Jea Chien E, Wang PS. Apoptotic signaling in bufalin- and cinobufagin-treated androgen-dependent and -independent human prostate cancer cells. *Cancer Sci*. 2008 Dec;99(12):2467-76. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00966.x. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19037992.

Yu M, Zhu Y, Teng L, Cui J, Su Y. Can Circulating Cell-Free DNA or Circulating Tumor DNA Be a Promising Marker in Ovarian Cancer? *J Oncol*. 2021 Apr 12;2021:6627241. doi: 10.1155/2021/6627241. PMID: 33936202; PMCID: PMC8062166.

Zalucki MP, Lincoln P, Brower LP, Alonso-M.A. Detrimental effects of latex and cardiac glycosides on survival and growth of first-instar monarch butterfly larvae *Danaus plexippus* feeding on the sandhill milkweed *Asclepiashumistrata*. *Ecological Entomology*. 2001;26(2),212-224.

Zhai XF, Fang FF, Liu Q, Meng YB, Guo YY, Chen Z. MiR-181a contributes to bufalin-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Nov 23;13:325. doi: 10.1186/1472-6882-13-325. PMID: 24267199; PMCID: PMC4222721.

Zhang Y, Dong Y, Melkus MW, Yin S, Tang SN, Jiang P, Pramanik K, Wu W, Kim S, Ye M, Hu H, Lu J, Jiang C. Role of P53-Senescence Induction in Suppression of LNCaP Prostate Cancer Growth by Cardiotonic Compound Bufalin. *Mol Cancer Ther*. 2018 Nov;17(11):2341-2352. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1296. Epub 2018 Aug 30. PMID: 30166403; PMCID: PMC6668018.

Zhou Y, Li Y, Li X, Jiang M. Urinary Biomarker Panel to Improve Accuracy in Predicting Prostate Biopsy Result in Chinese Men with PSA 4-10 ng/mL. *Biomed Res Int*. 2017;2017:2512536. doi: 10.1155/2017/2512536. Epub 2017 Feb 15. PMID: 28293631; PMCID: PMC5331314.

Zhu Z, Sun H, Ma G, Wang Z, Li E, Liu Y, Liu Y. Bufalin induces lung cancer cell apoptosis via the inhibition of PI3K/Akt pathway. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):2025-35. doi: 10.3390/ijms13022025. Epub 2012 Feb 14. PMID: 22408435; PMCID: PMC3292004.

Zieleniak A, Wójcik M, Woźniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Sep-Oct;56(5):331-45. doi: 10.1007/s00005-008-0037-y. PMID: 18836859.