

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Prognostický význam PCA3, fúzního genu TMPRSS2:ERG
a dalších markerů u karcinomu prostaty**

Diplomová práce

Bc. Hana Holá

Vedoucí práce: RNDr. Martin Pešta, Ph.D., LF UK v Plzni

Konzultant z fakulty: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc

Konzultant specialista: MUDr. Jiří Klečka, Ph.D.

České Budějovice 2014

Holá H., 2014: Prognostický význam PCA3, fúzního genu TMPRSS2:ERG a dalších markerů u karcinomu prostaty. [The prognostic value of PCA3, the fusion gene TMPRSS2:ERG and other markers in prostate cancer. Mgr. Thesis, in Czech.] – 79 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to assess the presence of fusion gene TMPRSS2:ERG and expressions of PCA3, miR23b, miR26 and miR221 in PCa. PSA was measured in peripheral blood and tumor tissue (FFPE samples). The presence of fusion gene TMPRSS2:ERG and expression of PCA3 gene and miRNA in FFPE tumor tissue was analysed by RT real-time PCR. This determination would help to identify patients with high-risk tumors.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 23. 4. 2014

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem, kteří umožnili vznik této práce.

Děkuji svému školiteli RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D. za poskytnutí námětu, odborné vedení a za finanční zajištění projektu, MUDr. Vlastimilovi Kuldovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc se zpracováním dat a RNDr. Ladislavu Pecnovi, Ph.D. za statistické zpracování výsledků.

Dále bych chtěla poděkovat profesoru MUDr. Ondřeji Hesovi, Ph.D. za poskytnutí tkáňových vzorků a MUDr. Jiřímu Klečkovi, Ph.D. a MUDr. Olze Dolejšové za rady z oblasti klinické urologie a umožnění použití údajů o klinickém stavu pacientů. Janu Javůrkovi děkuji za rady a pomoc v laboratorních postupech.

Děkuji rovněž paní prorektorce doc. MUDr. Mileně Králíčkové, Ph.D. za to, že mi jako studentce PřF JČU dovolila zpracovávat diplomovou práci na LF UK v Plzni.

OBSAH

<u>1. ÚVOD.....</u>	<u>1</u>
<u>2. CÍLE PRÁCE.....</u>	<u>2</u>
<u>3. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY</u>	<u>3</u>
3.1 OBECNÉ MECHANISMY ONKOGENEZE	3
3.2 KARCINOM PROSTATY	7
3.2.1 EPIDEMIOLOGIE KARCINOMU PROSTATY	7
3.2.2 PROSTATA A PATOGENEZE KARCINOMU PROSTATY	8
3.2.2.1 Histopatologie karcinomu prostaty.....	9
3.2.2.2 Patogeneze karcinomu prostaty na molekulární úrovni	10
3.2.3 DIAGNOSTIKA A LÉČBA KARCINOMU PROSTATY	14
3.2.3.1 Diagnostika.....	14
3.2.3.2 Histopatologická klasifikace.....	15
3.2.3.3 Léčba	17
3.2.4 NÁDOROVÉ MARKERY U KARCINOMU PROSTATY V PRAXI	20
3.2.4.1 Prostatický specifický antigen	20
3.2.5 NOVÉ NÁDOROVÉ MARKERY U KARCINOMU PROSTATY	22
3.2.5.1 PCA3	22
3.2.5.2 Rodina fúzních genů Tmprss2:ETS	23
3.2.6 MIKRORNA U KARCINOMU PROSTATY	27
3.2.6.1 Biogeneze miRNA.....	27
3.2.6.2 miRNA v nádorové patogenezi	27
3.2.6.2 miRNA v patogenezi karcinomu prostaty	29
3.2.6.3 MikroRNA-23b	30
3.2.6.4 MikroRNA-26a.....	31
3.2.6.5 MikroRNA-221	32
<u>4. METODIKA</u>	<u>34</u>
4.1 SOUBOR PACIENTŮ S KARCINOMEM PROSTATY	34
4.2 TKÁŇOVÉ VZORKY PRO STANOVENÍ EXPRESE VYBRANÝCH GENŮ	34
4.3 STANOVENÍ EXPRESE GENŮ	35

4.3.1 ISOLACE CELKOVÉ RNA	35
4.3.2 REVERZNÍ TRANSKRIPCE (RT) – PŘÍPRAVA CDNA	36
4.3.3 PCR V REÁLNÍM ČASE (REAL-TIME PCR)	37
4.4 IMUNOANALYTICKÉ METODY	39
<u>5. VÝSLEDKY</u>	<u>40</u>
5.1 VZTAH PŘEDOPERAČNÍCH HLADIN PSA KE KLINICKO-PATOLOGICKÉMU STAVU PACIENTŮ.....	40
5.2 VZTAH PŘÍTOMNOSTI FÚZNÍHO GENU TMPRSS2:ERG S KLINICKO-PATOLOGICKÝM STAVEM PACIENTŮ	41
5.3 VZTAH NAMĚŘENÝCH HODNOT MI RNA A MRNA KE KLINICKO-PATOLOGICKÉMU STAVU PACIENTŮ	44
5.4 VZTAH HLADIN MARKERŮ K DÉLCE BEZPŘÍZNAKOVÉHO OBDOBÍ.....	52
<u>6. DISKUSE.....</u>	<u>55</u>
<u>6. ZÁVĚRY.....</u>	<u>59</u>
7.1 ZÁVĚRY.....	59
7.2 ZÁVĚRY PRO KLINICKOU PRAXI.....	59
<u>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</u>	<u>60</u>
<u>9. PŘÍLOHY.....</u>	<u>71</u>
9.1 TNM-09 KLINICKÁ KLASIFIKACE KARCINOMU PROSTATY	72
9.2 TABULKA ZJIŠTĚNÝCH KLINICKÝCH DAT A STANOVENÝCH HODNOT	73

1. Úvod

Karcinom prostaty patří dlouhodobě k nejčastějším maligním onemocněním v Evropě a v USA. Také v České republice incidence tohoto nádorového onemocnění od konce devadesátých let minulého století strmě roste, což se přičítá stárnutí populace a rutinnímu preventivnímu vyšetřování. Klesající a nyní spíše stagnující úmrtnost na tento zhoubný novotvar by mohla na první pohled znamenat zvládnutí problematiky léčby a prevence. Dle Národního onkologického registru to však odráží počet nově diagnostikovaných případů s benigním průběhem.

U většiny pacientů roste karcinom prostaty velmi pomalu a udává se, že k rozvoji potřebuje nejméně deset let. Pro nízké tendence k progresi se většinou klinicky neprojevuje a pacienta nepoškozuje. Současnými diagnostickými metodami lze jen těžko odlišit agresivní karcinom od klinicky indolentního, přičemž vysoce maligní formy se sklony k metastazování jsou pro pacienta život ohrožující (Dvořáček, 2007). Generalizovaný karcinom prostaty je navzdory pokrokům v medicíně stále těžké a nevléčitelné onemocnění. Nádorový marker, který by identifikoval agresivní typy karcinomu prostaty, nemáme dosud k dispozici.

V praxi to znamená, že jsou pacienti se suspektním nálezem v prostatě často zatěžováni zbytečnými biopsiemi nebo dokonce léčeni operativně radikální prostatektomií. U mnohých z nich by se však prostatické karcinomy s ohledem na věk a další onemocnění pacienta neměly možnost vůbec rozvinout (Soumarová et al, 2012). Jsem přesvědčena, že řada pacientů je v souvislosti s karcinomem prostaty v současnosti léčeni zbytečně a že tato aktivní léčba velmi výrazně snižuje kvalitu jejich života a nemá pro ně žádný přínos.

Bohužel zavedení nových strategií do praxe je velmi pomalé, problematika vzhledem ke genetické heterogenitě karcinomu prostaty složitá a závěry studií často nejednoznačné (Mackinnon et al, 2009).

Cílem této práce je výzkum biomarkerů, které by mohly pomoci odhalit agresivní formy karcinomu prostaty. Konkrétně jsem se zabývala stanovením exprese genu PCA3, přítomnosti fúzního genu TMPRSS2:ERG a vybraných malých nekódujících RNA (mikroRNA) v histologických vzorcích karcinomu prostaty pro prognózu karcinomu prostaty, to znamená odhalení agresivnějších forem onemocnění.

2. Cíle práce

Stanovení prognostického významu markerů PCA3, fúzního genu TMPRSS2:ERG a molekul miR-23b, miR-221 a miR-26a ve tkáňových vzorcích karcinomu prostaty pro identifikaci následně progradujících nádorů.

- 1) Zavedení metodiky diagnostiky markerů PCA3 a TMPRSS2:ERG.
- 2) Stanovení exprese uvedených markerů FFPE tkáních karcinomu prostaty a v přilehlé normální tkáni prostaty.
- 3) Vyhodnocení vztahu uvedených markerů s klinickým stavem pacientů.

3. Současný stav problematiky

3.1 Obecné mechanismy onkogeneze

Proces přeměny normální somatické buňky na buňku nádorovou (kancerogeneze, karcinogeneze, onkogeneze, tumorigeneze) je zapříčiněn kumulací genetických i epigenetických změn předávaných dceřiným buňkám. Buňka se vymkne geneticky řízené kontrole buněčného cyklu, která za normálních okolností udržuje v rovnováze proliferaci a programovanou buněčnou smrt (PCD, programmed cell death), zejména apoptózu. Je známo, že řada specifických mutací a epimutací v DNA vede k narušení této rovnováhy a rozvoji rakoviny (Corner, 2001). Výsledkem je nekontrolované dělení buňky. Podle aktivity proliferace rozlišujeme dva základní typy nádorů: benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). Benigní nádory rostou v původním ložisku, zachovávají charakter tkáně, z níž vznikly, nejeví agresivitu a rostou poměrně pomalu, na rozdíl od nádorů maligních, které mj. prorůstají z výchozího ložiska do okolí (invadují) a poškozují strukturu a funkci orgánu (Walter, 1977; British Medical Association, 1997). Maligní transformace jsou původně tvořeny buňkami z jednoho klonu s autonomním a neomezeným růstem a tyto buňky následně vytvářejí geneticky heterogenní klony a mohou být finálně lymfatickými a krevními cévami přenášeny do jiných orgánů (metastazují). Metastazování je mj. podmíněno geneticky získanými změnami aktivity proteolytických enzymů a změnou adhezivních molekul buněčného povrchu (Wikiskripta 1).

Zásadní vlastností primárních tumorů i metastáz je angiogeneze, neboli schopnost indukce vlastního cévního systému. Je to vícestupňový proces – angiogenní kaskáda, regulovaná souborem působků, např. cytokinů, integrinů, adhezivních molekul a proteas (Masopust et al, 2003). Dochází k proliferaci endoteliálních cévních buněk a nové vaskularizaci, neboť hypoxií uvnitř zvětšujícího se nádoru jsou aktivovány geny, jejichž produkty se podílí na rozvoji nového cévního systému (Masopust et al, 2003; Gabriel et al, 2004). Nemalý vliv na nádorový růst má přilehlé mikroprostředí (signální molekuly přítomné v extracelulární matrix, řada komponentů imunitního systému, fibroblasty a pericyty). Mezi inhibitory angiogeneze patří např. TNF- β (tumor necrosis faktor-beta), naopak je přímo podporována např. růstovými faktory, VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) a angiopoetinem-1 (Wikiskripta 1). Novotvorbu cév lze rozdělit do tří etap. V první etapě se endotelové buňky cévy protáhnou, dojde k vazodilataci a vzniku sítě fibrinových vláken, která jsou podkladem pro vznik nové cévy. Následuje angiogenními faktory iniciovaná proliferace a migrace endotelií a vlastní tvorba nové cévy, kdy dochází

k aktivaci pericytů a podpoře syntézy kolagenu ve fibroblastech po stimulaci TGF- α , EGF a PDGF. Tak vzniká nová cévní stěna a její lumen (Masopust et al, 2003).

Již dlouhou dobu je známo, že při tumorigenezi dochází ke kumulaci většího množství mutací (Foulds, 1958). Pro ilustraci u kolorektálního karcinomu bylo zjištěno asi patnáct hlavních a šedesát přidružených mutací (Wood et al, 2007). Viry obsahující onkogeny (*Oncovirinae*) přispívají procesem virové transformace buňky k růstu nádorové tkáně hostitele. Pravděpodobnost, že v jedné buňce vznikne několik mutací, se zdá být velice nízká, ale při zrychleném růstu již pozměněných buněk riziko vzniku dalších mutací roste. Nové mutace mění stabilitu genomu (na úrovni DNA nebo chromosomů) a tím jeho náchylnost k dalším změnám (Kinzler a Vogelstein, 1996). Hovoří se o tzv. hypotéze klonálního původu nádoru, která je potvrzena pro většinu nádorů. Pro některé typy nádorů jsou známy mutace specifických genů. Uvádí se, že nádorová transformace začíná kumulací čtyř až šesti mutací v kritických genech. O těchto pravidlech hovoříme jako o tzv. polygenním principu vzniku nádorového onemocnění (Knudsonova hypotéza, multiple-hit hypothesis), viz níže. V současné době bylo však také potvrzeno, že nádor může vzniknout ze dvou různých mutantních klonů. Maligní transformace proběhne v různých buňkách v důsledku odlišných mechanismů za pomoci parakrinní signalizace a vzniklý nádor pochází ze dvou smíšených mutantních buněčných klonů (Wu et al, 2010).

Genetickou příčinou maligní transformace jsou mutace a epigenetické změny protoonkogenů, tumor supresorových genů a mutátorových genů. Mezi protoonkogeny řadíme geny, které akcelerují buněčné dělení a inhibují apoptózu. Tumor supresorové geny brzdí průběh buněčného cyklu, podílejí se na opravách DNA a spouští apoptózu. Nádorový růst může také podporovat probíhající zánět okolních tkání, a to vlivem působení nadbytku cytokinů.

Onkogeny aktivují proliferaci buněk s výsledkem nekontrolovatelného růstu a diferenciace (Ponder, 2001). Při abnormální aktivaci protoonkogenu se zvyšuje jeho exprese nebo aktivita s výsledkem nadměrného buněčného dělení, protoonkogen se mění v onkogen. Protoonkogen může vzniknout bodovou mutací, amplifikací nebo translokací do transkripčně aktivního místa - Burkittův lymfom. Dalším způsobem je vznik chimerického (fúzního) genu v důsledku přestavby mezi chromosomy – BCR-ABL, nebo v rámci jednoho chromosomu - TMPRSS2:ETS (Todd et al, 1999; Alberts et al, 2002). Dále kap. 3.2.5.2. Expresce řady onkogenů je také regulována nekódujícími molekulami RNA, microRNA (miRNAs). Bylo zjištěno, že deregulace exprese těchto miRNA přispívá k aktivaci onkogenů (Esquela-Kerscher et al, 2006; Negrini et al, 2007). Viz podrobně kap. 3.2.5.3. Prvním objeveným onkogenem je onkogen Ras. Mutace v rodině protoonkogenů Ras jsou nacházeny ve 20-30%

všech typů lidských nádorů (Bos, 1989; Chang et al, 1982). V současnosti je známo více než 40 onkogenů (např. Myc, Abl, Fos a Jun). Mutace onkogenů mají dominantní charakter, tzn. projeví se již změna jedné kopie protoonkogenů na onkogen (Gabriel et al, 2004).

Dále k nádorovému růstu přispívají **mutace antiproliferačních, tumor supresorových genů**. Zde se uplatňují mutace typu loss of function, tzn. „pronádorový“ efekt se projeví až po poškození obou kopií (delecí, bodovou mutací či přímo inaktivací proteinu). V tomto se zásadně liší od protoonkogenů. Mezi tumor supresorové geny (antionkogeny) řadíme geny, které kódují proteiny s antiproliferačním účinkem a podporují apoptózu. Prvním důkazem jejich existence byla studie vzácného očního nádoru - retinoblastomu. Tento model kancerogeneze formuloval Knudson v roce 1971 při výzkumu sporadické a familiární formy retinoblastomu (Knudson, 1971). Zjistil, že pokud se nádor vyskytuje v dědičné formě s AD dědičností, projeví se postižení často v dětském věku a zpravidla oboustranně. Sporadická forma retinoblastomu vzniká později a nezděděná postihuje pouze jedno oko. Mechanismus spočívá v inaktivaci obou alel tumor supresorového Rb-genu, tzv. teorie dvojího zásahu. U získané formy dojde ke dvěma nezávislým mutacím, ale u vrozené pouze k jedné, neboť druhá je již zděděná (Knudson, 1971 a 2002). Dnes víme, že se retinoblastomový gen a jeho produkt RB-protein vyskytuje v každé buňce, kde reguluje buněčný cyklus dělení. Proteiny retinoblastomového genu (Rb-1) a dalšího tumor supresoru p53 zamezují buněčné proliferaci, negativně regulují např. transkripční faktor E2F. Působením proteinového produktu adenoviru nebo lidského papilomaviru na RB-protein je spuštěno odblokování suprese tohoto transkripčního faktoru (Dick et al, 2013). Naproti tomu p53 zvyšuje expresi p21/CIP, který je inhibítoem cyklin dependentní kinasy (cdk). Protein p53 (gen TP53) je znám dále pro svou roli v kontrole BC, apoptóze, angiogenezi a genetické stabilitě. Další tumor supresorové geny jsou např. p16, BRCA-1, BRCA-2 a PTEN (Gabriel et al, 2004, Jorde et al, 2000).

Knudsonova teorie dvojího zásahu, obecně chápána jako mechanismus fungující u všechny tumor supresorové geny, neplatí u všech dědičných forem nádorů. Proto Kinzler a Vogelstein (1997) tyto geny rozdělili na dvě skupiny: z angličtiny „gatekeeper“ a „caretaker.“ Vrátný - „gatekeeper“ je označení tradičního tumor supresorového genu, který přímo reguluje růst nádoru. Pokud jsou obě alely tohoto genu inaktivní, přispívají tak k neřízenému množení buněk (vznikne například nezhoubný adenom tlustého střeva). Strážce - „caretaker“ je naopak gen, který neřídí přímo buněčný cyklus, ale funguje jako „opravář“ poškozené DNA. Inaktivace obou alel těchto genů vede k neschopnosti buňky efektivně opravovat genetická poškození, tím se tato poškození v buňce kumulují a přispívají

k poškození dalších genů a nádorové progresi (Kinzler a Vogelstein, 1997). Nestabilita genomu vede k abnormalitám chromosomů (zlomy, změny v počtu chromosomů a četné mutace), postihující právě onkogeny a tumor supresory. Mutace těchto genů nezpůsobuje přímo schopnost nekontrolované proliferace, ale vlivem zvýšené frekvence a kumulace těchto drobných změn v protoonkogenech a tumor supresorových genech (100 – 1000) přispívají k maligním transformacím buněk (Jorde et al, 2000). Patří sem geny umožňující excizi poškozeného úseku DNA, jejichž recesivní mutací dochází k rozvoji kožní prekancerózy. Důležitou roli hrají také „mismatch“ opravné geny. Jimi kódované proteiny opravují chybné zařazení base při replikaci DNA na jednom vlákně. Mutací „mismatch“ opravných genů vzniká nestabilita na nukleotidové úrovni, tzv. mikrosatelitová instabilita, a jejich chybné párování vede k replikačním chybám. Instabilita mikrosatelitů byla popsána jako charakteristický fenotypový projev u řady nádorů – karcinomů prsu a plic, nádorů GIT, endometria, u meningiomů (Loeb, 1994). Chromosomální instabilita je pozorována u různých rakovin a může souviset s mitotickým kontrolním bodem hBUB1 (Cahill et al, 1998; Breivik a Gaudernack, 1999).

Epigenetické změny (demethylace, acetylace, methylace, fosforylace nebo jiné změny histonů), upravující histony tak, že zamezují aktivaci genové exprese, jsou dalšími důležitými hráči v rozvoji rakoviny (Balaguer et al, 2010; Daniel et al, 2011; Kanwal a Gupta, 2012). Důležitou součástí epigenetické regulace jsou také tzv. malé regulační RNA (mikroRNA, miRNA). O nich více v kap. 3.2.6.

3.2 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty (CaP, carcinoma prostate, zhoubný novotvar prostaty, ZN prostaty) a benigní hyperplazie prostaty (BHP) jsou nejčastější poruchy předstojné žlázy. Za vznikem onemocnění je vliv hormonů, poruchy proliferace buněk, poruchy apoptózy a také chronický zánět a stárnutí (Prajapati et al, 2013). V posledních deseti letech se naše znalosti patogeneze CaP, a to zejména z molekulárního hlediska, značně prohloubily a došlo k významnému posunu léčebné strategie. To však neznamená, že „medicína dostala tento nevyzpytatelný nádor pod kontrolu“ (Dvořáček, 2007). Prioritou současného výzkumu je nalézt markery, které umožní identifikovat pacienty s vysoce rizikovým CaP. Tedy s takovým karcinomem, který bude dále progradovat a odlišit je od těch, u kterých CaP metastazovat nebude. Tito pacienti by jednoznačně profitovali z chirurgické léčby. Právě výzkum těchto markerů je cílem mé diplomové práce.

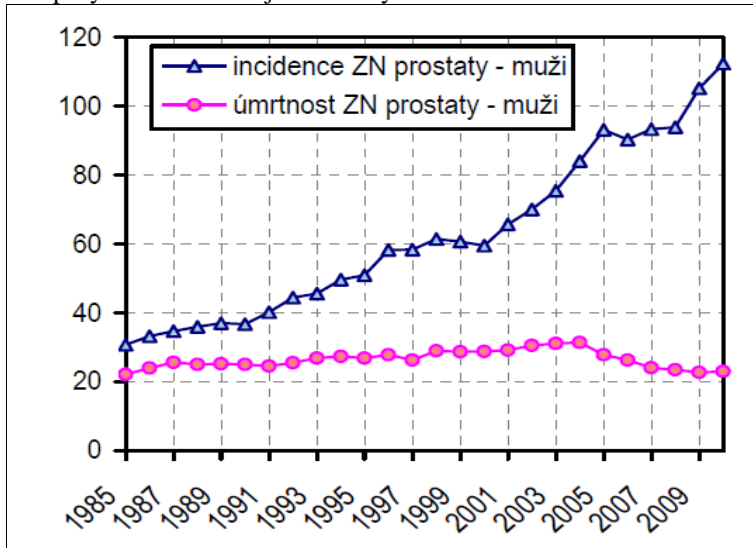
3.2.1 Epidemiologie karcinomu prostaty

Karcinom prostaty je nejčastějším nádorem mužů v Evropě a v Americe a třetí nejčastější příčinou úmrtí na maligní onemocnění (Balík a Brodčák, 2011). Jeho incidence roste každoročně již od 80. let 20. století, což také souvisí se zavedením screeningu CaP pomocí prostatického specifického antigenu (PSA, Prostate Specific Antigen). Rutinní stanovení hodnot PSA, vedoucí k odhalení časných stádií CaP, podstatně zlepšuje prognózu pacientů (Král et al, 2010). Z epidemiologických dat vyplývá, že nejvyšší incidence CaP je mezi afroameričany v USA, a dále mezi bělochy (zejména v Severní Americe a Skandinávii). Naopak nejnižší incidence byla zaznamenána u populace v jihovýchodní Asii (Balík a Brodčák, 2011).

Také v České republice je zhoubný novotvar prostaty (dg. C61 dle MKN-O-3, 2005) nejčastějším zhoubným nádorem mužů pravidelně již od roku 2005. V roce 2010 bylo hlášeno 6 771 případů karcinomu prostaty. Rok 2010 představoval oproti roku 2009 nárůst 10% a v přepočtu na obyvatele se jednalo o 131,2 případů na 100 tisíc mužů. Za rok 2009 byl hlášen meziroční nárůst oproti roku 2008 o 13%. Nárůst incidence CaP v ČR, pozorovaný již od počátku 90. let, po roce 2000 akceleroval a je vysvětlován stárnutím populace a především rutinním preventivním vyšetřováním hodnot PSA. Míra standardizované úmrtnosti na ZN prostaty po roce 2004 dlouhodobě klesala, pro rok 2009 stagnovala, v roce 2010 oproti roku 2009 stoupla z 22,8 na 23,1 zemřelých na 100 tisíc mužů (Evropský standard dle IARC, Lyon). Graficky je incidence a úmrtnost zobrazena na obrázku 1. Zajímavý je pohled na relativní pětileté přežití u pacientů diagnostikovaných

mezi roky 2001–2005 (83,3%) oproti období 2000-2004 (79,1%). Dle Ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) a Národního onkologického registru (NOR) to reflektuje nárůst nově diagnostikovaných případů s benigním průběhem (Zvolský, 2013; Novotvary 2009, Zemřelí 2011, Novotvary 2010).

Obr. 1: Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na zhoubný novotvar prostaty, na 100 tisíc mužů, evropský standard. Zdroj Novotvary 2010.



3.2.2 Prostata a patogeneze karcinomu prostaty

Prostata je uložena mezi močovým měchýřem a svalovým dnem pánve a z hlediska zón žláz se dělí na tři části. V největší periferní zóně, obklopující distální část močové trubice, vzniká až 70% karcinomů prostaty. Dalšími částmi jsou centrální (vnitřní) zóna a zóna přechodná, ze které může vznikat benigní hyperplazie prostaty (Čihák, 2002). K onemocněním prostaty patří zánět prostaty (prostatida), benigní hyperplazie prostaty, prekanceróza PIN a karcinom prostaty.

Benigní hyperplazie prostaty (BHP, adenomatóza, adenomyomatóza prostaty) je nezahubné zvětšení této žlázy přítomné u všech starších mužů, k němuž dochází působením hormonů (Veselský a Višňovský, 2005). BHP vzniká ve stromatu prostaty, které zvětšováním odtlačuje epitel do periferie za vzniku tzv. chirurgického pouzdra, z něhož pak může vznikat adenokarcinom prostaty (Veselský, 2004).

Intraepiteliální neoplastické změny vývodů acinů prostaty (prostatická intraepiteliální neoplasie, PIN) jsou také hormonálně dependentní a závisí na androgenech. V tomto prekancerózním stádiu dochází již k molekulárním změnám a přestavbám, na jejichž základě se rozvine samotný prostatický karcinom (Hes et al, 2006).

Věk je hlavním rizikovým faktorem zhoubného bujení. Incidence CaP s věkem roste, přičemž je nejvyšší v sedmé a osmé dekádě (Novotvary 2010; Balík a Brod'ák, 2011). Malá

milimetrová ložiska CaP jsou při pitvách nalézána často (u padesátiletých výskyt u 30%, u osmdesátiletých u 80%). Takový karcinom je latentní, benigní a klinicky nevýznamný. Protože mimo věk nejsou u CaP prokázány další rizikové faktory, není primární prevence možná (Hora et al, 2013). Je možné pouze tzv. předcházení klinické diagnózy u mužů s pozitivní rodinnou anamnézou nebo s prokázanou HG-PIN (Dvořáček, 2007) podáváním inhibitorů 5- α -reduktázy. Ve vztahu k CaP trh nabízí také celou řadu potravinových doplňků, např. s extrakty z palmy *Serenoae* (Tacklind et al, 2012), z kopřivy (Madersbacher et al, 2005), s obsahem lycopenu (Silberstein et al, 2013), vitamínu E nebo zeleného čaje (Yuan, 2013), to vše navzdory tomu, že jejich příznivý vliv na BHP i PIN současné práce neprokazují.

Pokud se CaP vyskytne v rodině muže u jednoho příbuzného, je riziko, že také onemocní třikrát vyšší. Pokud měli CaP dva příbuzní, zvyšuje se riziko rozvoje tohoto karcinomu dokonce pětikrát až jedenáctkrát. Hereditární závislost je autozomálně dominantní a bývá pravidlem, že CaP je v těchto případech diagnostikován v nižším věku (Babjuk a Matoušková, 2011).

3.2.2.1 Histopatologie karcinomu prostaty

Nenádorový prostatický epitel tvoří tři vývojově odlišné populace buněk (luminální, bazální a neuroendokrinní) a nesourodou populaci buněk intermediálních. Všechny tyto linie pocházejí z prostatických kmenových buněk. Většina prostatických tumorů jsou acinární karcinomy (klasický adenokarcinom) s různým stupněm diferenciací, diagnóza C61 (MKN-O-3, 2005). Histopatologicky se tento typ karcinomu, vyskytující se v několika morfologických variantách (tzv. atrofický, pseudohyperplastický, pěnitý neboli foamy, koloidní, z prstenčitých buněk etc.), prokáže u více než 95% (Hes et al, 2006). Adenokarcinom vychází z epitelálních buněk prostatických acinů. Méně častý je karcinom velkých periuretrálních prostatických vývodů - ductální karcinom, který má podtypy kribriformní, papilární a solidní (Hes et al, 2006; Sobin et al, 2009; Babjuk a Matoušková, 2011). Existují další velmi vzácné nádory prostaty, např. karcinomy mukózní, malobuněčný, sarkomatoidní či karcinom z přechodního epitelu (Sobin et al, 2009; Babjuk a Matoušková, 2011). Karcinom prostaty je charakteristický výskytem více různých ložisek, která se mohou navzájem lišit histopatologickým stupněm (Dvořáček, 2007).

Prekancerózou karcinomu prostaty jsou intraepiteliální neoplastické změny vývodů acinů prostaty (tzv. prostatická intraepiteliální neoplazie, PIN). V současné době rozlišujeme low-grade a high-grade PIN (LGPIN a HGPIN), které se mohou vyskytovat už v třetí dekádě

životu. V mladších věkových kategoriích se spíše vyskytují neoplázie low-grade, incidence HGPIN vzrůstá s věkem (viz kap. 3.2.1 Epidemiologie CaP). Tyto časně změny prostatického epitelu jsou hormonálně dependentní, závisí na androgenech. PIN je definována jako proliferace sekretorických buněk do lumen s cytologickými atypii, místy neodlišitelnými od buněk karcinomu. PIN lze zachytit ve třech základních růstových typech: V prvním buňky PIN nahradí normální epitel žlázek a zůstane zachována jen vrstva bazálních buněk. U druhého PIN invazivně roste přes stěnu ductu či acinu, zde bývá u HGPIN prokazována ahrupce bazální membrány. Ve třetím růstovém typu rostou buňky PIN mezi bazálními buňkami a buňkami sekretorické vrstvy. Sledováním celkové stavby jsou rozeznávány varianty „trsovité“ (tufting), mikropapilární, kribriformní a ploché (Hes et al, 2006). Jedná se o prekancerózu lokalizovanou především v periférii prostaty, která se často se vyskytuje multifokálně. Dle prof. Hese (2006) se v blízkosti adenokarcinomu PIN vyskytuje mnohonásobně častěji (až v 82 %) než v prostatě bez adenokarcinomu (ve 43 %). Zásadní význam pro histologické stanovení diagnózy je absence bazálních buněk, nálezy infiltrativního růstu a nádorové invaze (Lukeš, 2013). Rozeznání neoplasie od karcinomu může být v některých případech velmi složité, obzvláště z omezených bioptických vzorků (Hes et al, 2006). Pacientovu prognózu odráží stupeň diferenciacce buněk a další parametry, přičemž v praxi se pro hodnocení karcinomu v současnosti aplikuje Gleasonův systém (Epstein et al, 2005). O klasifikaci pojednává kap. 3.2.3.

3.2.2.2 Patogeneze karcinomu prostaty na molekulární úrovni

Přestože za desetiletí práce vědci objevili řadu poznatků o patogenezi karcinomu prostaty na molekulární úrovni, patří tato oblast k těm méně objasněným (Taylor et al, 2010). Přesnější porozumění sledu mutací a jejich načasování by zlepšilo klasifikaci tohoto nádoru, a to zejména z hlediska jeho agresivity, kterou nyní postrádáme (Frank a Miranti, 2013).

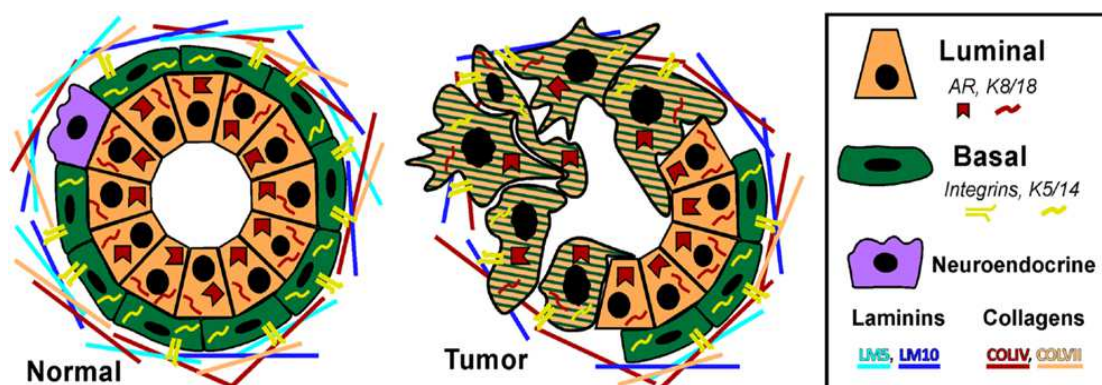
Prostatický epitel je organizován jako dvouvrstva bazálních a luminálních buněk s občasným nálezem integrovaných neuroendokrinních buněk (obrázek 2). Epitelium obklopuje matrix z lamininu (LM5, LM10) a kolagenu (COLIV, COLVII) a také fibromuskulární stromatické buňky, které převádí signály k regulaci epitelia (Cunha, 2008). U prostatického epitelu jsou známy markery pro jednotlivé vrstvy, např. bazální vrstva je charakteristická přítomností p63, bazálními keratiny (K5, K14) a integriny ($\alpha 6\beta 4$, $\alpha 3\beta 1$). Luminální vrstva obsahuje markery TMPRSS2, luminální keratiny (K8, K18) a androgenní receptor (Frank a Miranti, 2013). V imunohistochemii se těchto poznatků využívá pro diagnostiku u komplikovaných nebo nejasných případů (Hes et al, 2006).

Adenokarcinom prostaty je hormonálně dependentní nádor (Huggins, 1947), neboť proliferace prostatického epitelu je řízena testosteronem (T) a především 5- α -dihydrotestosteronem (DHT). V důsledku této hormonální závislosti prostata zvětšuje svůj objem s věkem (Lukeš, 2013). Androgeny z kůry nadledvin a testosteron (Leydigovy buňky varlete) mohou být v periferních tkáních a v prostatě enzymaticky konvertovány nebo účinnější na DHT (Klener a Klener jr., 2010). DHT vznikající v 90% případů konverzí testosteronu 5- α -reduktázou (5AR) se na povrchu epiteliálních prostatických buněk váže na androgenní receptory (AR), je transportován do buňky a ovlivňuje tak geny kontrolující buněčné dělení (Klener a Klener jr., 2010; Babjuk a Matoušková, 2011; Pešta a Kulda, 2012). Androgeny většinou působí stimulačně také na sekreci růstových faktorů (např. epiteliální EGF, transformační TGF- β , fibroblastický FbGF), čímž se vysvětluje inhibiční účinek androgenní deprivace, která způsobuje urychlení apoptózy normálních a nádorových buněk prostaty citlivých na androgeny (Lukeš, 2013).

V normálním sekrečním epitelu je AR potřeba pro udržení sekreční funkce, ale u nádorových buněk na něm závisí jejich proliferace a přežití. CaP v zásadě závisí na signalizaci AR, může však růst i bez hormonální stimulace. Je to dáno heterogenitou buněčných klonů, která vzniká již na počátku maligní transformace. Mutace AR jsou u primárních nádorů vzácné. Pokročilé nádory jsou již hormonálně nezávislé a rezistentní vůči kastraci vzhledem k přítomnosti řady změn signalizace AR (Bluemn a Nelson, 2012; Tsao et al, 2012; Waltering et al, 2012). Prostatický karcinom charakterizuje ztráta bazálních buněk a snížená diferenciací matrix (tzn. ztráta LM5 a COLIV). Nádorové buňky často působením AR imitují buňky luminální a exprimují integriny ($\alpha 6\beta 1$), které usnadňují jejich růst a proliferaci (Cress et al, 1995; Lamb et al, 2011), dále bazální i luminální keratiny K5 a K8 (Schalken a van Leenders, 2003; Verhagen et al, 1992), a další bazální markery nádorových buněk, např. Bcl2, EGFR a Met (de Muga et al, 2010; Peraldo-Neia et al, 2011; Lamb et al, 2010; van Leenders et al, 2002; Carvalho et al, 2010; McDonnell et al, 1992). Současná exprese luminálních i bazálních povrchových znaků buňky CaP podporuje hypotézu vniku nádorového růstu narušením drah diferenciací buněk, při níž je deregulována exprese bazálních a luminálních znaků při diferenciaci buněk. Bazální i luminální prostatické buňky vznikají procesem transientní diferenciací nebo amplifikace z buněk progenitorových nebo kmenových (Schalken a van Leenders, 2003; Isaacs a Coffey, 1989; De Marzo et al, 1998; Tokar et al, 2005).

Některé geny, jejichž exprese je pozměněna u CaP, se běžně účastní diferenciací epitelu. Předpokládá se tedy, že v prostatě dochází k onkogenezi jakožto k poruše diferenciací epitelu.

Obr. 2: Grafické znázornění nenádorového a rakovinného prostatického epitelu s vyznačením jednotlivých buněk s markery a složení matrix. Zdroj Frank a Miranti, 2013



Kromě změn **AR** jsou v pokročilých nádorech karcinomu prostaty nalézány tři časté genetické změny: zvýšená exprese **Myc**, ztráta nádorového supresoru **PTEN** a fúze genů **ETS** s **AR** regulovanými promotorovými sekvencemi - **TMPRSS2:ETS/ERG** (Tomlins et al, 2005; da Silva et al, 2013).

Především je u CaP velmi dobře známa upregulace **Myc**. **Myc** je studovaným onkogenem, který reguluje expresi tisíců cílů, včetně genů potřebných pro růst buněk a buněčného cyklu. U myši způsobuje nadměrná exprese **Myc** vznik adenokarcinomu, ne však tvorbu metastáz (Ellwood-Yen et al, 2003). Také se ukázalo, že mezi rodinami proteinů **AR** a **Myc** dochází k interakcím. Byl tím podpořen model androgenní kontroly mRNA androgenního receptoru interakcí **AR** a **Myc** přes jedinečnou **AR**-responsivní oblast dlouhou 350 bp (Grad et al, 1999). Gen **Myc** je u CaP běžně amplifikován a hladina **Myc** proteinu koreluje se špatnou prognózou (Koh et al, 2010).

U CaP je častá ztráta tumor supresoru **PTEN**, který působí jako negativní regulátor dráhy **PI3K/AKT/mTOR** (Deocampo et al 2003). Nejméně jedna kopie lokusu **PTEN** je ztracena až v 65% onemocnění, a dále u 60% karcinomů pozdního stádia je úplná ztráta tohoto proteinu (Gray et al, 1998; Song et al, 2012). Signální dráha **PTEN/PI3K/AKT/mTOR** reguluje apoptózu, metabolismus, buněčnou proliferaci a růst buněk. **PTEN** (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) inhibuje tvorbu **PIP3** (phosphatidyl-inositol 3,4,5 triphosphate), produktu **PI3K** kinázy. Nárůst **PIP3** vede k přesunu kinázy **AKT** k membráně, kde je aktivována další kinázou závislou na **PIP3**. Aktivace **PI3K** a **AKT** jsou nalézány u rakoviny prsu, vaječníků, slinivky, jícnu a dalších, což podporují studie na myších modelech (Sun et al, 2001). Aktivní **PI3K/AKT/mTOR** dráha neinhibovaná molekulou **PTEN** přispívá k tumorigenezi a v interakci s dalšími onkogeny přispívá k procesu tumorigeneze (Blanco-Aparicio et al, 2007). Ve tkáních se typu **HGPIN** dochází ke snížení exprese tumor supresorového genu **PTEN**. Takto změněná tkáň pokročilého **HGPIN** se mění v CaP, zvyšuje

se exprese AR, cMYC a EZH3, snižuje exprese p53 a vzniká pokročilý CaP (Jaworski, 2006; Lin et al, 2004; Frank a Miranti, 2013)

Dalším častým jevem u CaP je aktivace transkripčních faktorů **ETS**. Nejčastěji fúzí proonkogenů z rodiny transkripčních faktorů ETS (ERG, ETV1, ETV4) s androgeny řízeným promotorem proteasy TMPRSS2 (Tomlins et al, 2005 a 2007; Clark a Cooper, 2009). Fúze **TMPRSS2:ERG** je pozorována nejméně u poloviny nádorů prostaty (Tomlins et al, 2005; Lapointe et al, 2007; Perner et al, 2007; Demichelis et al, 2007; Furusato et al, 2008). Identifikace dalších fúzí z AR-řízených promotorů a dalších členů rodiny ETS podporuje zjištění, že je tato přestavba faktorem vývoje CaP (Tomlins et al, 2008; Sun et al, 2008; Wang J. et al, 2008; Kumar-Sinha et al, 2008; Palanisamy et al, 2010; Yu et al, 2010). Nejčastěji vznik fúzního genu TMPRSS2:ETS probíhá v neoplazii HGPN (Klener a Klener jr., 2010). Této problematice je věnována kap. 3.2.5.2.

Frank a Miranti (2013), chápou diferenciaci zodpovědnou za vznik ložiska CaP v prostatě jako tzv. tranzientní diferenciaci bipotentních epiteliálních buněk, na níž se podílí exprese genů Notch a p38. Předpokládají, že „volbu“ bipotentních buněk diferencovat směrem k sekrečnímu typu určuje stromální KGF (FGF7) aktivací p38 přes FGFR2b a MKK signalizaci (Lukacs et al, 2008). Protein p38 přispívá k deregulaci exprese genů Myc a PTEN, transkripčních faktorů a mRNA stabilizujících proteinů. Notch se podílí na snižování adheze buněk, a má tak nepřímo podíl na zvyšování exprese AR (Mazzone et al, 2010), neboť stabilní exprese proteinu AR vyžaduje ztrátu buněčné adheze (Lamb et al, 2010).

Heterogenní genetická instabilita vlivem retrovirových infekcí (Dong et al, 2007), poruchy ve stromatu prostaty a vliv širokého spektra kancerogenů způsobují tzv. „field effect“ (Slaughter et al, 1953), při němž se transformované buňky v čase mění na morfologicky prokazatelné buňky karcinomu (Harding a Theodorescu, 2000). V současnosti jsou intenzivně zkoumány tři typy **epigenetických změn** u CaP, a to metylace DNA, remodelace chromatinu a regulace genové exprese molekulami mikroRNA (Pešta a Kulda, 2012). Celková hypomethylace cytosinů u metastazujícího CaP vede k chromosomální instabilitě a progresi onemocnění (Jerónimo et al, 2011). Na druhé straně dochází během patogeneze CaP k hypermethylaci genů účastnících se kontroly buněčného cyklu, oprav DNA, hormonální odpovědi, apoptózy a také k hypermethylaci promotorů určitých genů kódujících miRNA. K rozvoji CaP přispívá dále remodelace chromatinu a postranlační modifikace histonů (Tsang a Cheng, 2011).

Posledních patnáct let je intenzivně studován význam malých molekul RNA v regulaci genové exprese nádorových onemocnění. První práce věnující se expresi miRNA u CaP je z

roku 2007 (Porkka et al, 2007). Jev původně nazývaný postranskripční silencing genů (PTGS) se podílí také na nádorové transformaci inhibicí translace nebo snižováním stability cílové mRNA regulovaného genu (Pešta a Kulda, 2012). Porovnáním exprese miRNA mezi maligními a benigními buňkami prostaty byla nalezena řada molekul miRNA se sníženou nebo zvýšenou expresí. Na základě dalších výsledků se pozornost u karcinomu prostaty soustřeďuje na roli miRNA ve vztahu ke schopnosti nádorových buněk zabránit apoptóze a dále na ovlivnění androgenní signalizace molekulami miRNA. Více viz kap. 3.2.6.

Další progresí karcinomu prostaty dochází k jeho metastazování a to přednostně do kostní dřeně (Jacobs, 1983) a tento pokročilý metastatický karcinom je zatím nevyléčitelný. Mikroprostředí kostní dřeně pomáhá buňkám CaP k růstu (Galasko, 1981; Jacobs, 1983; Body, 1992) a umožňuje uchycení se a extravazaci (Scott et al, 2001). Nádorové buňky se vážou na endotel (Zetter, 1990) nejprve lektin-sacharidovými interakcemi a následně vazbou přes integriny na povrchu epiteliálních buněk a buněk kostní dřeně (Honn and Tang, 1992; Soligo et al, 1990; Nagle et al, 1994; Rokhlin and Cohen, 1995). Primární prostatický epitel ve stromatu kostní dřeně vykazuje zrychlený růst a především integrin $\alpha 2\beta 1$ má podíl na navázání primární prostatické epiteliální buňky do stromatu dřeně (Lang et al, 1997 a 1998). Nové důkazy s potenciálním přínosem pro léčbu metastatického CaP svědčí o tom, že nádorové prostatické buňky se primárně usidlují v niche hematopoetických kmenových buněk (Pedersen et al, 2012).

3.2.3 Diagnostika a léčba karcinomu prostaty

Časná a přesná diagnostika karcinomu prostaty je pro jeho léčbu zásadní. Lokalizovaný CaP lze léčit, kdežto generalizovaný karcinom prostaty je současnými postupy nevyléčitelný. Při snaze zlepšení diagnostiky karcinomu prostaty je potřeba hledat metody, které by odlišily agresivní karcinom od klinicky indolentního.

3.2.3.1 Diagnostika

Diagnostika karcinomu prostaty se v průběhu posledních padesáti let značně zdokonalila. Více než polovina odhalených CaP je v raném stádiu, low-risk tumor, a tím se podstatně zlepšuje pacientova prognóza (Král et al, 2010).

Ačkoliv je pečlivé palpační vyšetření prostaty *per rectum* (digital rectal examination, DRE, česky DRV) považováno za velmi důležitý vyšetřovací krok bezmála půl století (Connolly, 1965), pro detekci skutečně časných stádií CaP je dnes již nedostatečné. To proto, že iniciální karcinom je nehmatný nebo jej lze rozpoznat pouze jako drobný uzel, neboť nádor

může být palpačně rozpoznatelný od velikosti 0,2 ml. Tvrdá a hrbolatá prostata indikuje již pokročilý karcinom.

Transrektální ultrasonografie (TRUS) představuje u CaP průlomovou vyšetřovací metodu, která dokáže objevit malé nádory a navíc s její pomocí lze zhodnotit extrakapsulární šíření tumoru. Histologické potvrzení diagnózy je nezbytnou nutností před zahájením léčby (Štern et al, 2008). Biopsie se v současnosti provádí transrektálně (event. transperineálně) TRU-CUT jehlou za ultrazvukové kontroly (Connolly, 1965; Babjuk a Matoušková, 2011; Hora et al, 2013). Zavedení prostatického specifického antigenu (PSA) do diagnostiky CaP v roce 1988 znamenalo velký pokrok a začátek tzv. PSA éry. Nevýhodou je nízká specifita PSA (asi 40%) vedoucí k nárůstu počtu negativních biopsií (Dvořáček, 2007). Pro předpovězení tendence nádoru k progresi a metastazování je u CaP potřeba hledat nové biomarkery (Racek et al, 2006).

Screening pro záchyt časného stádia nádoru prostaty je vhodné provádět od 45 nebo 50 let věku (Hora et al, 2013, resp. Dvořáček, 2007). Univerzální schéma screeningu totiž neexistuje. Statisticky na jeden zachráněný život připadá screening 1068 mužů a potřeba léčby 48 z nich. Proto není rutinní screening zatím doporučován žádným státem (Hora et al, 2013), neboť jeho přínos nebyl studiemi nezvratně potvrzen (Dvořáček, 2007).

3.2.3.2 Histopatologická klasifikace

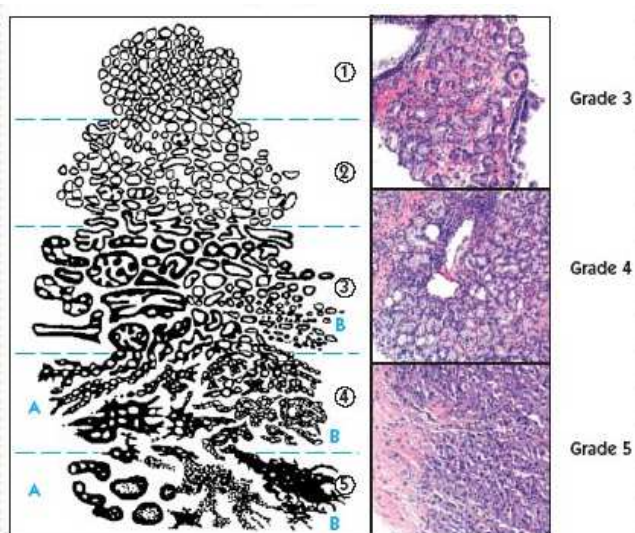
Od stupně diferenciacie tumoru a jeho dalších parametrů se odvíjí pacientova prognóza a určuje léčba. V systému pTNM jsou podle Mostoffiho rozlišovány čtyři stupně buněčné anaplázie (diferenciacie). V lékařské praxi se pro hodnocení v současné době využívá také Gleasonův systém (Epstein et al, 2005).

Americký patolog Donald Gleason navrhl v roce 1966 systém hodnocení prostatického adenokarcinomu na základě morfologických vlastností žlázek a celkové architektiky nádorové tkáně. Tzv. **Gleason systém** (Gleason Grading system) dělí nádory podle stupně anaplázie (diferenciacie) do pěti kategorií. Gleason grade (také Gleasonův stupeň nebo Gleason Pattern) se pohybuje mezi 1 a 5, přičemž 5 představuje nejhorší prognózu, Gleason skóre (neboli Gleasonův součet, Gleason Sum, GS) se tedy pohybuje mezi 2 a 10 (Epstein et al, 2005; Hes et al, 2006). Patolog ohodnotí vzorek Gleasonovým skórem (*), což je součet dvou hodnot, z nichž první určuje stupeň nejčtenějšího stádia karcinomu ve vzorku a druhá nejvyšší stupeň. Např. pokud je většina tkáně ve vzorku stupně 3, ale některé buňky typu 4, je Gleason skóre $3+4 = 7$ (Epstein et al, 2005; Hora et al, 2013).

(*) Zde je změna v systému hodnocení, neboť zavedením nového Gleason systému v roce 2005 představovala první hodnota nejčtenější stupeň ve vzorku a druhá po ní následující stupeň anaplázie. (Gleason, 1997; Epstein et al, 2005)

Adenokarcinomy se vyskytují od dobře diferencovaných (Gleason skóre 2-4) až po anaplastické (Gleason skóre 10), přičemž se horší prognóza pojí s méně diferenciovanými, anaplastickými strukturami (Hora et al, 2013). Protože mikroskopické hodnocení patologem je proces časově náročný a do značné míry subjektivní (interobservační reprodukovatelnost je i mezi odborníky vysoce variabilní, 36–81% pro přesnou shodu, 69–86% u shody plus nebo minus o jednu jednotku Gleason skóre), je zde trend odečet automatizovat. Automatické hodnocení vzorků probíhá např. frakční analýzou variace intenzity a textury ve zkoumané oblasti preparátu (Cintra et al, 1991; Özdamar et al, 1996; Montironi et al, 2005; Huang a Lee, 2009).

Obr 3: Diagram Gleason grading systému, HE 200x. Převzato z O'Dowd et al, 2001.



Obecně pro nejčastěji se vyskytující acinární adenokarcinom platí zásada průkazu bazální vrstvy epitelů ve žlázkách. Problémem je rozlišení dobře diferencovaného adenokarcinomu od benigní prostatické žlázy. Nejdůležitějším úkolem patologa je stanovit stádium a grading tumoru.

Problematika určení vzorku z punkční biopsie spočívá v množství tkáně nebo v jejím poškození. Bazální vrstvu epitelů v nenádorovém acinu kryjí sekretorické buňky, které v základním HE barvení ztěžují její rozlišení. Pro potlačení subjektivního hodnocení je možné využít barvení protilátkou proti vysokomolekulárním cytokeratinům (34E12 - tzv. K 903) nebo markerem p63. Obvykle se odebírá 6 až 12 válečků tkáně o délce kolem 1-1,5 cm. Přestože jde o relativně velké množství tkáně, CaP bývá zachycen někdy v limitovaném množství, nelze stanovit jednoznačnou diagnózu a je nutné odběr opakovat (Hes et al, 2006).

Staging karcinomu prostaty se provádí dle TNM klinické klasifikace. Klasifikační systém TNM se používá pro většinu solidních tumorů již od počátku 50. let 20. století (Gabriel et al,

2004; Sobin et al, 2009). Staging T kategorie hodnotí primární nádor: TX – primární nádor nelze hodnotit, T1 – tumor je nehmátný (verifikován pouze biopsií při elevaci PSA či náhodně při TURP), T2 – tumor je omezen na prostatu, T3 – tumor prorůstá přes prostatickou kapsulu, T4 – tumor prorůstá do okolních orgánů. Regionální mízní uzliny, zde uzliny v malé pánvi, se z hlediska metastáz nádoru hodnotí stupni NX, N0, N1. Vzdálené metastázy karcinomu prostaty jsou klasifikovány obdobně MX, M0 a M1, s podskupinami podle místa lokalizace. Podrobně viz Příloha 1, kde je celá klasifikace TNM-09 pro karcinom prostaty (Sobin et al, 2009).

Lokálně roste CaP do prostatické kapsuly a ostatních přilehlých struktur. Význam uzlinových metastáz (Batson et al, 1940) se ukázal až s rozvojem zobrazovací metody lymfografie, která odhalí metastázy i když někdy ložisko karcinomu nepřerůstá pouzdro prostaty (Shridhar et al, 1979). Ve více než 80% vytváří karcinom prostaty osteoblastické metastázy, nejčastěji jsou nalézány metastázy v axiálním skeletu, velmi často metastazuje do měkkých tkání.

3.2.3.3 Léčba

Optimální léčba CaP zahrnuje radikální prostatektomii (RAPE), radioterapii (RT), hormonální terapii (HT) a metodu aktivního sledování. Volba léčebné metody se odvíjí nejen podle stádia a gradingu tumoru, ale i např. od místních standardních postupů, individuálního soudu lékaře, preference pacienta, jeho věku a celkového zdravotního stavu (Balík a Brod'ák, 2011; Soumarová et al, 2012).

Operace RAPE jsou prováděny podle celosvětově známých a ověřených technik (Mikhail et al, 2006). Nutnost pánevní lymfadenektomie a nervy-šetřících principů prostatektomie byly popsány Walshem (1983) a způsobily rozšíření retropubické radikální prostatektomie, která vystřídala radikální prostatektomii z roku 1904 (Young, 1940). RAPE se provádí také ve variantě laparoskopické a jako roboticky asistovaná, přičemž každá z nich má svá pozitiva i negativa (Dvořáček, 2007; Balík a Brod'ák, 2011). Podle některých zdrojů redukuje prostatektomie úmrtnost na lokalizovaný CaP více, než pozorné vyčkávání (Bill-Axelson et al, 2011). Jiné randomizované studie tento přínos nepotvrzují (Wilt et al, 2012).

Zevní aktinoterapie (radioterapie) je vhodná pro pacienty s lokalizovaným karcinomem prostaty, a také u ní se mohou vyskytnout komplikace v podobě hematurie či erektilní dysfunkce (Jarolím, 2005). Přínos adjuvantní aktinoterapie po RAPE provedené u pT3 CaP byl prokázán (Bolla et al, 2012).

možnosti hormonální léčby: nevratná chirurgická bilaterální orchiektomie, medikamentózní léčba pomocí LHRH agonistů, antiandrogenů a estrogenní terapie (Huggins, 1942; Huggins,

1972; Dvořáček, 2008). S dobrými výsledky zaváděný abirateron působí selektivní ireverzibilní inhibicí cytochromu P450 (CYP17A1), čímž zabraňuje syntéze testosteronu i u nemocných po kastraci (Antonarakis a Eisenberg, 2009). Antiandrogeny (steroidní či nesteroidní) kompetitivní inhibicí brání vazbě testosteronu a dihydrotestosteronu na buněčné receptory (Klener a Klener jr., 2010). Adjuvantní nebo neoadjuvantní chemoterapie na bázi mitoxantronu a docetaxelu v kombinaci s kortikoidy má dobré výsledky (Berthroid et al, 2008). Časné adjuvantní podání bicalutamidu ke standardní péči prodloužilo dobu přežívání bez recidivy CaP (McLeod et al, 2005). Androgenní blokáda je léčba LHRH analogy aplikovaná na pokročilé nádory nebo adjuvantně u odoperovaných pacientů se středním rizikem. Špičky v oboru apelují na cílenější aplikaci hormonální léčby (Dvořáček, 2008) a Česká urologická společnost pravidelně vydává konkrétní doporučení (Vyzula et al, 2011; Babjuk et al, 2013).

Poměrně novou metodou je biologická léčba prostaty s efektem inhibice angiogenze (Klener a Klener jr., 2010). Slibné by mohlo být také zacílení na prostatický fúzní gen TMPRSS2:ETS, podobně jako první úspěšný lék cílené genové terapie Imanitib, který inaktivuje fúzní protein BCR:ABL u chronické myeloidní leukémie (Druker et al, 2001). Chemoprevence inhibitory 5- α -reduktázy má opodstatnění u mužů s pozitivní rodinnou anamnézou. Finasterid inhibuje izoenzym 5AR 2. typu, který převažuje u CaP, kdežto dutasterid je inhibitorem izoenzymu typu 1. i 2 (Dvořáček, 2007).

Tab. 1: D'Amicova kritéria hodnocení rizikovosti CaP. Podle Král et al, 2008.

Riziko progresse	Klinické stádium	Iniciální PSA	Gleason skóre
nízké	T1c-T2a	<10 ng/ml	≤6
střední	T2c-T2c	10-20 ng/ml	7
vyšoké	T3a	>20 ng/ml	>7

Obecně nemocní s nízkým rizikem rekurence bývají léčeni monoterapií (RT, RAPE) nebo jsou pouze pečlivě sledováni (Dušek et al, 2010). Pacienti se středním rizikem (dle histologie T2b-c nebo GS 7 nebo PSA 10–20 ng/ml) bývají léčeni radikální prostatektomií nebo radikální radioterapií s krátkodobou hormonální manipulací. U pacientů s očekávanou délkou přežití více než 10 let a s nízkým stádiem se doporučuje radikální prostatektomie (Connolly, 1965).

Indolentní karcinomy v časných stádiích bývají však zřídka příčinou smrti a postižení zpravidla zemřou z jiných nesouvisejících příčin (Ip et al, 2011). Takový CaP aktivní léčbu nepotřebuje a je pro pacienty dokonce zbytečná a komplikacemi poškozují kvalitu jejich života (Dvořáček, 2007).

U nádoru lokálně pokročilého (pT3-4 stadia T3a nebo GS \geq 8 nebo PSA > 20 ng/ml) se indikuje radioterapie nebo kombinace hormonální terapie s radioterapií (D'Amico et al, 2004 a 2008). Pacientům s generalizovaným CaP se podává samostatná hormonální léčba a léčba druhé linie. Lokálně pokročilé a generalizované onemocnění nelze vyléčit, neboť lze ovlivnit pouze symptomy a maximálně prodloužit přežití na 1 až 3 roky (Balík a Brodák, 2011).

3.2.4 Nádorové markery u karcinomu prostaty v praxi

Karcinom prostaty stejně jako jiné maligní nádory produkují molekuly, které souvisí s vlastním nádorovým růstem. Označujeme je jako nádorové markery nebo obecněji biomarkery. Jejich hladina v biologických tekutinách souvisí s vlastnostmi tumoru a také s jeho vaskularizací a rychlostí přestupu (Klečka et al, 2010a). Detekce probíhá na principu imunohistochemie pomocí imunoanalytických metod nebo metodami molekulární biologie (Schneiderka et al, 2004). Tzv. diagnostický práh nádorových markerů se může v ideálním případě blížit 1 mg nádorové masy, což odpovídá 106 maligním buňkám. Senzitivita by měla dosahovat alespoň 75–97 % (Petruželka et al, 2003). Specifita je v současné době vyžadována EGTM (European Group For Tumor Markers) na úrovni 95 %, výjimečně na 90 %. Nádorové markery se využívají k časnému záchytu onemocnění (screening), sledování průběhu onemocnění a hodnocení efektu léčby.

3.2.4.1 Prostatický specifický antigen

Jak již bylo zmíněno, většina případů CaP je dnes diagnostikována z krve určením hladiny makreru PSA. Prostatický specifický antigen (PSA, prostatic specific antigen) je serinová proteasa, kterou produkují lumenální buňky prostaty. Jeho funkcí je pravděpodobně štěpení větších proteinů v ejakulátu (Hara et al, 1971; Li a Beling, 1973; Sensabaugh, 1978; Wang et al, 1979). Koncentrace PSA v séru koreluje s objemem žlázy a také s rozsahem nádoru. Jelikož je to orgánově specifický marker pro prostatickou tkáň, stoupá jeho hladina výrazně především u karcinomu prostaty. Vyšší hladina PSA doprovází také jiné choroby, nejběžněji benigní hyperplazii prostaty nebo prostatitidu (Stamey et al, 1987). Obdobný nález může být způsoben i palpací *per rectum*, katetrizací močového měchýře nebo dokonce delší jízdou na kole. Především u generalizovaných nádorů jsou hodnoty PSA velmi vysoké, takže i do určité míry kvantifikují míru postižení (Duffy, 1996; Hora et al, 2013; Racek et al, 2006).

PSA je kódován genem na lidském chromosomu 19 (6 kb) a je vysoce podobný pankreatickému/renálnímu kalikreinu (hK1) a prostatickému specifickému glandulárnímu kalikreinu (hK2). PSA je někdy označován jako hK3 (Kumar et al, 1996) a má více podob s různou aktivitou (Lovgren et al, 1997). Aktivní PSA se v plazmě váže na inhibitory proteas (α_1 -makroglobulin a převážně α_1 -antichymotrypsin), a tak se pouze malé množství enzymu vyskytuje nevázané (Leinonen et al, 1996; Stenman 1997).

Od zavedení testování na PSA do klinické praxe v roce 1988 se již mnohé změnilo, specifická stanovení maligního onemocnění zvýšilo zavedení dalších kritérií, a to podle následujících pravidel (Dvořáček, 2007; Hora et al, 2013):

Sensitivita PSA při rozhodovací mezi (cut-off) 4 ng/ml je 21% pro detekci žádného prostatického karcinomu a 51% pro detekci pokročilého CaP. U rozhodovací meze 3 ng/ml se sensitivita zvyšuje na 32% resp. 68%. Specifická PSA je 91% u cutoff 4 ng/ml a 85% u hladiny 3 ng/ml (Meigs et al, 1996). Jako orientační normální hodnota se tedy uvádí celkový PSA (total – tPSA) v rozmezí <2,5 až 4 ng/ml a vyšší hladina již může indikovat CaP (Catalona et al, 1993; Crawford et al, 1996; Casanova-Salas et al, 2012). Hodnoty 4-10 ng/ml představují tzv. šedou zónu, kdy se karcinom prostaty nalezne u přibližně 25%, ale častěji se histologicky potvrdí BPH. Celoplošně rozšířené užívání PSA testu vede k rostoucím počtům provedených „zbytečných“ biopsií. Z několika EBM studií je známo, že téměř čtvrtina nemocných s CaP má hodnotu PSA nižší (Oliveira et al, 2010). Je zde však také signifikantní počet diagnostikovaných CaP s hladinou PSA nižší než 4 ng/ml, odhaduje se asi 20-30%, které mohly vést k rozvoji nediodagnostikovaného onemocnění (Schröder et al, 2000). Při hodnotách >10 ng/ml je již nádor velmi suspektní a je následně potvrzen až u 60% pacientů. Hladiny PSA nad 30 µg/l mohou signalizovat i vzdálenější metastázy (Valík et al, 2008).

Ke zvýšení specifity vyšetření se užívá stanovení poměru volného PSA (free-PSA, fPSA) a celkového PSA – f/tPSA, které se udává v procentech, přičemž čím vyšší je fPSA (ideálně nad 25%) tím nižší riziko karcinomu (Herschman et al, 1997; Valík et al, 2008). PSAV (přírůstek hodnoty PSA za jeden rok) je považován za ukazatele rizikovosti CaP v období před stanovením diagnózy. Když hodnota PSAV v tomto období přesahuje 2 ng/ml/rok, je karcinom vysoce rizikový (D'Amico et al, 2004). Jiné studie názory o přínosu PSAV nesdílí (Vickers et al, 2011; Johnston a Terris, 2011; Phillips, 2011). PSA denzita (PSAD) vypočítaná jako podíl hodnoty PSA a sonograficky stanovené hmotnosti prostaty, řeší částečně problém nestejně velikosti žlázy a hladin v séru u různých pacientů (Dvořáček, 2007). Nově a s dobrými výsledky se zavádí PHI (prostate health index), což je výsledek vztahu $(\text{proPSA}/\text{fPSA}) \times \sqrt{\text{PSA}}$ (Fillela et al, 2013).

Protože samotná biopsie, ale především léčba CaP přináší pro pacienta řadu komplikací, jsou hledány markery schopné předpovědět progresi a generalizaci onemocnění, identifikovat ty karcinomy prostaty, které budou dále progradovat (Racek et al, 2006). Ačkoliv je PSA výborným markerem pro sledování pacientů po radikální prostatektomii, není optimálním markerem pro diagnostiku CaP (Casanova-Salas et al, 2012). Zbytečně diagnostikovaných karcinomů prostaty se u samostatného PSA screeningu odhaduje asi na 50% (Bretthauer a

Kalager, 2013), proto společně s relativně nízkou mírou mortality CaP je řada urologů a onkologů ke screeningu skeptická (Moyer, 2012).

3.2.5 Nové nádorové markery u karcinomu prostaty

Jak již bylo řečeno, nízká specificita široce využívaného markeru PSA je důvodem pro intenzivní hledání markerů, které by umožnily identifikovat dále progradující karcinomy a umožní tak části mužů vyhnout se biopsii či případně radikální prostatektomii. Rozlišení nízko a vysoce-rizikového CaP je v současnosti obtížné (Cuzick et al, 2006). V konzervativním přístupu aktivního vyčkávání mohou být agresivní nádory pro svoje malé rozměry diagnosticky podhodnoceny (Bangma et al, 2007). V klinické praxi se zatím využívá detekce RNA genu PCA3.

3.2.5.1 PCA3

PCA3 je zkratka pro marker Prostate Cancer Antigene 3, který lze v literatuře také často najít pod názvem DD3 (Differential Display Code 3), nebo v podobě DD3^{PCA3}, DD3/PCA3. Jedná se o gen lokalizovaný na chromosomu 9q21-22, který je těsně a specificky svázán se vznikem CaP. Jeho funkce není dodnes objasněna, nebyl nalezen jeho proteinový produkt, pouze mRNA, která je považována za nekódující vzhledem k nepřítomnosti open reading frame a velkému množství stopkodonů (Bussemakers et al, 1999). Řadí se nově mezi tzv. long noncoding RNA, lncRNA (Perkel et al, 2013). Charakteristika transkripce PCA3 odhalila alternativní sestřih a alternativní polyadenylaci. Orgánová a nádorová specifická jejich předurčují jako specifický marker pro CaP. Analýzou normálních a nádorových tkání prostaty byla identifikována výrazná overexprese genu PCA3 u 95% karcinomů ve srovnání s nenádorovými prostatickými tkáněmi stejných pacientů (Klečka et al, 2010b). Také se ukázalo, že PCA3 je vysoce specifický pro CaP, neboť nebyl signifikantně v jiných typech nádorových i nenádorových tkáních nalezen (Bussemakers et al, 1999). V roce 2002 byl navržen způsob detekce PCA3 jakožto diagnostického a prognostického markeru (de Kok et al, 2002). Srovnáním genu spojeného s telomerázovou aktivitou (hTERT) a PCA3 se ukázalo, že zatímto hTERT je u karcinomu exprimován 10x více, PCA3 až 5849x více.

Tato skupina doporučila klinické využití při analýzách z krve, moči, ejakulátu nebo tkáňových biopsií, které bylo dále zlepšováno (Hessels et al, 2004; Fradet et al, 2004; Tinzi et al, 2004). Později byla zavedena PCA3 assay s kvantitativním stanovením kopií mRNA. Metoda má dobrou senzitivitu a je ji možno provádět v klinické laboratoři stanovením ve vzorcích moči (Groskopf et al, 2006; Laxman et al, 2008). PCA3 má v porovnání se sérovým

PSA nižší senzitivitu, je více specifický a má lepší pozitivní i negativní predikční hodnotu (Vlaeminck-Guillem et al, 2008). Hodnota PCA3 navíc nezávisí na objemu prostaty (Salagierski et al, 2013). PCA3 koreluje s nepříznivými hodnotami prostatického karcinomu, konkrétně s objemem nádoru a s extrakapsulárním šířením (Whitman et al, 2008) nebo s Gleason skóre (de Luca et al, 2013).

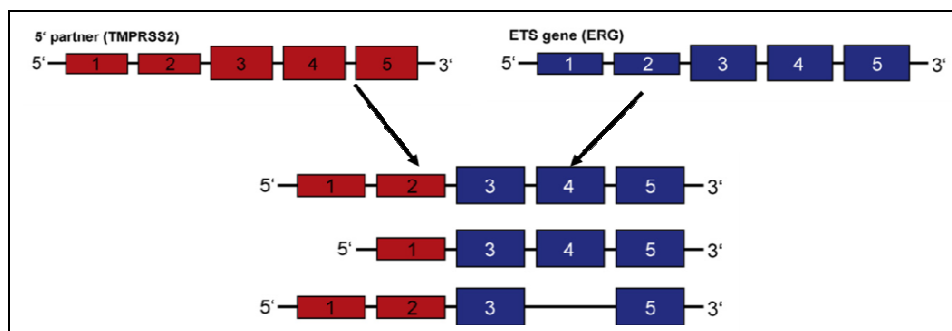
Dostupná jsou doporučení k PCA3 testu (Haese et al, 2008), speciální transportní zkumavky i komerční test PCA3 APTIMA od Gen-probe (de la Taille, 2007; ProgenSA PCA3 Test, San Diego, CA, USA) nebo PM3TM (DignoCure, Kanada).

3.2.5.2 Rodina fúzních genů TMPRSS2:ETS

K aktivaci protoonkogenů může dojít také v důsledku přestavby chromosomu, kdy se část jednoho genu připojí k části druhého genu. Výsledkem může být nový gen, u kterého je protoonkogen pod kontrolou promotoru jiného, často v dané tkáni aktivního genu. Tímto způsobem vznikají chimerické (fúzní) geny, které jsou detekovatelné u řady chorob. Translokace jsou přítomny u lidských epiteliálních karcinomů, leukémií a sarkomů (Mitelman et al, 2007; Prensner a Chinnaiyan, 2009). Například fúze BCR:ABL vyskytující se u chronické myeloidní leukemie tzv. Philadelphský chromosom (Todd et al, 1999) nebo fúze EML4:ALK nacházející se u nemalobuněčného karcinomu plic (Soda et al, 2007).

V nádorové tkáni prostaty jsou sklony k přestavbám v rámci jednoho chromosomu za vzniku fúzního genu rodiny TMPRSS2:ETS (Tomlins et al, 2005). Podstata fúzních onkogenů TMPRSS2:ETS spočívá v procesu, při němž se protoonkogen z rodiny ETS dostane pod kontrolu promotoru TMPRSS2, který je regulovaný androgeny. Fúze TMPRSS2:ETS jsou identifikovatelné metodami FISH (fluorescence *in situ*) nebo kvantitativní RT real-time PCR a to u přibližně 50% acinárních buněk CaP (Clark a Cooper, 2009; Fernández-Serra et al, 2013). Tato fúze vzniká v časně fázi iniciace karcinomu (Cerveira et al, 2006) a jsou popisovány dva způsoby jejího vzniku (Shah a Chinnaiyan, 2009). Zobrazení metodou FISH ukázalo, že genové fúze jsou přítomny pouze v neoplastických jádrech, ale ne v jádrech benigních buněk (Sun et al, 2010). Overexprese ERG (transkripční faktor z rodiny ETS) přispívá porušením signalizace AR k rozvoji androgen-nezávislého karcinomu (Yu et al, 2010). Při této fúzi 5' konec genu ERG nahrazuje 5' konec (promotor) genu TMPRSS2 a pod kontrolou androgenů se dostává gen ERG. Výsledkem je nadměrná exprese transkripčního faktoru ERG. Nejčastějšími variantami přestaveb jsou kombinace exon 1 nebo exon 2 TMPRSS2 fúzován na exon 2, 3, 4, nebo 5 genu ERG (Obr. 4).

Obr. 4: Znárodnění fúze genů TMPRSS2 a ETS. Podle Tomlins et al, 2009 (upraveno).



Rodina transkripčních faktorů ETS (erythroblastosis virus E26 transforming sequence) je jednou z rodin transkripčních faktorů jedinečných pro *Metazoa*, která u člověka čítá 29 členů. Ve viru ptačí leukemie E26 (E-twenty six) byl nalezen onkogen pojmenovaný v-ets, první člen rodiny později dalších identifikovaných transkripčních faktorů (Nunn et al, 1983; Leprince et al, 1983). Rodina ETS se účastní regulace buněčné diferenciace a buněčného cyklu (Verger a Duterque-Coquillaud, 2002; Sashida et al, 2010), dále v řízení migrace a proliferace (Foos a Hauser, 2000). Účastní se regulace apoptózy a angiogeneze (Birdsey et al, 2008; Ellett et al, 2009) a mají vliv na hematopoézu a diferenciaci různých tkání (Oliver et al, 2012).

Byly nalezeny více než dvě stovky cílových genů transkripčních faktorů ETS to ukazuje rozsah jejich působení a jejich význam pro buněčnou regulaci a kancerogenezi. Vysoká exprese onkogenů rodiny ETS byla prokázána u nádorových buněčných linií a rovněž v řadě vzorků CaP, a to v prostatických karcinomech lokalizovaných, u 43% metastáz (Perner et al, 2006) a také u 20% HGPIN (Cerveira et al, 2006).

Transmembránová proteasa serinového typu 2 je enzym, který je u člověka kódován genem TMPRSS2 (Paoloni-Giacobino et al, 1997). Proteasa se primárně nachází v plasmatické membráně a patří k II. typu, receptorové třídě A (Lin et al, 1999). Doména TMPRSS2 podléhá štěpení a extracelulární sekreci u buněk prostatického karcinomu (Afar et al, 2001), přičemž biologická funkce této proteasy není známa (Yu et al, 2010). Gen TMPRSS2 lokalizovaný na 21q22.3, je u androgen-senzitivního CaP nadměrně exprimován, ale u CaP na androgenech nezávislého je jeho exprese snížena.

Pomocí fluorescence *in situ* byly rozpoznány tři nejčastější TMPRSS2:ETS přestavby. Nejobvykleji vzniká fúzní protein s částmi TMPRSS2 a ERG u 51% resp. 60% primárních CaP (Svensson et al, 2011 resp. Perner et al, 2006). Typickými produkty jsou různé varianty onkogenu ERG (21q22.2) nebo pouze některých exonů ERG. Dalšími partnery TMPRSS2 z rodiny ETS jsou ETV1 z lokusu 7p21.2, podstatně vzácnější jsou ETV4 z lokusu 17q21 a ETV5 umístěný na 3q28 (Tomlins et al, 2006; Tomlins et al, 2007a; Clark a Cooper, 2009;

Svensson et al, 2011). Kolektiv Svenssona nenalezl žádnou přestavbu s ETV4 v souboru 86 prostatických karcinomů a s ETV5 pouze u 1% (Svensson et al, 2011). Homogenní delece části chromosomu mezi genem ERG a TMPRSS2 byla identifikována v rozsahu asi 38,765 až 38,911 Mb. Delece je příčinou fúze TMPRSS2:ERG, která se pojí s klinickými rysy progresu CaP, na rozdíl od karcinomů s nízkou úrovní přestavby (Perner et al, 2006). Tomlinsův tým (2008) také prokázal u transgenních myší s nadměrnou tvorbou ERG tendence k tvorbě lézí PIN v časném věku 12 – 14 týdnů.

V epiteliálních prostatických buňkách je možné najít také další fúze genů z rodiny ETS s jinými partnery než TMPRSS2 např. s geny SLC45A3, HERV-K, C15orf21, NDRG1 a HNRPA2B1 (Tomlins et al, 2007b; Kumar-Sinha et al 2008; Pflueger et al, 2011). Chimerické geny v CaP tkáních tvoří i tzv. non-ETS geny: CDKN1A (p21), CD9, IKBKB (IKK-beta), které se účastní buněčné homeostáze nebo tumorigeneze, onkogen PIGU nebo tumor supresor RSRC2. Tyto fúzní geny byly nalezeny s nižší frekvencí a pouze ve tkáních s přítomným fúzním produktem TMPRSS2:ERG (Pflueger et al, 2011).

Ačkoliv je přestavba a vznik fúzního genu u CaP již známa, neví se příliš mnoho o cílových genech produktu TMPRSS2:ERG (Ribeiro et al, 2011). Působením genů z rodiny ETS se zprostředkovávají interakce mezi nádorovými a stromatickými buňkami, které mají význam během procesu epiteliální–mesenchymatické tranzice (Ribeiro et al, 2011). Epiteliální–mesenchymatická tranzice (EMT) je klíčový proces mj. při iniciaci vzniku metastáz (Thiery et al, 2009). Proteiny ETS/ERG mohou usnadnit interakce buněk v nádoru a tak napomáhat iniciaci jeho proliferaci a tvorbě metastáz (Mitelman et al, 2007; Aharinejad et al, 2009). Tento fúzní gen přispívá k rozvoji androgen-independentního CaP vzhledem k porušení androgenní receptorové signalizace (Clark a Cooper, 2009).

Ve HGPIN s přestavbou TMPRSS2:ETS dochází ke snížení exprese tumor supresorových genů PTEN a k overexpresi onkogenu cMYC (Koh et al, 2010; da Silva et al, 2013). Později se neoplasie mění v CaP, zvyšuje se exprese AR a cMYC a klesá exprese p53 (Yu et al, 2010; Palanisamy et al, 2010; Pešta a Kulda, 2012).

Bylo zjištěno, že HDAC1 (histon deacetyláza účastnící se epigenetických přestaveb) je konzistentně exprimována současně s ERG. Také se pojí se zvýšenou expresí regulátorů spojených s drahami PCD (Iljin et al, 2006). Hladina mRNA genu ERG koreluje s hladinou CRISP3 a obě se pojí se stádiem onemocnění pT3. CRISP3 je přímým cílem ERG, který je silně overexprimován u TMPRSS2:ERG (Ribeiro et al, 2011). Overexprese ERG je považována za nový diagnostický a prognostický marker pro diagnózu CaP, užitečný k posouzení pacientovy odpovědi na léčbu a zjištění rizika recidivy (Demichelis et al, 2007; Lu et al, 2009; Jost et al, 2010).

CaP je klinicky heterogenní a multifokální onemocnění. Mehra et al (2007), Clark et al (2008) i později Svensson et al (2011) našli ve dvou různých ložiskách CaP dvě různé přestavby TMPRSS2:ETS obsahující ERG a ETV1. Studium metastáz pacientů zemřelých na CaP rezistentní vůči kastraci ukázalo klonální expanzi karcinomu do sekundárních míst (Mehra et al, 2008), a také metastázy shodné s primárními klony (Liu et al, 2009; Attard et al, 2009).

Fúze TMPRSS2:ERG je asociována se špatnou prognózou CaP nebo agresivními formami CaP a vyšším podílem PSA u chirurgicky léčených lokalizovaných případů (Cerveira et al, 2006; Mitelman et al, 2007; Štern et al, 2008). Nepřítomnost fúzního genu se ukazuje být příznivým prognostickým faktorem (Nam et al, 2007; Tomlins et al, 2009).

3.2.6 MikroRNA u karcinomu prostaty

MicroRNA (miRNA) jsou malé, 17-27 nt dlouhé, nekódující jednovláknové molekuly RNA, které negativně regulují genovou expresi. Tato regulace je realizována inhibicí nebo degradací mRNA genů, jejichž sekvence odpovídá konkrétní molekule miRNA. Interakce miRNA a mRNA spočívá v komplementární (nebo částečně komplementární) vazbě počátečních 2-7 nukleotidů miRNA k příslušné mRNA a to v oblasti 3'UTR (untranslated region, nepřekladačelá oblast poblíž 3' konce molekuly cílové mRNA), Ryan et al, 2010.

3.2.6.1 Biogeneze miRNA

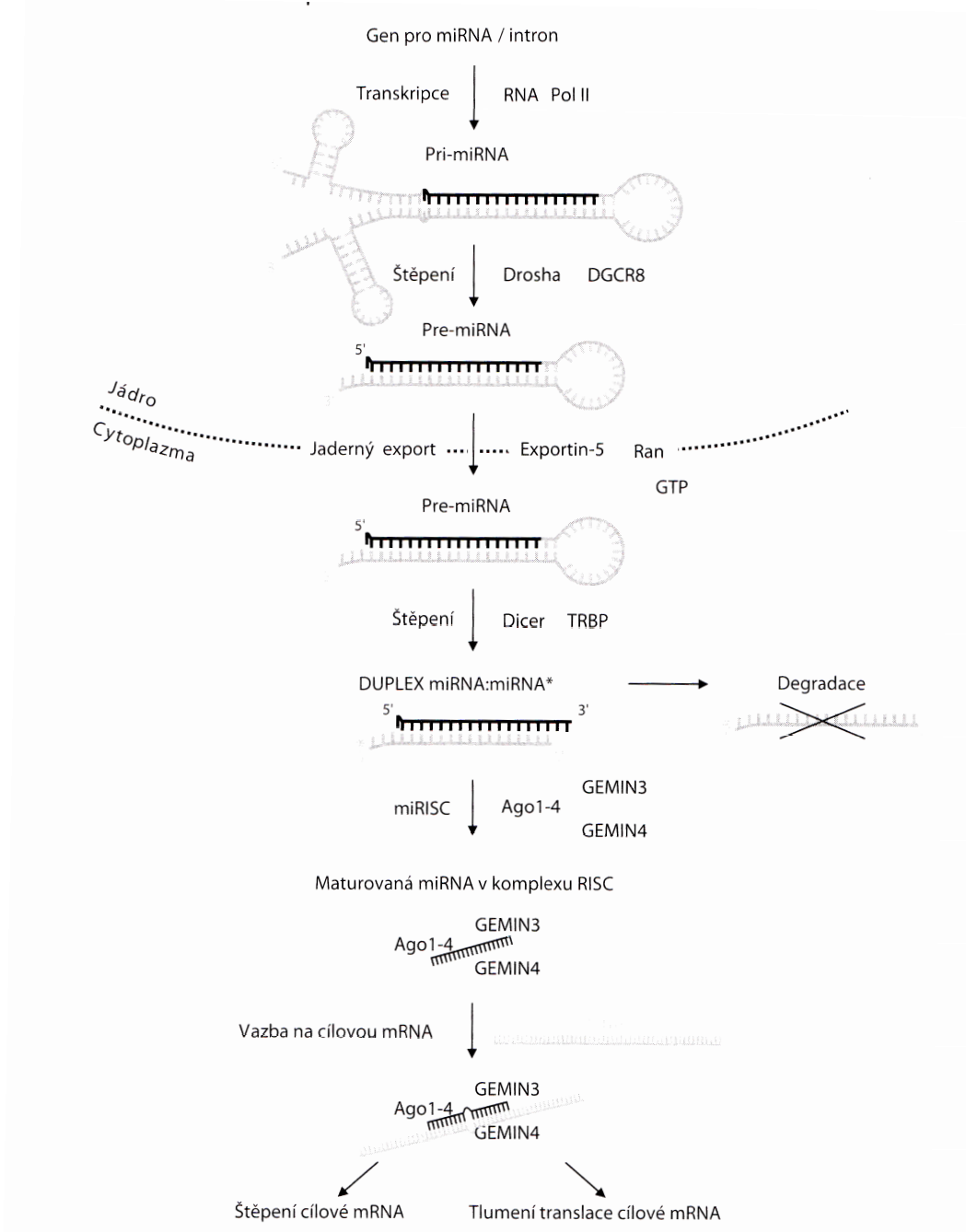
Geny pro jednotlivé miRNA obsahují vlastní promotory. Tyto geny jsou transkribovány RNA Polymerasou II za vzniku dlouhé dsRNA nazývanou pri-miRNA. RNáza III Drosha a RNA-binding protein Pasha (DGCR8) se naváží na tuto pri-miRNA a štěpí ji za vzniku asi 70 nukleotidů dlouhé molekuly pre-miRNA. Prekurzorová pre-miRNA je pomocí RAN-GTP dependentního transportínu Exportínu 5 transportována do cytoplasmy. V cytoplasmě ribonukleáza Dicer štěpí pre-miRNA za vzniku duplexu miRNA:miRNA*. Tento miRNA duplex má asi 22 nt (Esquela-Kerscher et al, 2006). Maturovaná miRNA se naváže na RISC (RNA-inducer silencing complex) a jako jeho součást interaguje s cílovými místy konkrétních mRNA a zamezuje jejich translaci, takto inhibuje expresi příslušných genů.

3.2.6.2 miRNA v nádorové patogenezi

Na obecné úrovni byla poprvé popsána spojitost mezi expresí miRNA a nádorovou patogenezi v publikaci Calina a jeho spolupracovníků (2002), kteří popsali deregulaci miR-15a a miR-16-1 u B-buněčné chronické lymfatické leukémie. Bozději bylo zjištěno, že apoptóza je také indukovaná působením miR-15 a miR16-1 na anti-apoptotický gen BCL2 (Cimmino et al, 2005). Další podrobnější studie ukázaly změny hladin exprese miRNA u řady nádorových onemocnění. Overexprese miRNA časté u řady různých tumorů (miR-21, miR-191, miR-17-5p), tyto miRNA jsou signifikantně v nadměrném množství u všech testovaných tumorů. Další miRNA jsou specifické pro určité tumory a to: miR-125b, miR-145, miR-21 u rakoviny prsu; miR-103, miR-155 (Calin et al, 2002).

Jedna z prvních prací popisující přímý vztah molekul miRNA s nádorovou patogenezi byla publikována v roce 2005 a autořiv ní dávají do souvislosti molekulu let-7 s onkogenem RAS (Johnson et al, 2005). Od té doby množství publikací na téma miRNA a nádorové problematiky strmě narůstá.

Obr. 5: Model biogeneze a biologické funkce mikroRNA. Zdroj Slabý et al, 2012.



Základní představa předpokládá, že miRNA cílící tumorsupresorové geny se deregulací může stát onkogenem a miRNA cílící protoonkogen má chování tumorsupresoru. Funkční studie odhalily, že tyto nadměrně exprimované miRNA, mohou být chápány jako onkogeny. Onkogenní miRNA obvykle podporuje rozvoj tumoru prostřednictvím negativní inhibice tumor supresorových genů nebo genů kontrolujících BC, diferenciaci nebo apoptózu, jež za normálních podmínek brání rozvoji nádoru (Slabý et al, 2013).

Exprese onkogenů může být regulována cestou mikroRNA, blokadí jejich expresi vazbou na mRNA (Negrini et al, 2007). Mutace v těchto miRNA (také onkomirs) mohou vést k aktivacím onkogenů (Esquela-Kerscher et al, 2006). Každá individuální miRNA může

navíc ovlivnit stovky různých mRNA a konkrétní cílová mRNA může být regulována několika miRNA (Pang et al, 2010).

Procesy vedoucí k odchylné/aberantní expresi miRNA mohou být způsobeny epigenetickými modifikacemi genů pro miRNA, dále mutacemi těchto genů nebo selháním v procesu tvorby miRNA. To znamená, že změny v hladinách proteinů řídících biogenezi miRNA mohou mít vliv na nádorovou patogenezi. Např. ribonukleáza Dicer je u agresivních CaP up-regulována, to může být jednou z příčin nadměrné tvorby miRNA v souvislosti s nádory prostaty (Calin et al, 2002). Také DGCR8 (viz výše) je u nádorů prostaty nacházen ve větším množství. Jiné studie ukazují, že redukovaná exprese ribonukleázy Dicer koreluje se zkráceným pooperačním přežíváním u rakoviny plic (Karube et al, 2005). Proteiny Argonaut, klíčové složky komplexu RISC, jsou také spojovány s nádorovou patogenezi. Konkrétně AGO1, AGO3 a AGO4 jsou často v deficitu u nádorů ledvin, naopak v tumorech, které postrádají gen tumor supresor WT1 je AGO1 znatelně zvýšený. Další gen patřící mezi Argonaut proteiny, H1W1, se ve zvýšeném množství nalézá u většiny testikulárních seminomů (Esquela-Kerscher et al, 2006).

Ukázalo se, že miRNA se podílejí na řízení růstu, vývoje a metastázování řady nádorových onemocnění, včetně CaP (Calin et al, 2002; Porkka et al, 2007). Principy exprese jednotlivých miRNA bývají shodné u řady různých karcinomů a mohou tak být použity jako diagnostické, prognostické a terapeutické nástroje (Saini et al, 2010). Ačkoliv je historie této problematiky poměrně krátká, základní pravidla a principy chování miRNA jsou poměrně dobře známé. Přestože výzkum neustále přináší nové poznatky, je složité komplexní regulaci porozumět (Slabý et al, 2012). Tato práce poukazuje na potenciální použití mikroRNA jako biomarkeru v klinické medicíně u prostatického karcinomu v souvislosti s jeho prognózou.

Výsledky řady publikací se shodují na snížené expresi miR-20, miR-181a, miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-221, let-7a, miR-2 u tumorů než v normální tkáni a na jejich tumorsupresivním působení. Snížená exprese těchto miRNA byla nalezena u rakoviny plic (Johnson et al, 2005), u kolorektálního karcinomu (Michael et al, 2003), glioblastomu (Ciafré et al, 2005; Chan et al, 2005), B-buněčného lymphomu (Eis et al, 2005) a hepatocelulárního karcinomu (Murakami et al, 2006).

Zajímavý je také vliv mikroRNA na vytvoření a udržování rakovinových kmenových buněk, které jsou velmi odolné chemoterapiím a často zodpovědné za relaps (Qian et al, 2011).

3.2.6.2 miRNA v patogenezi karcinomu prostaty

Zvýšená hladina miR-153 napomáhá buňkám proliferovat v důsledku utlumení tumor supreseoru PTEN u lidského CaP, což souvisí s aktivací AKT a downregulací FOXO1 (Wu

et al, 2013). Mikro RNA-125b se jeví být regulovaná androgeny, neboť byl zjištěn rozdíl mezi expresí hladin RNA u androgen-dependentních a androgen-independentních karcinomů prostaty. A navíc transfekce buňky miR-125b stimulovala androgen-independentní růst buněk CaP (Shi et al, 2007).

3.2.6.3 MikroRNA-23b

Gen pro miRNA-23b se nachází na chromosomu 9, patří do genové rodiny miR-23, do níž z lidských miRNA řadíme miR-23a a miR-23b. Snížená hladina miR-23b byla nalezena u buněčných linií rakoviny děložního čípku (Lui et al, 2007). Také u kmenových buněk gliomu byla nalezena epigeneticky (methyloací) snížená hladina miR-23b, díky čemuž dochází k indukci BC a k inhibici proliferace (Geng et al, 2012). Vysoká hladina miR-23b pozitivně koreluje s přežíváním CaP pacientů, jak bylo testováno *in vivo* i *in vitro*. Majid et al (2012) ukázali, že miR-23b působí přímo na protoonkogeny Sr a Akt. Podobně jako u gliomu bylo *in vitro* zjištěno, že zvýšené množství této mikroRNA brání proliferaci, tvorbě kolonií buněk a také migraci a invazivitě, na druhou stranu vede buňky CaP ke spuštění G0/G1 procesu v BC a k apoptóze. Overexprese miR-23b inhibuje buněčnou transici EMT (epiteliální-mesenchymatickou tranzici) způsobenou poklesem mesenchymálních markerů Vimentinu a Snailu a nárůstem epitheliálního markeru E-cadherinu (Majid et al, 2012). U myši působí exprese miR-23b značný pokles růstu tumoru a nižší expresi Src. U rakoviny ledvin se také ukázalo, že miR-23b cílí na tumor supresor nazývaný prolin oxidáza (POX) a tak napomáhá rozvoji nádoru. U tohoto nádoru byl efekt miR-23b pozorován jako chování onkogenu (Liu W et al, 2010).

Na buňkách hepatocelulárního karcinomu (HCC) hledali Salvi et al (2009) spojitost miR-23b s urokinázou (uPA) a c-met, jež mají důležité role v invazi rakoviny a v metastázování (Tkachuk et al, 1996; Salvi et al, 2007; Salvi et al, 2009). Overexprese c-met proteinu je důležitá pro invazi buněk prostřednictvím ERK signální dráhy (Xie et al, 2010). Pomocí luciferázového reportérového konstruktů a kotransfekce buněk HCC genovými konstrukty miR-23b a uPA s c-met zjistili snížení aktivity, kterou přičítají působení miR-23b. Tato miRNA se může vázat u mRNA uPA a c-met na jejich oblasti 3'-UTR, a tak translačně bránit jejich expresi u HCC buněk.

MiR-23b je také nepřímou odpovědná za hypoxické podmínky u CaP, neboť snížená exprese peroxiredoxinu III (PRDX3) u buněčné linie karcinomu prostaty (DU145) je způsobena vyšší hladinou této miRNA. Stejný jev byl ověřen souběžně na klinických vzorcích (He et al, 2012). Zvýšená exprese PRDX3 a PRDX4 souvisí s Warburgovým efektem a byla

diskutována v souvislosti s vyšším PSA a Gleason skóre (Basu et al, 2011). Vědci se domnívají, že miR-23b je metylací utlumený tumor supresor, metylace může být tudíž užitečným markerem u CaP. Ztráta této miRNA pravděpodobně vede k proliferační výhodě buněk a následně k šíření CaP, naopak obnova exprese by mohla přispět k epigenetické léčbě tohoto karcinomu (Quinn et al, 2005).

V neposlední řadě, Sun s kolektivem, 2012, zjistili souvislost downregulace miR-23b (miR-23b/-27b) s výskytem agresivního kastraci rezistentního CaP.

3.2.6.4 MikroRNA-26a

MikroRNA-26a inhibuje angiogenezi downregulací růstového faktoru VEGFA cestou PIK3C2 α /Akt/HIF-1 α u buněčných linií hepatocelulárního karcinomu (Chai et al, 2013).

Icli et al (2013) ukázali, že miR-26a reguluje patologickou i fyziologickou angiogenezi působením na endotelové buňky, konkrétně na signalizaci BMP/SMAD1. miR-26a inhibuje BMP/SMAD1 dráhu v endotelových buňkách vazbou na SMAD1 3'-UTR a působí tak pokles faktoru Id1 a nárůst p21 (WAF/CIP) a p27. Navíc *i.v.* podávání inhibitoru miR-26a (locked nucleic acid-anti-miR-26a) zvýšilo expresi SMAD1 a indukovalo výraznou angiogenezi (Icli et al, 2013). miR-26a je exprimována během diferenciaci myších kosterních svalů a předpokládá se, že je cílem inhibitoru diferenciaci, signální dráhy transformačního růstového faktoru β /bone morphogenetic protein (TGF- β /BMP). Exogenní miR-26a napomáhá diferenciaci myoblastu, a naopak inhibicí miR-26a (antisense oligonukleotidy) je diferenciaci zpožděna. miR-26a se váže na transkripční faktory Smad1 a Smad4, klíčové v signální dráze TGF- β /BMP. Expese miRNA rezistentních forem těchto transkripčních faktorů inhibuje diferenciaci. Podání tzv. antagomiru k miR-26a novorozeným myším snižuje expresi a aktivitu Smad a tak inhibuje diferenciaci kosterních svalů. Také byla zjištěna přítomnost miR-26a během regenerace svalů po zranění (Dey et al, 2012).

Kombinace čtyř mikroRNA, miR-19b, miR-23b, miR-26a a miR-92a, umožňuje proliferaci prostatických buněk downregulací PTEN. Suprese dráhy PTEN je způsobena přímo interakcí s 3'UTR v prostatických epiteliálních a rakoviných buněk. Naopak pokud se nadměrná expese těchto miRNA sníží antisense neutralizací, dojde k upregulaci expese genu PTEN. Expese těchto miRNA může samostatně nebo společně pozměnit expresi klíčových komponent PI3K/Akt signální dráhy, konkrétně PIK3CA, PIK3CD, PIK3R1 a Akt, a také cyklinu D1. Kombinace těchto miRNA tak může napomáhat proliferaci prostatických rakoviných buněk regulací expese drah PTEN, PI3K/Akt dráhy a cyklinu D1 *in vitro* (Tian

et al, 2013). Také u myši bylo navíc zjištěno, že miR-26a se účastní mj. kontroly dráhy PI3-kinase/Akt, a to pravděpodobně cestou zvýšení PTEN exprese, k němuž došlo vlivem miR-26a (Bhattachariya et al, 2013).

Srovnáním 51 vzorků CaP a 53 benigních vzorků prostaty immunoprecipitačním sekvenováním methylované DNA bylo v souvislosti s karcinomem zjištěno více než 147 tisíc epigenetických změn. Celková methylace u vzorků s a bez TMPRSS2:ERG přestavbou se velmi lišila. Hypermethylace miR-26a by mohla být alternativní dráhou přeskupení ERG, neboť byla pozorována zvýšená methylace miR-26a u CaP bez fúzního genu, tak by mohlo být vysvětlena (mimo jiné) tumorigenního procesu u nádorů bez genomové přestavby TMPRSS2:ERG (Börno et al, 2012).

Mahn et al (2011) provedli v roce 2011 analýzu miRNA v séru pacientů s lokalizovaným CaP nebo s BHP a také mezi zdravými jedinci. Analýza hladiny miR-26a ukázala dobrou možnost sensitivní diskriminace CaP a BHP (89%), a střední specifitu (56%; AUC=0,703). Analýza kombinace miRNA zvyšovala diagnostickou přesnost (sensitivita: 78.4%; specifita: 66.7%; AUC=0,758). MiR-26a koreluje s nálezem pozitivních chirurgických okrajů. Tkáňové miRNA korelovaly s miRNA v séru před prostatektomií a rovněž sérové hladiny miRNA po operaci poklesly. Sérová hladina miRNA spojovaných s rakovinou dovoluje neinvazivní rozlišení CaP a BHP (Mahn et al, 2011).

3.2.6.5 MikroRNA-221

Změněná hladina mikroRNA-221 je nacházena u řady nádorových onemocnění karcinomu prostaty včetně (Galardi et al, 2007; Mercatelli et al, 2008). MikroRNA 221 se spolu s miR-222 nachází v jednom klastru na krátkém raménku chromosomu X.

Nadměrná exprese miR-221 byla u prostaty nalezena např. kolektivem Quintvalle et al (2012). Nadměrná exprese u HCC koreluje s agresivními znaky nádoru a s přítomností metastáz (Fu et al, 2011). Ve shodě s testy na buněčných liniích u pacientů s metastazujícím CaP byla tato miRNA nalezena v ještě vyšší míře než u CaP lokalizovaného (Yaman-Agaoglu et al, 2011). Porovnáním exprese miR-221 a miR-222 u buněčných linií PC3, modelující agresivní typ CaP, a u LNCaP a 22Rv1 buněk, modelující karcinomy s pomalým růstem, zaznamenal Galardi et al (2007) u agresivního typu CaP overexpresi miR-221 a miR-222, což potvrzují výsledky pozdější výsledky Sun a kolegů (2012). Ti zjistili, že exprese *miR-221* a *miR-222* byla výrazně zvýšena u metastatických CRPC nádorů (4,5 až 6,2 krát) v porovnání s expresí v HSPC nádorů (1,5 až 2,2 krát) vztaženo k normální tkáni (Sun et al, 2012). MiR-221 negativně reguluje hladinu inhibitoru cyklin

dependentních kinas P27KIP1 a dává tak nádorovým buňkám další možnost k úniku před zástavou buněčného cyklu (Fornari et al, 2008; Coppola et al, 2010)

Někdy je pozorováno tumorsupresivní působení této miR-221. Kombinací miR-221 a miR-222 se indukuje antiangiogenní efekt snížením buněčné proliferace u buněk erytroleukémie (Felli et al, 2005). V klinické studii nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) byly miR-222, let7a, miR-7, miR-21, miR-155 a miR-210 asociovány s rekurencí nádoru po resekci u pacientů s nízkým stádiem (T1 nebo T2). Hladina miR-221 byla u nádorů spojených s relapsem signifikantně snížena ($p = 0,0036$) ve srovnání s ostatními (Duncavage et al, 2011). Další studie protektivní účinky miR-221 a let-7a u NSCLC potvrdila (Yu et al, 2008). Spojení downregulace miR-221 s expresí fúzního genu *TMPRSS2:ERG* u rakoviny prostaty ukazuje vztah miRNA a fúzního genu (Gordanpour et al, 2011). Významná downregulace miR-221 se pojí s agresivním typem CaP (Spahn et al, 2010) a také s nálezem biochemické rekurence (Schaefer et al, 2010). Spahn et al (2010) srovnáním vzorků lokalizovaného CaP a metastáz hodnotí miR-221 jako vhodný diagnostický marker pro odlišení vysoce rizikového CaP. Lupini a kolektiv (2013) díky rozsáhlé analýze cílů miR-221 dospěli k závěru, že působení může záviset také na konkrétním typu buněk. Výsledky tudíž nejsou jednotné.

4. Metodika

Přítomnost fúzního genu *TMPRSS2:ERG*, genu *PCA3* a genu *PSA* ve tkáních FFPE byla analyzována metodami reverzní transkripce a real-time PCR s použitím LNA sond. Kvantifikace miRNA (*miR23b*, *miR26a*, *miR221*, a *U6RNA*) ve tkáních FFPE byla provedena metodou RT real-time PCR s použitím TaqMan® MicroRNA Assays.

4.1 Soubor pacientů s karcinomem prostaty

Studie zahrnuje 110 pacientů, kterým byla vyoperována prostata radikální prostatektomií, přičemž indikace operace byla potvrzena pozitivním bioptickým vyšetřením s nálezem ložiska. U všech pacientů byla zaznamenána zvýšená hladina sérového PSA a neobvyklé DRV. Věk pacientů v době operace byl 43,8 až 73,9 let, průměr 62,9 let, v různých stádiích onemocnění. Rozdělení stádií onemocnění dle UICC klasifikace (International Union Against Cancer) udává tabulka 2. Vzorky FFPE (FFPE tkáň, formalin-fixed paraffin-embedded tkáň) byly získány od pacientů operovaných na Urologické klinice FN v Plzni v období ledna 2011 do června 2012 ve spolupráci s Bioptickou a nekroptickou laboratoří Bory, Šiklův patologicko-anatomický ústav, FN Plzeň.

Stádium onemocnění	Počet pacientů
I	2 (14,5%)
II	65 (59%)
III	39 (35,5%)
IV	0

Tab. 2: Rozdělení stádií onemocnění dle UICC klasifikace v souboru zkoumaných pacientů.

4.2 Tkáňové vzorky pro stanovení exprese vybraných genů

Nádorová prostatická tkáň FFPE byla získána od 110 pacientů s karcinomem prostaty. Zpracovaných vzorků bylo více, do studie však mohly být zařazeny jen vzorky od osob, kde se podařilo zjistit a sledovat další vývoj onemocnění. Zjištěná patologická stádium se lišila od lokalizovaného až po extraprostatické šíření nádoru. Parafinem zalité formalinem fixované prostatické tkáň byly odebrány disekcí dle celosvětově známých a ověřených technik (Mikhail et al, 2006). Aby se zabránilo rozkladu tkáň, byla standartně fixována formalinem a zalita do vosku (Vacek, 1996). Získané vzorky tkání byly zpracovávány technikou formalinové fixace a barvení (Stamey et al, 1988). Zpracování vzorků v laboratoři ŠPAÚ proběhlo podle laboratorní příručky verze SME 8/004/02, dostupné na

http://www.fnplzen.cz/dokumenty/lp/sme_8_004_02.pdf. Patolog označil na sklíčku tu část, která obsahovala ložisko karcinomu a podle tohoto označení byla z parafinového bločku (FFPE) makrodisekcí za použití mikrotomu (Leica RM 2135) a sklapele vyříznuta část normální tkáně a část tkáně nádorové o tloušťce 15 μm a ploše cca 100 mm^2 .

4.3 Stanovení exprese genů

Expresi genu byla zjištěna stanovením množství mRNA daného genu ve tkáni. Byla provedena izolace celkové RNA, která byla následnou reverzní transkripcí (RT) převedena na cDNA. Metodou kvantitativní PCR v reálním čase (real-time PCR) bylo zjištěno množství cDNA odpovídající expresi zkoumaného genu ve tkáni.

4.3.1 Isolace celkové RNA

Extrakce RNA byla provedena komerční sadou miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) dle protokolu miRNeasy FFPE Handbook, 9/2010, k dispozici na <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/>, Cat. Nr. 217504. Při práci byl použit RNase-free certifikovaný plast (zkumavky, špičky s filtrem).

Sekce normální a nádorové tkáně o rozměrech cca 15 μm x 100 mm^2 , vyříznuté za pomoci mikrotomu (Leica RM 2135) a sklapele, byly deparafinizovány inkubací s 160 μl xylenu (Sigma) 3 min při 56°C. Přidáním 150 μl lyzačního pufru PKD se po promíchání a centrifugaci (1 min, 10 000 rpm) směs rozdělí na dvě fáze. Po přidání 10 μl proteinasy K ke spodní fázi se směs inkubuje 15 min při 56°C a následně 15 min při 80°C. Spodní čirá fáze je přenesena do čisté 2 ml mikrozkušavky, která je vychlazená na ledu a centrifugována (15 min, 13 500 rpm). K supernatantu přenesenému do čisté mikrozkušavky je přidáno 16 μl DNAase Booster pufru, směs je promíchána a ponechána 15 min při pokojové teplotě. Poté je lyzát smíchán s 320 μl pufru RBC a poté s 1120 μl ethanolu (100%) pro optimální navázání RNA na membránu RNeasy MinElute Spin kolonky. Na kolonku umístěnou v mikrozkušavce se postupně ve 2 až 3 krocích přenesou celý objem směsi za krátkého stočení (15 s, 10 000 rpm), odpad se z mikrozkušavky odstaní. Dále je na RNeasy MinElute Spin kolonku přidáno 500 μl pufru RPE, opět se centrifuguje (15 s, 10 000 rpm) a odpad se vylévá. Krok se opakuje ještě jednou s delší dobou centrifugace (2 min, 10 000 rpm). Po tomto promytí membrány jsou kolonky přeneseny do nových 2 ml mikrozkušavek, které jsou součástí balení, a stáčí se s otevřeným víčkem maximální rychlostí 5 min. Celková RNA je z membrány RNeasy MinElute Spin kolonky eluována do nových 1,5 ml

mikrozkumavek 20-ti μl RNase-free deionizované vody při centrifugaci 1 min na nejvyšší rychlost.

Čistota a množství izolované RNA byla měřena spektrofotometricky přístrojem NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), při absorbanci A_{260} , A_{230} , A_{280} , A_{320} , poměr A_{260}/A_{280} a to v 1 μl vzorku. Izolace vzorků s koncentrací nižší než 15 ng/ μl byla opakována. Již ze samé podstaty předchozích fixací byla očekávána přítomnost degradované RNA, čemuž byly přizpůsobeny další analýzy (stanovení exprese krátkých úseků). Vzorky RNA byly do použití skladovány při -80°C , přičemž byl kladen důraz na to, aby následná reverzní transkripce byla provedena co nejdříve.

4.3.2 Reverzní transkripce (RT) – příprava cDNA

Procesem reverzní transkripce za využití enzymu reverzní transkriptázy byla převedena labilní a nestálá izolovaná RNA do stabilnější cDNA, tedy “kopie genů bez intronů“. Pro RT jsme použili reverzní transkriptázu SuperScript® III (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Reverzní transkripce TMPRSS2:ERG, PCA3 a PSA pro stanovení exprese těchto genů byla provedena pomocí náhodných hexanukleotidových primerů - random hexamer (BioTech, ČR) a soupravy SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Reakce v celkovém objemu 20 μl byla provedena podle doporučení výrobce, dostupné: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/12574026?CID=cvc-rt-pcr-c3t1>.

Pro syntézu jednovláknové cDNA byla použita sada SuperScript® III Reverse Transcriptase. Do sterilní nuclease-free 0,2 μl mikrozkumavky (RT) byly postupně přidáno po 1 μl náhodných (20 nM) hexanukleotidových primerů (BioTech, ČR), 1 μl dNTP mixu (10 mM), 250 ng celkové RNA doplněné sterilní ddH₂O tak, aby objem byl 12 μl (podle koncentrace daného vzorku). Tato směs byla následně vložena do termálního cyklátoru (MJ Research, USA) s programem inkubace 5 min při 65°C . Po nejméně 1 min zchlazení na ledové tříšti a krátké centrifugaci byly ke směsi přidány: 4 μl 5x First Strand pufru, 1 μl 0,1 M DTT a 1 μl (200 U) reverzní transkriptázy (SuperScript™ III, Life Technologies, Invitrogen). Mikrozkumavky byly dále inkubovány 5 min při 25°C , 50 min při 50°C , 15 min při 70°C (denaturace enzymu), následovalo zchlazení 15 min při 15°C . V jednom běhu bylo obsazováno 48 míst termocykleru. Vzorky reverzních transkriptů jsme uchovávali při -20°C .

Reverzní transkripce miRNA (miR26a, miR221, miR23b a U6RNA) byla provedena metodou RT real-time PCR s použitím TaqMan® MicroRNA Assays, která převádí RNA na cDNA za pomoci specifických microRNA primerů dodávaných v soupravě.

Detekované molekuly miRNA měly následující sekvence: hsa-miR-23b AUCACAUUGCCAGGGAUUACC, hsa-miR-26a UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC, hsa-miR-221 AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC.

Izolovaná RNA byla použita pro reverzní transkripci (Applied Biosystems, Life Technology). Reverzní transkripce pro kvantifikaci miRNA (u6RNA, miR-26a, miR-221, miR-23b) byly provedeny podle následujícího protokolu a doporučení za pomoci miRNA-specifických RT primerů.

Nejprve byla připravena směs obsahující 0,15 μ l 100mM dNTP (s dTTP), 1 μ l (50 U) reverzní transkriptázy (MultiScribe™ TaqMan, Applied Biosystems, Foster, CA, USA), 1,5 μ l 10x pufr pro RT, 0,19 μ l (20U) inhibitor RNase, 6,66 μ l H₂O bez nukleáz. Směs byla jemně promíchána, krátce stočena a uchována na ledu. Každá reakce byla doplněna na 15 μ l přidáním 2,5 μ l RNA a 3 μ l 5x RT primerů specifických pro každou miRNA, směs lehce promíchána a chlazená na ledu 5 min. Termální cykler byl nastaven na reverzní transkripci a to: 30 min 16°C, 30 min 42°C, 5 min 85°C, ∞ 4°C. Připravené reverzní transkripty byly do provedení real-time PCR uchovány při -20°C.

4.3.3 PCR v reálním čase (real-time PCR)

Cílem metody real-time PCR, která patří mezi kvantitativní PCR (qPCR), je stanovení množství DNA (např. cDNA) v analyzovaném vzorku. V našem případě stanovení množství cDNA odpovídajícímu expresi RNA pro určení aktivity sledovaných genů.

Toto stanovení (real-time PCR) je možno provést absolutně (stanovení počtu kopií), s použitím standard o známé koncentraci pro každý gen. Dále je možné kvantifikaci provádět relativně, jako poměr vůči jinému genu, kdy se porovnávají hodnoty Ct nebo je možno tyto přístupy kombinovat (rozvedeno dále).

Pro stanovení exprese genu PSA a PCA3 u zkoumaných vzorků metodou RT real-time PCR byly použity sondy Universal ProbeLibrary (UPL) a master mix FastStart TaqMan® Probe Master (č. 04673417001, oboje (Roche Applied Science, Německo). FastStart TaqMan® Probe Master je hotový komerční mix reagensů poskytující citlivou detekci a kvantifikaci vybrané DNA sekvence. FastStart TaqMan® Probe Master (2x master mix obsahující FastStart Taq DNA Polymerasu, pufr a nukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dUTP). Každá Universal ProbeLibrary (UPL) sonda je jednotlivá hydrolyzovaná próba, která hybridizuje s komplementární sekvencí. Pro kvantifikaci genové exprese PSA byla použita UPL sonda 44, pro stanovení exprese PCA3 UPL sonda 66.

Reakce o objemu 20 μ l obsahovala 10 μ l FastStart TaqMan Probe Master 2x směsi, 7,5 μ l H₂O PCRgrade, 0,5 μ l primeru FWD 20 μ M, 0,5 μ l primeru REV 20 μ l (Generi Biotech,

ČR), 0,5 µl UPL próby 10 µM, 1 µl cDNA templátu. Reakce probíhala v 96 jamkových destičkách, v nichž byla směs na závěr opatrně promíchána pipetováním. Stanovení bylo provedeno na přístroji Agilent Technologie Stratagene Mx3005P (Stratagene, USA). Všechny vzorky byly stanoveny duplikátu a byla také provedena negativní kontrola (bez templátu cDNA). Primery byly navrženy s pomocí databáze <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> a syntetizovány v Generi Biotech, ČR (tab. 3).

Gen	Sekvence	Počet bazí	Název primeru
PCA3	5'-TGT GTG GCC TCA GAT GGT AA-3'	20	DD3R_70UPL_66
PCA3	5'-TGG GAA GGA CCT GAT GAT ACA-3'	21	DD3F_70UPL_66
PCA3	5'-CCC AGG GAT CTC TGT GCT T-3'	19	DD3RR_XUPL_66
PSA	5'-CAG CAA GAT CAC GCT TTT GT-3'	20	PSAR_108UPL44
PSA	5'-GTG CTT GTG GCC TCT CGT-3'	18	PSAF_108UPL44
TMPRSS2	5'-GTC CAT AGT CGC TGG AGG AG-3'	20	TMPRSS2R184PR1
TMPRSS2	5'-TAG GCG CGA GCT AAG CAG-3'	18	TMPRSS2F184PR1
TMPRSS2	5'-CTG CTT AGC TCG CGC CTA-3'	18	TMPRSS2Fda_E1-5
ERG	5'-CTC CTC CAG CGA CTA TGG AC-3'	20	ERGFda_4-5

Tab. 3: Sekvence primerů (FWD A REV) pro RT-PCR při stanovení genu PCA3 a PSA.

Pro stanovení exprese molekul miRNA (U6RNA, miR-23b, miR-221, miR-26a) bylo provedeno metodou RT real-time PCR s TaqMan Universal Master Mix II (2x, obsahuje pufr, dNTP, TaqMan polymerázu) and TaqMan miRNA Assay (obsahuje sondu a primery) (Applied Biosystems, Life Technology, USA).

Reakce o objemu 20 µl obsahovala 10 µl 2x Taqman Universal Master Mix II (bez UNG), 0,5 µl 20x TaqMan miRNA Assay (obsahuje sondu a primery), a 7,5 µl H₂O bez nukleáz, 1,5 µl produktu RT (cDNA). Reakce probíhala podle níže uvedeného nastavení: Nejprve proběhla úvodní inkubace 2 min 50°C a 10 min 95°C pro aktivaci „hot start“ polymerázy, pak následovalo 40 cyklů při denaturaci 95 °C 15 s a annealing 40 cyklů při 60 °C 1 min.

U6RNA byla použita jako kontrola pro normalizaci hladiny exprese. Relativní hladiny exprese každé miRNA byla hodnocena ΔC_t metodou, kde platí $\Delta C_t = C_{t(miRNA)} - C_{t(snU6)}$ a C_t představuje cyklus PCR ve kterém byla dosažena fluorescence shodná pro všechny vzorky.

Dostupné na: <https://www.lifetechnologies.com/>.

4.4 Imunoanalytické metody

Sérové hladiny PSA byly stanoveny imunoanalytickými metodami v imunoanalytické laboratoři OID FN Plzeň Bory vedené prof. MUDR. O. Topolčanem, Ph.D. Stanovení bylo provedeno automatickým chemiluminiscenčním přístrojem Unicel DxI 800 se sadou ACCESSPSA a ACCESS fPSA (Beckman Coulter, Brea, USA) s Hybritech kalibrací.

Použili jsme předoperační hodnoty pro výpočet prognózy a také hodnoty získané v pooperačních náběrech během sledování pacientů pro stanovení biochemické recidivy.

Biochemická recidiva byla zaznamenána jako pooperační elevace sérového PSA nad hodnotu 0,2 ng/ml po uplynutí šesti a více týdnů od operace.

5. Výsledky

Statistické zpracování dat získaných RT-PCR provedl doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc. s pomocí statistického programu SAS 8.02. Údaje o klinickém stavu pacientů byli získány ve spolupráci s Urologickou klinikou FN Plzeň.

Ze statistických analýz vyplývá, že vztah předoperační hladiny PSA a tzv. bezpříznakového období (DFI, Disease Free Interval) je statisticky významný (Coxův model; $p = 0,0153$). K DFI má statisticky signifikantně významný vztah přítomnost genu TMPRSS2:ERG v nádorové tkáni. Pacienti bez přítomnosti fúzního genu mají delší bezpříznakové období (Coxův model; $p=0,0020$). Statisticky signifikantně vyšší byly také hodnoty PCA3/PSA a miR221 u nádorové tkáně ve srovnání s normální tkání, oboje u FFPE vzorků ($p < 0,0001$; resp. $p < 0,0005$). Nyní budu pokračovat přehledem všech výsledků.

5.1 Vztah předoperačních hladin PSA ke klinicko-patologickému stavu pacientů

Vztah hodnot PSA (ng/ml) ke stádiu onemocnění (I-III) a také k hodnotě histopatologického gradingu (G2 vs. G3-4) a k hodnotě Gleason skóre (6 až 9) není u sledovaného souboru statisticky významný. Vzhledem k tomu, že se většinou nejedná o normální rozdělení dat, byly použity Kruskalův-Wallisův test (pro porovnání více než 2 skupin) a Wilcoxonův test (pro porovnání 2 skupin).

Stádium	Počet	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
1	16	15	9.41	7.08	3.00	4.93	7.02	13.70	30.64
2	63	63	11.00	5.62	3.30	6.84	9.55	13.30	34.77
3	29	29	11.97	10.24	3.70	6.33	9.71	13.30	55.95

Tab. 4.: Charakteristika hladin předoperačního PSA (ng/ml) mezi stadii onemocnění.

Významnost vztahu předoperační hodnoty PSA (ng/ml) ke stádiím onemocnění (Stádium I, Stádium II, Stádium III) byla hodnocena testem dobré shody testem (Kruskal-Wallis test, $p = 0,2595$). Data jsou uvedena v tabulce 4. Rozdíly předoperačních hodnot PSA mezi skupinami Stádium II a Stádium III (Wilcoxon Two-Sample Test, $p=0,6814$), Stádium I a II (Wilcoxon Two-Sample Test, $p=0,0958$) a mezi skupinami Stádium I a Stádium III (Wilcoxon Two-Sample Test, $p = 0,3042$) nedostávají statistické významnosti.

Grading	N Obs	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
G2	37	36	10.09	5.84	3.00	6.75	8.92	11.68	30.64
G3-4	70	70	11.42	7.96	3.30	6.69	9.90	13.30	55.95

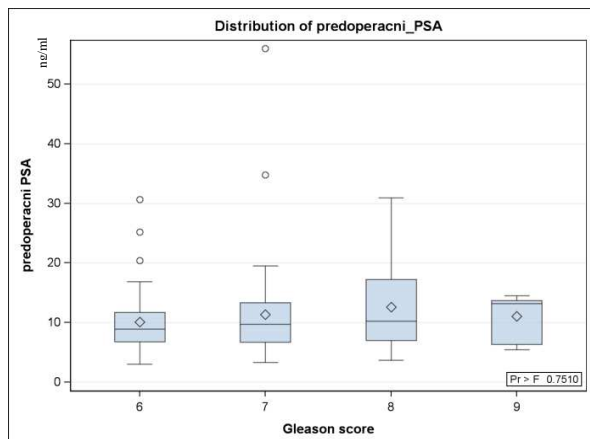
Tab. 5: Charakteristika hladin předoperačního PSA v závislosti na gradingu nádoru.

Vztah předoperačního PSA a histopatologického gradingu G2 a G3-4 (Tab. 5) nebyl v našem souboru prokázán (Wilcoxon Test, $p=0,3969$), stejně jako jeho vztah ke Gleason skóre (Kruskal-Wallis Test, $p=0,6553$).

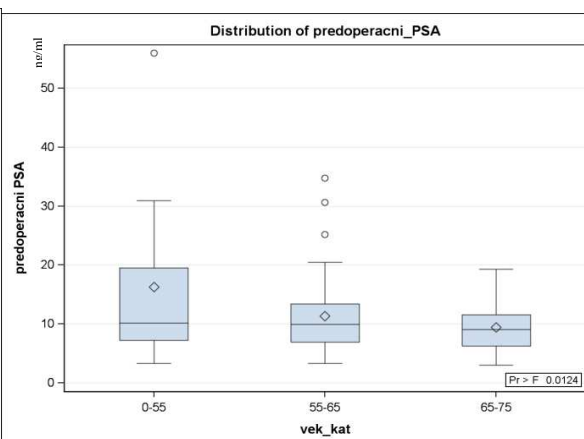
Gleason skóre	N Obs	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
6	37	36	10.09	5.84	3.00	6.75	8.92	11.68	30.64
7	54	54	11.35	8.36	3.30	6.69	9.72	13.30	55.95
8	11	11	12.63	7.85	3.70	6.97	10.24	17.20	30.90
9	6	6	11.07	4.04	5.48	6.33	13.19	13.73	14.50

Tab. 6: Charakteristika hladin předoperačního PSA při různých Gleason skóre nádoru.

Obr. 6: Distribuce předoperačního PSA u jednotlivých podskupin Gleason skóre.



Obr. 7: Distribuce předoperačního PSA ve skupinách podle věku.



Nenalezli jsme ani statisticky významný vztah předoperačních hladin PSA k rozdělení do věkových skupin (Kruskal-Wallis test, $p=0,2387$).

5.2 Vztah přítomnosti fúzního genu TMPRSS2:ERG s klinicko-patologickým stavem pacientů

Vztah přítomnosti fúzního genu TMPRSS2:ERG v nádorové tkáni a stadia onemocnění (Stádium I a Stádium II, Stádium II a Stádium III, Stádium I a Stádium III) je patrný z tabulky 7. Rozdíl hladin markeru TMPRSS2:ERG mezi skupinami Stádium I, Stádium II a Stádium III. není signifikantní (test dobré shody, $p=0,2308$), stejně tak mezi skupinami Stádium I a Stádium III ($p=0,2008$) a mezi skupinami Stádium II a Stádium III ($p=0,1395$).

Vztah přítomnosti fúzního genu TMRSS2:ERG v nádorové tkáni mezi skupinami gradingu G2 a G3-4 ukazuje tabulka 8. V testovaném souboru pacientů není tento vztah signifikantní (Kruskal-Wallis test, $p=0,4590$).

Stádium	TMPRSS2:ERG		
	0	1	Celkem
1	15 13.89 93.75 15.79	1 0.93 6.25 7.69	16 14.81
2	57 52.78 90.48 60.00	6 5.56 9.52 46.15	63 58.33
3	23 21.30 79.31 24.21	6 5.56 20.69 46.15	29 26.85
Celkem	95 87.96	13 12.04	108 100.00

Tab. 7: Přítomnost fúzního genu TMPRSS2:ERG podle stádií CaP.

Grading	TMPRSS2:ERG		
	0	1	Celkem
2	34 31.78 91.89 35.79	3 2.80 8.11 25.00	37 34.58
3-4	61 57.01 87.14 64.21	9 8.41 12.86 75.00	70 65.42
Celkem	95 88.79	12 11.21	107 100.00

Tab. 8: Přítomnost fúzního genu TMPRSS2:ERG podle gradingu.

Expresi markeru TMPRSS2:ERG (pozitivní, negativní) v nádorové tkáni u podskupin podle Gleason skóre ukazuje tabulka 9. Signifikance vztahu přítomnost TMPRSS2:ERG a hodnoty Gleason skóre nebyla prokázána (test dobré shody) mezi žádnými podskupinami skóre. Výsledky srovnání přítomnosti fúzního genu ve tkáni tumoru nejsou podle tohoto testu signifikantní a jsou: mezi podskupinami Gleason skóre 6 až 9 ($p=0,7778$), mezi podskupinami Gleason skóre 6 a 7 ($p=0,4670$), mezi podskupinami Gleason skóre 6 a 8 ($p=0,3369$), mezi podskupinami Gleason skóre 6 a 9 ($p=0,5032$), mezi podskupinami Gleason skóre 7 a 8 ($p=0,6478$), mezi podskupinami Gleason skóre 7 a 9 ($p=0,8001$) a mezi podskupinami Gleason skóre 8 a 9 ($p=0,9378$), vše Kruskal-Wallis test.

Gleason skóre	TMPRSS2:ERG pozitivní		
	0	1	Celkem
6	34 31.48 91.89 35.79	3 2.78 8.11 23.08	37 34.26
7	47 43.52 87.04 49.47	7 6.48 12.96 53.85	54 50.00
8	9 8.33 81.82 9.47	2 1.85 18.18 15.38	11 10.19
9	5 4.63 83.33 5.26	1 0.93 16.67 7.69	6 5.56
Total	95 87.96	13 12.04	108 100.00

Tab. 9: Přítomnost fúzního genu TMPRSS2:ERG v nádorové tkáni podle Gleason skóre.

Věková kategorie	TMPRSS2:ERG pozitivní		
	0	1	Celkem
0-55	12 11.11 92.31 12.63	1 0.93 7.69 7.69	13 12.04
55-65	45 41.67 93.75 47.37	3 2.78 6.25 23.08	48 44.44
65-75	38 35.19 80.85 40.00	9 8.33 19.15 69.23	47 43.52
Total	95 87.96	13 12.04	108 100.00

Tab. 10: Přítomnost fúzního genu TMPRSS2:ERG v nádorové tkáni podle věkových skupin.

Rozdíly exprese genu TMPRSS2:ERG (pozitivní, negativní) v nádorové tkáni mezi věkovými skupinami 0-55 a 55-65, 0-55 a 65-75 a 55-65 a 65-75 nejsou statisticky signifikantní (Kruskal-Wallis test; $p= 0,8522$, $p= 0,3266$ resp. $p= 0,0585$). Přítomnost fúzního genu v nádoru ve třech skupinách podle věkových kategorií ukazuje tabulka 10.

Rozdíl hladin markeru (miRNA a mRNA) u nádorové tkáně mezi skupinami s nalezeným fúzním genem TMPRSS2:ERG a skupinou bez přítomnosti TMPRSS2:ERG byl hodnocen testy ANOVA a Wilcoxonovým testem. Viz tabulky 11 a 12.

TMPRSS2:ERG pozitivní	N Obs	Marker	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
0	95	miR_26a_U6RNA_t	86	12.26	13.16	0.20	4.01	9.00	16.56	78.79
		miR_221_U6RNA_t	86	6.07	11.06	0.01	1.41	2.91	5.27	70.64
		miR_23b_U6RNA_t	85	5.01	6.12	0.08	1.50	3.38	6.42	44.86
		mRNAPSA_t	95	27.15	4.84	20.38	23.35	25.63	30.74	38.37
		mRNAPCA3_t	89	31.61	3.95	25.78	28.60	30.69	34.46	40.99
		mRNAPCA3_PSA_t	95	0.16	0.53	0.00	0.01	0.03	0.09	4.56
1	13	miR_26a_U6RNA_t	10	12.43	10.24	0.66	3.13	10.39	18.38	30.48
		miR_221_U6RNA_t	10	3.91	2.94	0.88	1.65	2.65	5.51	9.73
		miR_23b_U6RNA_t	10	3.86	3.80	0.31	1.49	2.09	5.92	11.53
		mRNAPSA_t	13	26.57	4.81	21.46	23.46	24.74	29.12	37.48
		mRNAPCA3_t	12	30.22	2.78	26.93	28.37	29.13	32.44	35.96
		mRNAPCA3_PSA_t	13	0.10	0.17	0.00	0.02	0.04	0.07	0.63

Tab. 11: Charakteristika hladin markerů miRNA a mRNA mezi skupinami TMPRSS2:ERG pozitivní a negativní, měřeno v nádorové tkáni.

Marker0	p (ANOVA test)	p (Wilcoxon test)
miR-26a/U6RNA	0.9689	0.6887
miR-221/U6RNA	0.5418	0.7879
miR-23b/U6RNA	0.5613	0.5338
mRNAPSA	0.6838	0.6994
mRNAPCA3	0.2410	0.3086
mRNAPCA3/PSA	0.7290	0.7064

Tab. 12: Statistická signifikance vztahu hladiny markeru mezi skupinami s přítomností fúzního genu TMPRSS2:ERG a TMPRSS2:ERG negativní, měřeno v nádorové tkáni.

5.3 Vztah naměřených hodnot miRNA a mRNA ke klinicko-patologickému stavu pacientů

Hladinu markerů v tumoru vs. zdravé tkáni FFPE u všech pacientů ukazuje tabulka 13. V tabulce 14 jsou pak rozdíly hladin mezi tumorem a kontrolou a jejich statistická významnost.

Tumor/ Kontrola	N Obs	Marker	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
T	108	miR_26a_U6RNA	96	12.28	12.84	0.20	3.57	9.00	16.77	78.79
		miR_221_U6RNA	96	5.85	10.53	0.01	1.41	2.91	5.32	70.64
		miR_23b_U6RNA	95	4.89	5.92	0.08	1.49	3.29	6.42	44.86
		mRNAPSA	108	27.08	4.82	20.38	23.37	25.39	30.41	38.37
		mRNAPCA3	101	31.44	3.84	25.78	28.53	30.52	34.36	40.99
		mRNAPCA3_PSA	108	0.15	0.50	0.00	0.01	0.03	0.08	4.56
Z	108	miR_26a_U6RNA	98	13.58	12.72	0.26	4.24	10.91	18.06	62.47
		miR_221_U6RNA	97	6.41	5.51	0.55	2.66	5.03	8.57	28.05
		miR_23b_U6RNA	98	6.02	5.70	0.16	1.41	4.31	8.74	27.43
		mRNAPSA	108	27.07	4.47	20.89	23.74	25.45	29.99	39.81
		mRNAPCA3	102	34.37	3.70	25.98	31.76	34.01	37.22	42.19
		mRNAPCA3_PSA	108	0.02	0.06	0.00	0.00	0.00	0.02	0.47

Tab. 13: Charakteristika naměřených hodnot markerů v nádoru (T) a v normální tkáni (Z).

Zajímavé jsou rozdíly normalizovaných hodnot miRNA-26a, miRNA-221 a miRNA-23b ve tkáni nádorové vs. v normální. Vzhledem k převážně nenormálnímu rozdělení dat byly použity testy znaménkový test (Sign) a Wilcoxonův Signed Rank test. Statisticky signifikantní na hladině $p=0,0005$ vychází rozdíl exprese miR-221 mezi tkání nádorovou a zdravou. Na hladině $p<0,0005$ je významný rozdíl mezi expresí genu PCA3 v tumoru vs. v normální tkáni prostaty, stejně tak rozdíl poměrů PCA3/PSA.

Marker	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum	p (Sign test)	p (Wilcoxon Signed Rank)
miR_26a_U6RNA_t_z	92	-1.57	13.70	-48.24	-4.90	-0.83	1.84	54.63	0.1750	0.0712
miR_221_U6RNA_t_z	92	-0.14	10.14	-24.92	-2.96	-1.04	0.28	61.69	0.0002	0.0005
miR_23b_U6RNA_t_z	92	-1.09	6.90	-26.11	-2.58	-0.24	0.93	37.02	0.3481	0.0640
mRNAPSA_t_z	108	0.02	2.97	-10.46	-1.33	0.05	1.83	8.85	0.9234	0.7608
mRNAPCA3_t_z	98	-2.88	3.38	-11.80	-4.72	-2.85	-0.71	7.04	<.0001	<.0001
mRNAPCA3_PSA_t_z	108	0.13	0.50	-0.42	0.00	0.01	0.07	4.55	<.0001	<.0001

Tab. 14: Charakteristika rozdílů hladin měřených markerů mezi nádorem (T) a zdravou tkání (Z) a jejich významnost u všech pacientů.

Rozdíl hladin markeru mezi nádorovou tkání (T) a kontrolou (Z) u skupin pacientů podle stádia ve skupině Stádium I, ve skupině Stádium II a ve skupině Stádium III a jeho charakteristiky uvádí tabulka 15. Porovnání jednotlivých miRNA a mRNA mezi stadia ukazuje tabulka 16.

Stádium	N Obs	Marker – rozdíl (T)/(Z)	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
1	16	miR_26a_U6RNA_t_z	16	-4.10	6.53	-42.53	-4.90	-0.58	1.26	13.61
		miR_221_U6RNA_t_z	16	-3.27	7.86	-24.92	-3.17	-1.93	-0.17	2.34
		miR_23b_U6RNA_t_z	16	-1.96	2.65	-26.11	-4.89	-0.39	3.39	8.81
		mRNAPSA_t_z	16	0.26	3.05	-4.63	-1.54	0.04	2.16	4.99
		mRNAPCA3_t_z	16	-3.93	1.13	-8.14	-7.28	-3.89	-1.26	0.50
		mRNAPCA3_PSA_t_z	16	0.31		-0.01	0.00	0.01	0.05	4.55
		2	63	miR_26a_U6RNA_t_z	52	-0.21	13.67	-31.59	-4.93	-0.83
miR_221_U6RNA_t_z	52			0.61	12.04	-21.59	-2.88	-0.99	0.67	61.69
miR_23b_U6RNA_t_z	52			-1.24	7.17	-19.66	-2.90	-0.41	0.84	37.02
mRNAPSA_t_z	63			0.08	2.67	-6.84	-1.43	0.05	1.90	8.85
mRNAPCA3_t_z	59			-2.88	2.87	-10.69	-4.48	-2.79	-1.22	5.13
mRNAPCA3_PSA_t_z	63			0.12	0.30	-0.04	0.00	0.02	0.08	1.99

Stádium	N Obs	Marker – rozdíl (T)/(Z)	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
3	29	miR_26a_U6RNA_t_z	24	-2.82	14.37	-48.24	-4.63	-0.81	1.06	23.52
		miR_221_U6RNA_t_z	24	0.30	7.02	-8.20	-2.96	-0.90	0.48	28.10
		miR_23b_U6RNA_t_z	24	-0.16	5.74	-11.32	-0.94	0.06	1.10	19.65
		mRNAPSA_t_z	29	-0.26	3.76	-10.46	-1.23	-0.09	1.65	7.96
		mRNAPCA3_t_z	23	-2.14	4.59	-11.80	-5.77	-2.08	1.28	7.04
		mRNAPCA3_PSA_t_z	29	0.04	0.18	-0.42	0.00	0.01	0.06	0.81

Tab. 15: Charakteristiky rozdílů hodnot naměřených markerů (T)/(Z) podle skupin stádií CaP.

Marker – rozdíl (T)/(Z)	Stádium I, II, III		Stádium I		Stádium II		Stádium III	
	p (Sign test)	p (Signed Rank test)	p (Sign test)	p (Signed Rank test)	p (Sign test)	p (Signed Rank test)	p (Sign test)	p (Signed Rank test)
miR-26a/U6RNA_t_z	0.1750	0.0712	0.4545	0.3225	0.3317	0.2401	0.8388	0.3277
miR-221/U6RNA_t_z	0.0002	0.0005	0.0213	0.0131	0.0365	0.0309	0.0639	0.1252
miR-23b/U6RNA_t_z	0.3481	0.0640	0.2101	0.3484	0.6778	0.0349	1.000	0.9119
mRNAPSA_t_z	0.9234	0.7608	1.0000	0.7820	0.8013	0.8154	1.000	0.9245
mRNAPCA3_t_z	<0.0001	<0.0001	0.0042	0.0003	<0.0001	<0.0001	0.0931	0.0453
mRNAPCA3/PSA_t_z	<0.0001	<0.0001	<0.0005	<0.0005	<0.0001	<0.0001	0.0192	0.0194

Tab. 16. Hodnocení významu rozdílů naměřených markerů (T)/(Z) mezi stádii CaP.

Byly hodnoceny rozdíly hladin markeru mezi nádorem a zdravou tkání(T)/(Z) (jedná se o hodnocení změny hladiny v nádoru vůči přilehlé dravé tkáni) u pacientů podskupin Gleason skóre 6, podskupin Gleason skóre 7, podskupin Gleason skóre 8 a podskupin Gleason skóre 9. Charakteristika dat a hodnoty p (Wilcoxon Signed Rank test) u jednotlivých stupňů Gleason skóre je uvedena v tabulce 17.

Gleason skóre	N Obs	Marker – rozdíl (T)/(Z)	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum	Sign	Signed Rank P hodnota
6	37	miR_26a_U6RNA_t_z	31	-2.88	8.95	-42.53	-4.83	-0.88	0.96	11.07	0.4731	0.0706
		miR_221_U6RNA_t_z	31	0.36	13.55	-24.92	-3.29	-1.15	0.27	61.69	0.0107	0.0271
		miR_23b_U6RNA_t_z	31	-1.78	5.43	-26.11	-2.82	-0.37	0.53	4.58	0.4731	0.109
		mRNAPSA_t_z	37	0.06	2.79	-5.63	-1.89	0.05	1.86	8.85	1.0000	0.9352
		mRNAPCA3_t_z	35	-3.47	3.11	-10.46	-5.09	-3.44	-1.22	5.13	<.0001	<.0001
		mRNAPCA3_PSA_t_z	37	0.18	0.75	-0.04	0.01	0.02	0.07	4.55	<.0001	<.0001
7	54	miR_26a_U6RNA_t_z	46	-1.50	17.20	-48.24	-5.92	-1.04	3.21	54.63	0.1038	0.2444
		miR_221_U6RNA_t_z	46	-0.90	7.71	-21.59	-2.68	-0.91	0.18	41.39	0.0259	0.0059
		miR_23b_U6RNA_t_z	46	-0.54	8.20	-19.66	-3.95	-0.41	0.97	37.02	0.4614	0.3070
		mRNAPSA_t_z	54	0.13	3.14	-10.46	-0.99	0.25	2.16	6.61	0.4966	0.2707
		mRNAPCA3_t_z	48	-2.60	3.33	-11.80	-4.28	-2.14	-0.42	5.13	<.0001	<.0001
		mRNAPCA3_PSA_t_z	54	0.13	0.33	-0.12	0.00	0.01	0.07	1.99	<.0001	<.0001
8	11	U6RNA_Ct_t_z	9	2.09	12.08	-18.42	-0.69	0.19	11.47	22.34	0.5078	0.4961
		miR_26a_U6RNA_t_z	9	0.13	6.17	-8.20	-2.89	-0.31	2.64	11.95	1.0000	0.8203
		miR_221_U6RNA_t_z	9	-2.37	6.82	-17.54	-2.34	0.16	1.08	5.41	1.0000	0.7344
		miR_23b_U6RNA_t_z	11	-0.35	3.37	-4.93	-2.29	-0.83	-0.09	7.96	0.0654	0.2783
		mRNAPSA_t_z	9	-1.92	4.41	-6.87	-4.74	-2.92	-1.05	7.04	0.1797	0.2500
		mRNAPCA3_PSA_t_z	11	0.00	0.15	-0.42	0.00	0.01	0.09	0.14	0.1094	0.1934
9	6	miR_26a_U6RNA_t_z	6	-0.72	2.10	-4.21	-1.60	-0.42	0.39	1.94	1.0000	0.6875
		miR_221_U6RNA_t_z	6	2.70	12.53	-4.00	-3.71	-1.89	-0.40	28.10	0.2188	0.4375
		miR_23b_U6RNA_t_z	6	0.27	0.87	-0.85	-0.04	-0.01	0.92	1.62	1.0000	0.8438
		mRNAPSA_t_z	6	-0.67	2.29	-4.03	-3.06	0.31	1.19	1.27	0.6875	1.0000
		mRNAPCA3_t_z	6	-3.14	3.96	-8.33	-5.77	-3.63	-0.32	2.87	0.2188	0.0938
		mRNAPCA3_PSA_t_z	6	0.03	0.03	-0.00	0.00	0.02	0.05	0.06	0.2188	0.0625

Tab. 17: Charakteristika rozdílů hodnot markerů mezi (T)/(Z) u různých skupin podle Gleason skóre.

Nebyla zjištěna signifikance rozdílů hladin markeru (hladiny naměřené pouze v nádorové tkáni) mezi skupinami Stádium I a Stádium II, mezi skupinami Stádium II a Stádium III a mezi skupinami Stádium I a Stádium III. Viz tabulka 18 a 19. Pro porovnání všech tří skupin

byl použit Kruskalův-Wallisův test a při srovnávání dvou skupin Wilcoxonův Two Sample test.

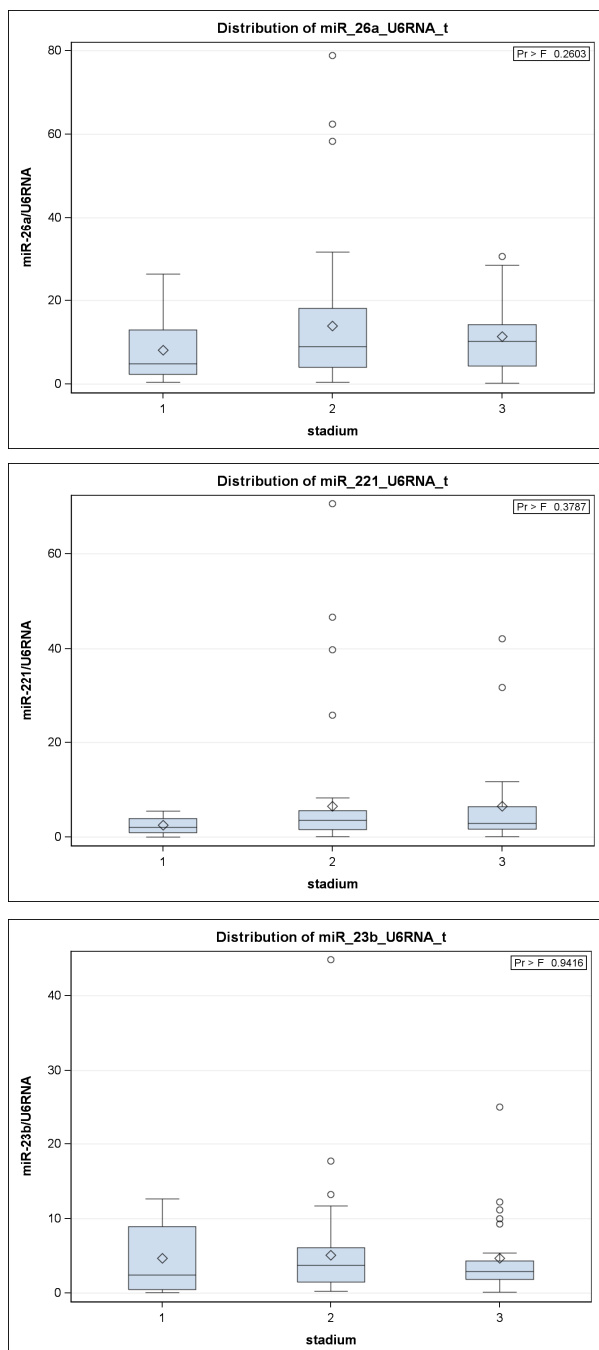
Stádium	N Obs	Marker	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
1	16	miR-26a/U6RNA	16	8.09	7.68	0.45	2.37	4.84	12.98	26.35
		miR-221/U6RNA	16	2.48	1.86	0.01	0.91	2.10	3.96	5.51
		miR-23b/U6RNA	16	4.65	4.71	0.08	0.50	2.46	8.91	12.62
		mRNAPSA	16	25.34	4.64	20.38	22.59	23.98	27.38	38.36
		mRNAPCA3	16	30.77	3.63	26.66	27.67	30.11	32.69	38.16
		mRNAPCA3/PSA	16	0.32	1.13	0.00	0.01	0.01	0.06	4.56
2	63	miR-26a/U6RNA	55	13.90	15.18	0.42	4.01	9.00	18.06	78.79
		miR-221/U6RNA	55	6.52	12.14	0.12	1.55	3.53	5.63	70.64
		miR-23b/U6RNA	54	5.08	6.53	0.24	1.50	3.75	6.09	44.86
		mRNAPSA	63	27.28	4.75	21.08	23.39	25.85	31.48	38.15
		mRNAPCA3	60	31.49	3.72	25.78	28.85	30.81	33.98	40.99
		mRNAPCA3/PSA	63	0.13	0.30	0.00	0.01	0.04	0.09	2.08
3	29	miR-26a/U6RNA	25	11.38	8.83	0.20	4.33	10.20	14.22	30.48
		miR-221/U6RNA	25	6.52	9.78	0.14	1.72	2.93	6.43	42.15
		miR-23b/U6RNA	25	4.65	5.38	0.13	1.83	2.87	4.29	25.06
		mRNAPSA	29	27.61	5.01	21.74	23.59	25.86	31.75	38.37
		mRNAPCA3	25	31.76	4.35	26.93	28.53	29.79	34.87	40.81
		mRNAPCA3/PSA	29	0.10	0.18	0.00	0.00	0.03	0.09	0.88

Tab. 18: Charakteristiky hodnot naměřených markerů v nádorové tkáni podle skupin stádií CaP.

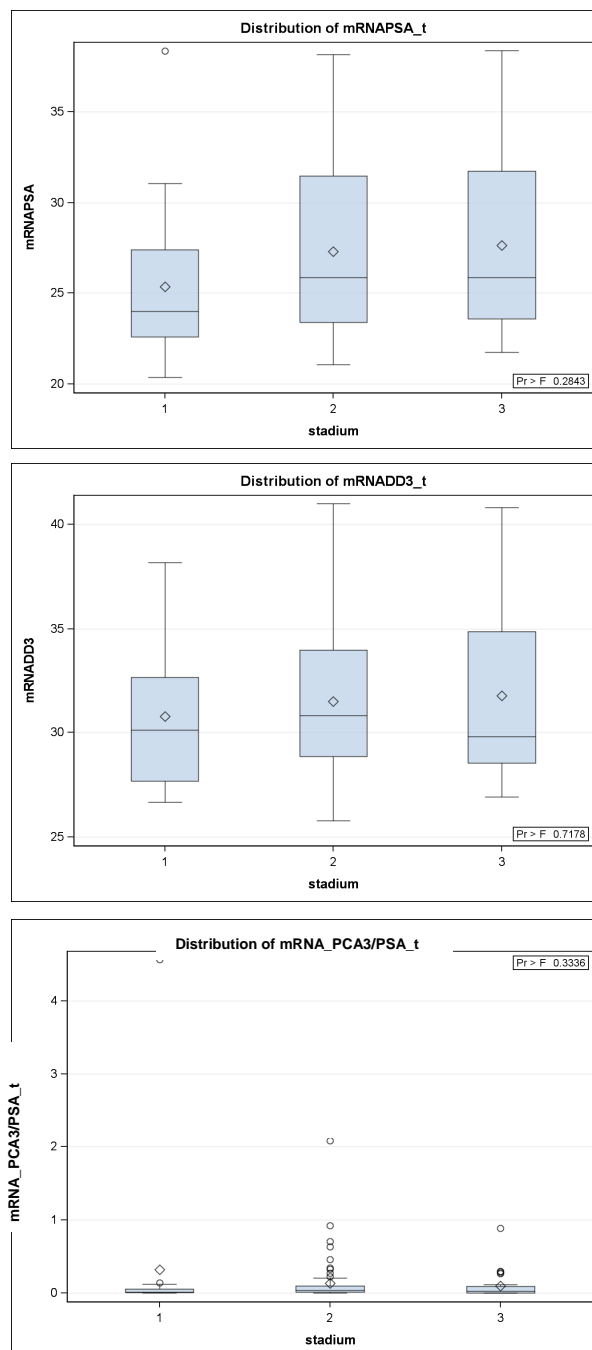
Marker – hladina u tumoru	Stádium I, II, III	Stádium II vs. III	Stádium I vs. III	Stádium I vs. III
	p (Kruskal-Wallis)	p (Wilcoxon Two Sample)	p (Wilcoxon Two Sample)	p (Wilcoxon Two Sample)
miR-26a/U6RNA	0.3086	0.8320	0.2856	0.1261
miR-221/U6RNA	0.2005	0.7721	0.1138	0.1074
miR-23b/U6RNA	0.7218	0.5120	0.6051	0.5824
mRNAPSA	0.1565	0.6631	0.0628	0.1049
mRNAPCA3	0.7695	0.9425	0.5598	0.4896
mRNAPCA3/PSA	0.3535	0.4563	0.7863	0.1423

Tab. 19: Hodnocení významu naměřených markerů (T)/(Z) mezi stádii CaP

Obr. 8: Distribuce hodnot miR-23b (8a), miR-221 (8b) a miR-26a (8c) v jednotlivých stádiích karcinomu prostaty.



Obr. 9: Distribuce hodnot mRNA genu PSA (9a), genu PCA3 (9b) a poměru těchto genů PCA3/PSA (9c).



Analýza rozdílů hladin markeru v nádorové tkáni mezi skupinami podle histopatologického gradingu G2 a G3-4. Byl zaznamenán rozdíl hladin normalizované miR-26a mezi skupinami G2 a G3-4 (Wilcoxon test, $p = 0,0118$). Stejně tak jsme zaznamenali rozdíl hladin normalizované miR-23b mezi skupinami G2 a G3-4, viz tabulka 21.

Grading	N Obs	Marker (T)	N	Prům	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
2	37	miR-26a/U6RNA	33	8.06	7.74	0.45	2.60	4.98	12.34	30.70
		miR-221/U6RNA	33	6.01	13.44	0.12	0.93	2.25	5.16	70.64
		miR-23b/U6RNA	32	3.53	4.14	0.08	0.79	1.85	5.12	17.72
		mRNAPSA	37	26.34	4.23	20.38	23.39	25.07	29.11	38.36
		mRNAPCA3	35	31.05	3.26	25.78	28.76	30.69	32.46	38.16
		mRNAPCA3/PSA	37	0.19	0.75	0.00	0.01	0.02	0.08	4.56
3-4	70	miR-26a/U6RNA	62	14.49	14.51	0.20	6.23	10.41	18.70	78.79
		miR-221/U6RNA	62	5.82	8.81	0.01	1.77	3.51	5.37	46.69
		miR-23b/U6RNA	62	5.63	6.61	0.13	1.88	3.75	7.48	44.86
		mRNAPSA	70	27.51	5.11	21.16	23.35	25.69	31.68	38.37
		mRNAPCA3	65	31.70	4.14	26.43	28.34	29.90	34.87	40.99
		mRNAPCA3/PSA	70	0.13	0.30	0.00	0.01	0.03	0.09	2.08

Tab. 20: Charakteristiky hladin markerů u různých skupin podle histopatologického gradingu.

Marker – rozdíl hladin mezi G2 a G3-4	p (ANOVA)	p (Wilcoxon Test)
miR-26a/U6RNA	0.0200	0.0118
miR-221/U6RNA	0.9350	0.1910
miR-23b/U6RNA	0.1048	0.0132
mRNAPSA	0.2340	0.4589
mRNAPCA3	0.4258	0.6892
mRNAPCA3/PSA	0.5733	0.6127

Tab. 21: P hodnoty analýzy variance a Wilcoxonova testu

Dále byl zjišťován rozdíl hladin markeru mezi podskupinami Gleason skóre 6, 7, 8, 9. Zaznamenali statisticky signifikantně vyšší hladiny miR-23b ($p=0,0024$) a miR-26a ($p=0,0052$) ve vzorcích s Gleason skóre 7 ve srovnání se vzorky Gleason skóre 6, což znamená zvýšení hladiny miR-23b a miR-26a u méně diferencovaných nádorů. Nejlépe vidíme vztah hladiny markeru k nádorové tkáni k Gleason skóre na grafech na následujících stranách (obrázky 10, 11, 12 a 13).

Gleason score	N Obs	Marker	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
6	37	miR-26a/U6RNA	33	8.06	7.74	0.45	2.60	4.98	12.34	30.70
		miR-221/U6RNA	33	6.01	13.44	0.12	0.93	2.25	5.16	70.64
		miR-23b/U6RNA	32	3.53	4.14	0.08	0.79	1.85	5.12	17.72
		mRNAPSA	37	26.34	4.23	20.38	23.39	25.07	29.11	38.36
		mRNAPCA3	35	31.05	3.26	25.78	28.76	30.69	32.46	38.16
		mRNAPCA3/PSA	37	0.19	0.75	0.00	0.01	0.02	0.08	4.56
7	54	miR-26a/U6RNA	48	15.86	15.59	0.66	6.70	10.61	20.18	78.79
		miR-221/U6RNA	48	5.01	7.35	0.01	1.89	3.51	5.36	46.69
		miR-23b/U6RNA	48	6.11	7.20	0.24	2.85	3.82	7.76	44.86
		mRNAPSA	54	27.84	5.12	21.16	23.70	25.80	31.75	38.37
		mRNAPCA3	51	31.93	4.08	26.61	28.60	31.01	34.87	40.99
		mRNAPCA3/PSA	54	0.15	0.33	0.00	0.01	0.04	0.12	2.08

Gleason score	N Obs	Marker	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
8	11	miR-26a/U6RNA	9	12.65	9.68	1.32	4.07	11.96	18.06	30.48
		miR-221/U6RNA	9	8.00	9.48	1.15	2.14	4.98	9.73	31.61
		miR-23b/U6RNA	9	5.24	3.91	1.13	2.38	3.24	9.27	11.14
		mRNAPSA	11	27.82	5.52	22.05	23.26	26.30	31.89	37.48
		mRNAPCA3	9	31.04	4.14	26.94	27.85	29.52	35.26	37.74
		mRNAPCA3/PSA	11	0.07	0.09	0.00	0.00	0.04	0.09	0.30
9	6	miR-26a/U6RNA	6	6.20	5.24	0.20	0.42	7.21	10.20	11.96
		miR-221/U6RNA	6	8.45	16.55	0.40	0.45	2.33	3.03	42.15
		miR-23b/U6RNA	6	1.88	1.90	0.13	0.37	1.62	2.16	5.40
		mRNAPSA	6	23.49	1.60	21.74	22.55	23.31	23.58	26.46
		mRNAPCA3	6	30.22	4.88	26.43	26.93	28.35	31.95	39.31
		mRNAPCA3/PSA	6	0.03	0.02	0.00	0.02	0.02	0.05	0.07

Tab. 22: Charakteristiky hladin markerů u různých skupin podle Gleason skóre.

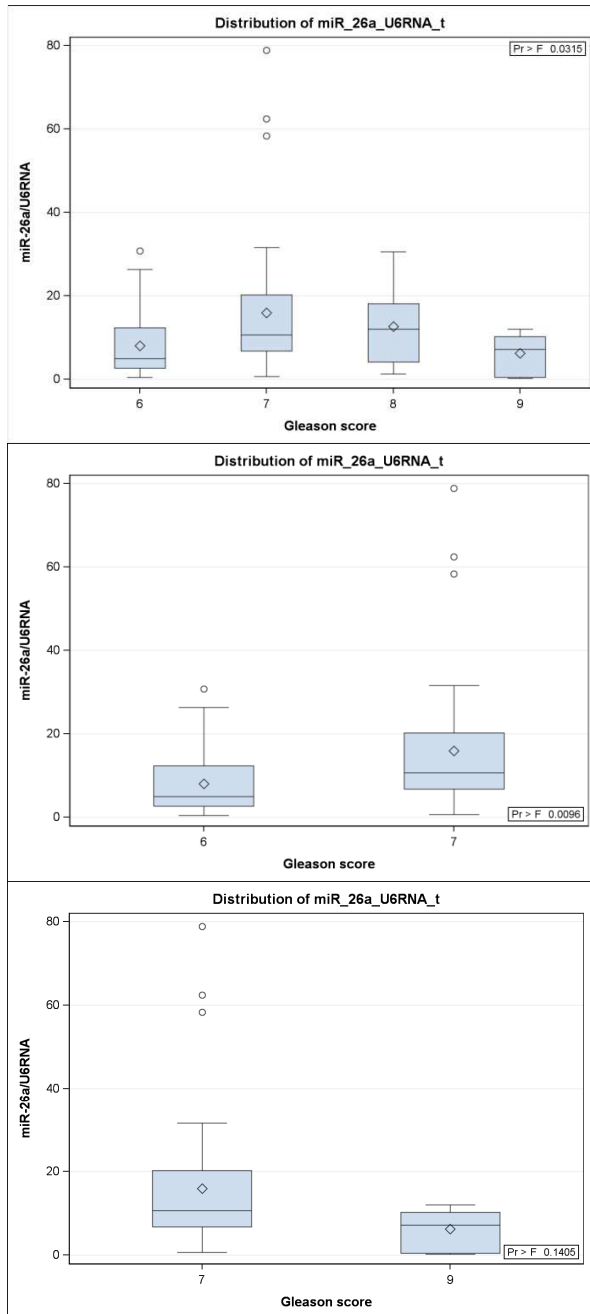
Marker	Gl. 6 vs. 7 vs. 8 vs. 9		Gl. 6 vs. 7		Gl. 6 vs. 8		Gl. 6 vs. 9	
	p (ANOVA)	p (Kruskal-Wallis Test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon Test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon Test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon Test)
miR_26a_U6RNA_t	0.0315	0.0127	0.0096	0.0024	0.1426	0.2508	0.5772	0.5499
miR_221_U6RNA_t	0.7926	0.2497	0.6668	0.2350	0.6796	0.1119	0.6949	0.6850
miR_23b_U6RNA_t	0.1511	0.0064	nenormální	0.0052	0.2764	0.1190	0.3485	0.3736
mRNAPSA_t	0.1193	0.1219	0.1431	0.2836	0.3467	0.5267	0.1143	0.0965
mRNAPCA3_t	0.6043	0.5376	0.2931	0.4676	0.9922	0.7614	0.5947	0.3526
mRNAPCA3_PSA_t	0.8361	0.8253	0.7664	0.4616	0.5942	0.9416	0.6172	0.9583

Tab. 23: P hodnoty analýzy variance a Kruskalova-Wallisova testu u sledovaných markerů podle podskupin Gleason skóre (6, 7, 8, 9).

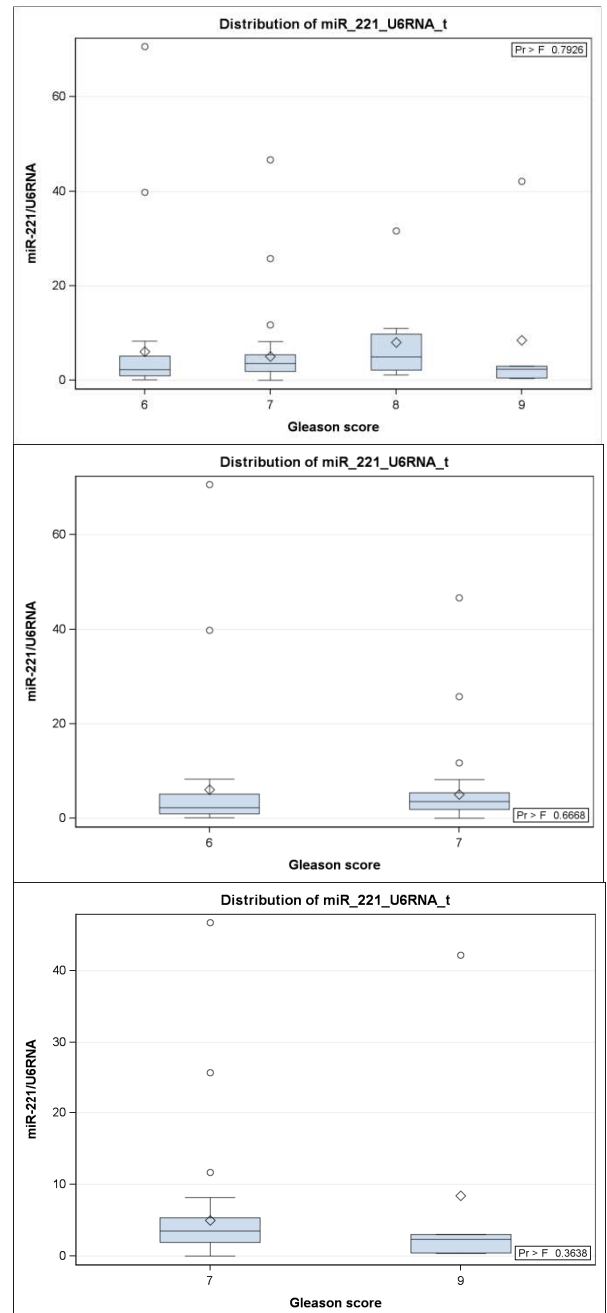
Marker	Gl. 7 vs. 8		Gl. 7 vs. 9		Gl. 8 vs. 9	
	p (ANOVA)	p (Wilcoxon Test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon Test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon Test)
miR_26a_U6RNA_t	0.5551	0.8531	0.1405	0.0771	0.1621	0.1339
miR_221_U6RNA_t	0.2886	0.2645	0.3638	0.3196	0.9481	0.2363
miR_23b_U6RNA_t	0.7269	0.8361	0.1617	0.0209	0.0751	0.0891
mRNAPSA_t	0.9895	0.9098	0.0440	0.0248	0.0835	0.1388
mRNAPCA3_t	0.5503	0.5102	0.3456	0.2125	0.7318	0.4564
mRNAPCA3_PSA_t	0.3919	0.5834	0.3813	0.5242	0.3827	0.8047

Tab. 24: P hodnoty analýzy variance a Kruskalova-Wallisova testu u sledovaných markerů podle podskupin Gleason skóre (6, 7, 8, 9).

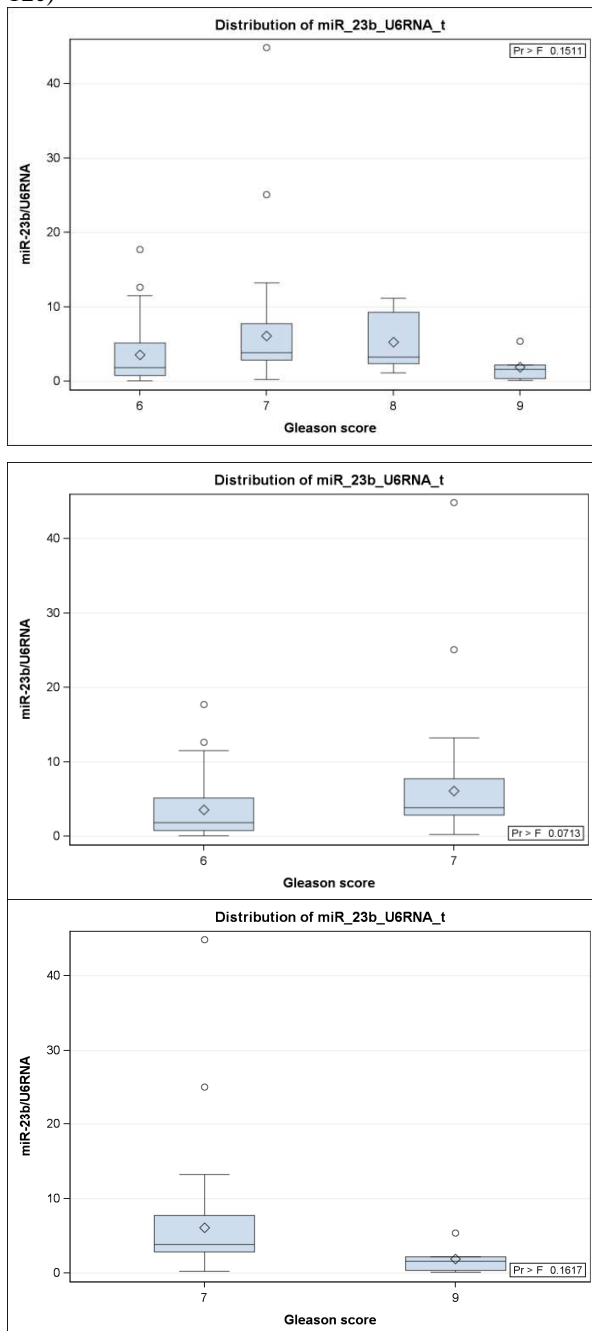
Obr. 10: Distribuce stanovených hodnot miR-26a u jednotlivých podskupin Gleason skóre (10a, 10b, 10c).



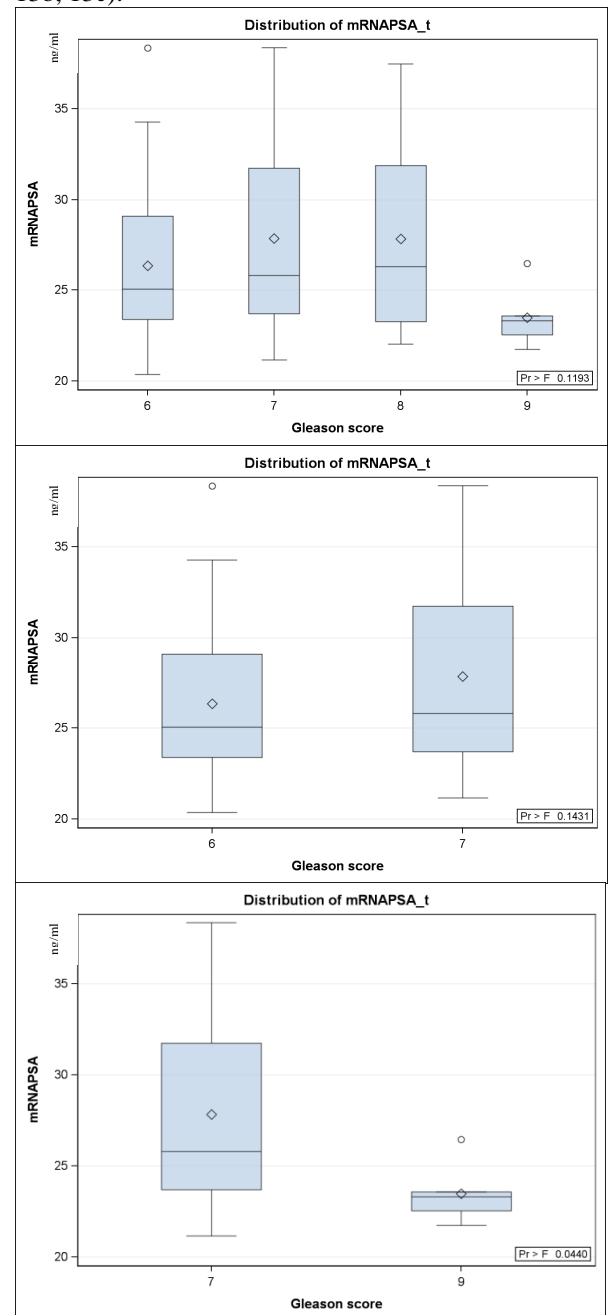
Obr. 11: Distribuce stanovených hodnot miR-221 u jednotlivých podskupin Gleason skóre (11a, 11b, 11c).



Obr. 12: Distribuce stanovených hodnot miR-23b u jednotlivých podskupin Gleason skóre (12a, 12b, 12c)



Obr. 13: Distribuce stanovených hodnot mRNA PSA u jednotlivých podskupin Gleason skóre (13a, 13b, 13c).



Rozdíl hladin markeru mezi vzorky nádorových tkání mezi věkovými skupinami 0-55 a 55-65, mezi věkovými skupinami 0-55 a 65-75 a mezi věkovými skupinami 55-65 a 65-75 byl hodnocen testem ANOVA a Kruskalovým-Wallisovým testem. Tabulka 25 ukazuje distribuci hodnot ve věkových skupinách, tabulka 26 pak hladiny významnosti

vek_kat	N Obs	Marker (T)	N	Průměr	SD	Minimum	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Maximum
0-55	13	miR_26a_U6RNA_t	10	10.49	8.29	1.41	5.15	9.28	12.55	30.70
		miR_221_U6RNA_t	10	6.40	11.75	1.72	2.00	2.30	3.77	39.74
		miR_23b_U6RNA_t	10	5.75	4.80	0.27	3.17	4.86	7.43	17.72
		mRNAPSA_t	13	27.86	4.94	22.39	23.74	28.79	31.07	36.90
		mRNAPCA3_t	12	32.01	4.11	26.66	28.96	31.17	34.66	39.30
		mRNAPCA3_PSA_t	13	0.05	0.05	0.00	0.01	0.04	0.07	0.16
55-65	48	miR_26a_U6RNA_t	44	13.78	16.27	0.42	4.17	9.55	15.93	78.79
		miR_221_U6RNA_t	44	5.81	8.62	0.40	1.63	3.34	5.50	46.69
		miR_23b_U6RNA_t	43	5.05	7.13	0.37	1.50	3.04	5.91	44.86
		mRNAPSA_t	48	26.17	4.60	20.38	22.87	24.63	27.56	38.15
		mRNAPCA3_t	46	30.71	3.73	25.78	27.85	29.80	32.89	39.31
		mRNAPCA3_PSA_t	48	0.16	0.35	0.00	0.01	0.04	0.10	2.08
65-75	47	miR_26a_U6RNA_t	42	11.13	9.20	0.20	2.74	8.54	17.75	31.56
		miR_221_U6RNA_t	42	5.76	12.19	0.01	1.08	2.55	5.30	70.64
		miR_23b_U6RNA_t	42	4.52	4.78	0.08	1.16	3.20	6.46	25.06
		mRNAPSA_t	47	27.80	4.95	21.36	23.70	25.74	31.48	38.37
		mRNAPCA3_t	43	32.06	3.84	26.80	28.97	31.77	35.26	40.99
		mRNAPCA3_PSA_t	47	0.17	0.67	0.00	0.01	0.02	0.08	4.56

Tab. 25: Distribuce hodnot hladiny markeru ve věkových skupinách

Marker	0-55, 55-65, 65-76		0-55 a 65-75		0-55 a 65-75		55-65 a 65-75	
	p (ANOVA)	p (Kruskal-Wallis test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon test)	p (ANOVA)	p (Wilcoxon test)
miR_26a_U6RNA_t	0.5722	0.9534	0.5394	0.8855	0.8429	0.9724	0.3576	0.7664
miR_221_U6RNA_t	0.8207	0.5229	0.8539	0.6659	0.8804	0.6198	0.9839	0.2813
miR_23b_U6RNA_t	0.9847	0.4724	0.7696	0.2516	0.4697	0.2854	0.6915	0.7558
mRNAPSA_t	0.2111	0.1678	0.2502	0.2909	0.9689	0.9146	0.0984	0.0731
mRNAPCA3_t	0.2214	0.1827	0.2978	0.2827	0.9690	0.8951	0.0969	0.0845
mRNAPCA3_PSA_t	0.7453	0.3764	0.2998	0.5228	0.5256	0.7076	0.8980	0.1775

Tab. 26: Rozdíl hladin markerů mezi věkovými skupinami

5.4 Vztah hladin markerů k délce bezpříznakového období

Vztah stanoveného markeru miR-23b, miR-26a, miR-221, mRNA-PSA, mRNA-PCA3 a délky bezpříznakového období (DFI, Disease Free Interval) u souboru všech pacientů není statisticky významný (Coxovy regresní modely proporciálních rizik).

Parameter	D F	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-value	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
miR_26a_U6RNA_t	1	0.00416	0.02438	0.0291	0.8646	1.004	0.957	1.053
miR_221_U6RNA_t	1	-0.04266	0.06318	0.4559	0.4996	0.958	0.847	1.085
miR_23b_U6RNA_t	1	-0.02989	0.07313	0.1671	0.6827	0.971	0.841	1.120
mRNAPSA_t	1	0.06127	0.05465	1.2569	0.2622	1.063	0.955	1.183

Parameter	D F	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-value	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
mRNAPCA3_t	1	0.08367	0.07138	1.3739	0.2411	1.087	0.945	1.251
mRNAPCA3_PSA_t	1	0.05091	0.62678	0.0066	0.9353	1.052	0.308	3.594

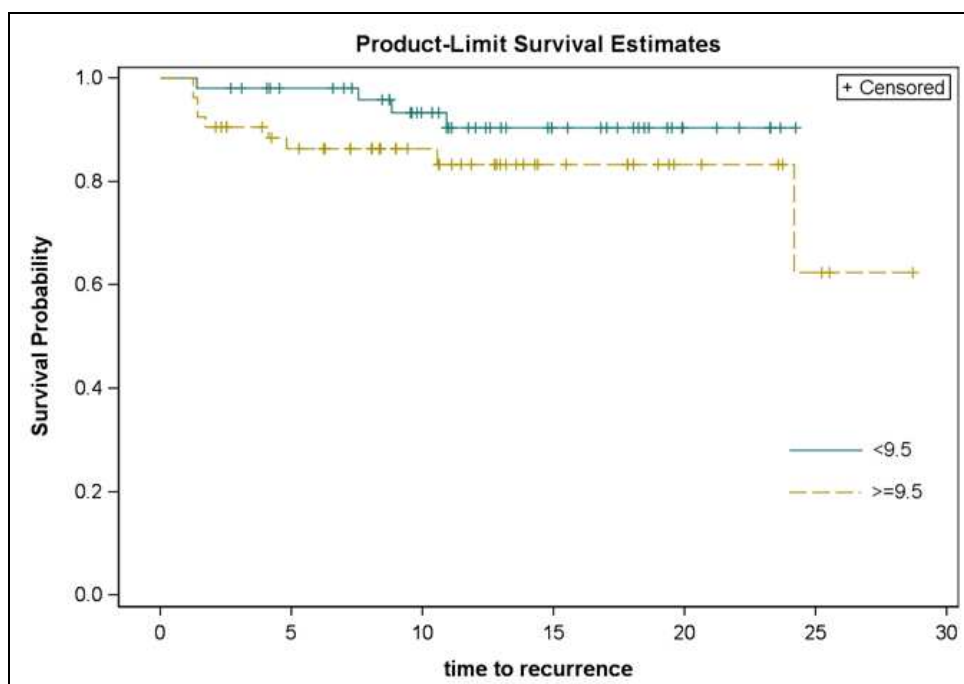
Tab. 27: Analýza vztahu bezpříznakového období a stanovených markerů.

Zaznamenali jsme vztah hladiny předoperačního PSA a doby DFI u všech pacientů (Coxův regresní model proporciálních rizik, Analysis of Maximum Likelihood Estimates, $p=0,0153$). U pacientů s vyšší hladinou PSA bylo zaznamenáno kratší bezpříznakové období po operaci. Celkový počet sledovaných pacientů byl 106, cenzorovaný počet pacientů byl 93 (87,74%).

Parameter	DF	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-value	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
předoperacni_PSA	1	0.06002	0.02475	5.8778	0.0153	1.062	1.012	1.115

Tab. 28: Analýza vztahu bezpříznakového období a hodnoty předoperačního PSA.

Obr. 14: Pravděpodobnost přežití pacientů v závislosti na předoperační hodnotě PSA (ng/ml)

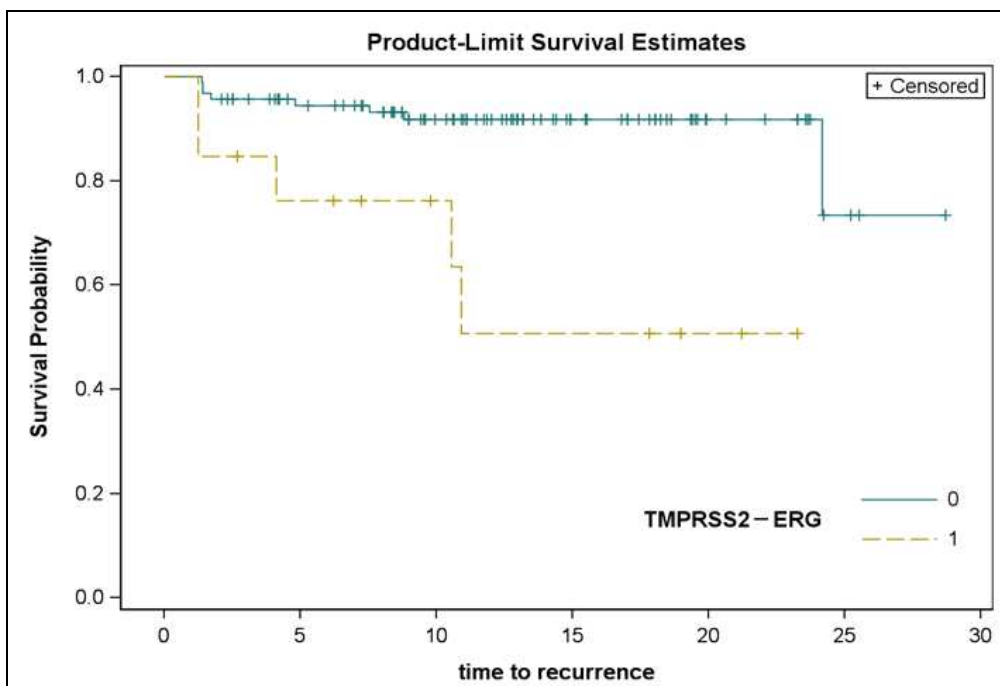


Dále jsme zaznamenali vztah přítomnosti TMPRSS2:ERG v nádorové tkáni a doby DFI, hodnoceno u všech pacientů (Coxův model, $p=0.0020$).

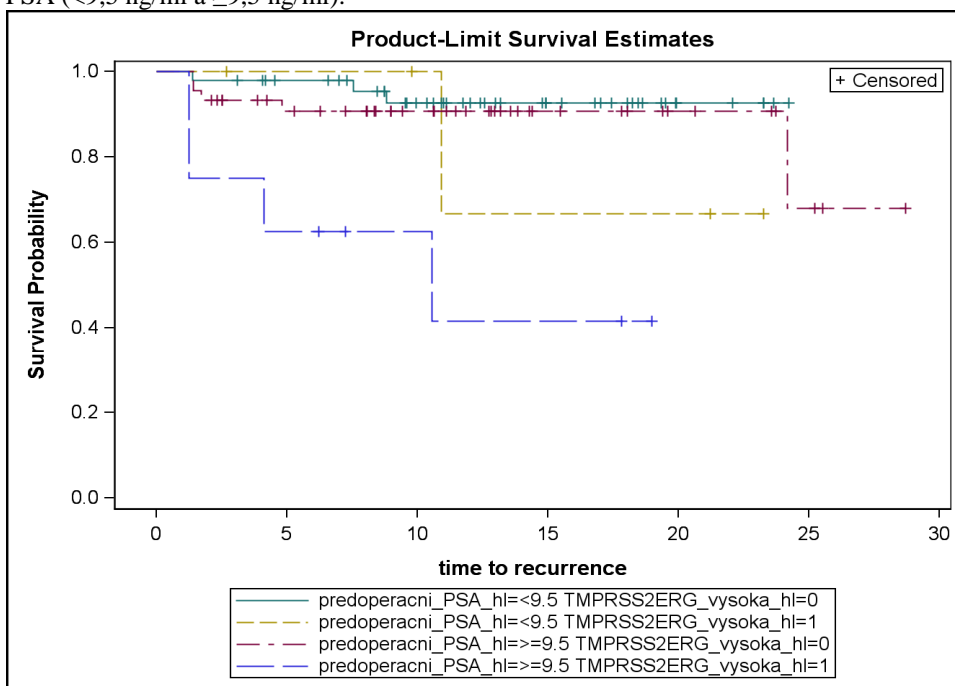
Parameter	DF	Parameter Estimate	Standard Error	Chi-Square	P-value	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
TMPRSS2:ERG pozitivní	1	1.81531	0.58649	9.5804	0.0020	6.143	1.946	19.391

Tab. 28: Analýza vztahu bezpříznakového období a přítomnosti fúzního genu TMPRSS2:ERG.

Obr. 15: Pravděpodobnost přežití v závislosti na přítomnosti fúzního genu. TMPRSS2:ERG.



Nakonec jsme zjišťovali, jak ovlivňuje délku DFI jak přítomnost fúzního genu TMPRSS2:ERG, tak hladina PSA stanovená před operací. Nejkratší bezpříznakové období jsme zaznamenali u pacientů s přítomností fúzního genu TMPRSS2:ERG a vysokou hladinou PSA ($\geq 9,5$ ng/ml) ukazuje obrázek 16.

Obr. 16: Pravděpodobnost přežití u všech pacientů rozdělených do čtyř skupin podle hodnot předoperačního PSA ($<9,5$ ng/ml a $\geq 9,5$ ng/ml).

6. Diskuse

Přes nezanedbatelný přínos screeningových metod karcinomu prostaty (stanovení PSA), je hlavní limitací této metody nedostatečná specificita, která vyúsťuje ve velké množství zbytečně prováděných biopsií. Druhým hlavním problémem diagnostiky karcinomu prostaty je v současnosti nemožnost identifikovat ty karcinomy, které budou následně progradovat a ohrozí pacienta na životě, od těch, které budou růst pomalu a při daném věku pacienta by jej na životě neohrozily. Ty jsou pak po úmrtí pacienta z jiných příčin nacházeny při pitvách padesátiletých u třetiny mužů a u osmdesátiletých v 80% (Hora et al, 2013). V současnosti je jediným kurativním přístupem v léčbě CaP radikální prostatektomie v časném stádiu onemocnění, která je však spojena s řadou negativních vedlejších efektů ve smyslu snížení kvality života.

Výše uvedené je důvodem pro hledání nových markerů pro diagnostiku CaP s vyšší senzitivitou a vyšší specificitou, které by snížily procento negativních biopsií (Bunting, 2002). A dále je snaha nalézt markery, které umožní odhalení agresivnějších forem karcinomu prostaty, což byl cíl této diplomové práce.

U všech pacientů, u kterých jsme prováděli stanovení námi vybraných markerů, jsme měli také k dispozici rutinně stanovené předoperační hodnoty PSA a hodnoty stanovované v pooperačním období. Ty jsme využili pro stanovení biochemické recidivy.

Zjistili jsme, že se hodnoty předoperačních hladin PSA (medián) zvyšují se vzrůstajícím stádiem onemocnění, ale nedosahují statisticky významných hodnot. Avšak jedná se o indicii, že zařazení pacientů do jednotlivých stádií je odpovídající. Stejně tak pacienti s vyšším gradingem měli vyšší medián předoperačních hodnot PSA a pacienti s vyšším Gleason skóre měli také vyšší medián PSA (oboje statisticky nesignifikantní). Je třeba poznamenat, že vyšší hodnoty Gleason skóre jsou pokročilejším stádiem v době stanovení diagnózy (výsledky 5.2.1).

Jedním z nových markerů karcinomu prostaty pro časnou diagnostiku je stanovení genu PCA3. Tento gen patří do rodiny nekódujících RNA lncRNA a přestože byl jeho vztah ke karcinomu prostaty objeven již v roce 1999, je zajímavé, že se zatím nepodařilo nalézt přesnou funkci této lncRNA. My jsme zaznamenali statisticky signifikantně vyšší hladinu ($p < 0,0001$) PCA3 v nádorové tkáni oproti normální prostatické tkáni. Tento výsledek je v souladu s již publikovanými daty autorů de Kok et al (2002), Hessels et al (2004) a Klečka et al (2010b). Toto naše pozorování potvrzuje vhodnosti použití tohoto markeru pro

diagnostiku karcinomu prostaty. Na druhou stranu jsme nezaznamenali vztah hladin tohoto markeru k délce DFI. Můžeme říci, že hladiny byly stanoveny velice přesně a to přímo v nádorové tkáni. Tento náš výsledek nepotvrzuje vhodnost stanovení exprese PCA3 pro detekci agresivních forem karcinomu prostaty.

Jako další potenciální markery z rodiny non coding RNA jsme stanovovali miR-23b, miR-221 a miR-26a. Tyto mikroRNA mimo jiné dráhu PI3K/AKT/mTOR, jednu z hlavních deregulovaných drah karcinomu prostaty. Tato dráha je inhibována proteinem exprimovaným genem PTEN, který inhibuje přeměnu IP2 na IP3, který je aktivátorem této signální dráhy. Inaktivace genu PTEN byla zaznamenána u řady solidních nádorů, proto miRNA snižující expresi genu PTEN, jsou potenciálními markery rozvoje karcinomu prostaty (Bhattachariya et al, 2013; Tian et al, 2013). Proto jsme se rozhodli ro stanovení právě těchto miRNA s předpokladem jejich pronádorového efektu v karcinomu prostaty.

Na úvod diskuse výsledků stanovení mikroRNA v nádorové a nenádorové tkáni je třeba poznamenat, že tyto výsledky nás zklamaly. Důvod, proč jsme se rozhodli stanovovat molekuly mikroRNA jako potenciální nádorové markery je ten, že vykazují vysokou stabilitu v prostředí nepříznivém pro ostatní typy molekul (obzvláště pro mRNA). Protože se jedná o velice malé molekuly s vysokou stabilitu jak v biologických tekutinách, tak ve vzorcích zpracovaných laboratorními technikami, např ve FFPE. Z laboratorního hlediska se jedná o molekuly vhodné pro úlohu biomarkeru. Signifikantní rozdíl mezi nádorovou a normální tkáni jsme zaznamenali pouze u molekuly miR-221. Hladina molekuly miR-221 byla nižší v nádorové tkáni oproti zdravé tkáni. Již publikace autorů Gordanpour et al, 2011, ukázala odlišné chování miR-221 v nádorové tkáni prostaty oproti nádorovým tkáním jiných solidních nádorů. Zjistili, že CaP s přítomností s fúzního genu TMPRSS2:ERG vykazuje sníženou hladinu miR-221. My jsme zaznamenali sníženou hladinu miR-221 u všech karcinomů prostaty. Na druhou stranu signifikantně vyšší hladinu miR-221 u generalizovaného CaP ve srovnání s lokalizovaným karcinomem našel kolektiv Yaman-Agaoglu (2011).

Dále jsme zaznamenali statisticky signifikantně vyšší hladiny miR-23b a miR-26a ve vzorcích s Gleason skóre 7 ve srovnání se vzorky Gleason skóre 6, což znamená zvýšení hladiny miR-23b a miR-26a u méně diferencovaných nádorů. Pro relevanci těchto výsledků mluví, z pohledu naší studie, počet pacientů v jednotlivých skupinách. U Gleason skóre 6 - 37 pacientů, Gleason skóre 7 - 54 pacientů. Vyšší hladiny těchto miRNA způsobují zvýšenou inhibici exprese genu PTEN, jednoho z hlavních inhibitorů dráhy

PI3K/AKT/mTOR. Důsledkem této inhibice je vyšší aktivita této signální dráhy a následně větší deregulace buněčného cyklu.

Hlavní cíl však bylo zjištění vztahu námi stanovených mikroRNA k délce bezpříznakového období, a tím i k agresivitě CaP. Proto bylo zklamáním, že jsme nezaznamenali vztah hladiny žádné z námi stanovených miRNA k DFI, to znamená, nenalezli jsme opodstatnění pro využití těchto miRNA jako markeru progresu karcinomu prostaty.

Přítomnost fúzního genu TMPRSS2:ERG jsme zaznamenali pouze ve 12% všech analyzovaných karcinomů prostaty. Literární údaje uvádějí výskyt fúzního genu TMPRSS2:ERG až u 50% CaP (Svensson et al, 2011). Naše vysvětlení, proč jsme detekovali přítomnost fúzního genu pouze ve 12%, je dvojitá. Jednak jsme detekovali konkrétní typ přestavby, který je považován za nejagresivnější ve svém projevu, což se také potvrdilo nalezením vztahu přítomnosti tohoto genu k DFI, jednak vzorky, ve kterých byl gen analyzován, pocházely z parafinových bločků, kde proces fixace vede k degradaci RNA. To znamená, že u vzorků s malým procentem klonů s přestavbou jsme nemuseli přítomnost námi detekované přestavby zaznamenat. Na druhou stranu, pokud jsme přítomnost fúzního genu zaznamenali, nachází se v dané nádorové tkáni tento fúzní gen s vysokou jistotou.

Použití tkáňových bločků však bylo z naší strany záměrné. Vzorky tkáně jsme izolovali tzv. mikrodisekcí, a to dle eosinového sklíčka, na kterém patolog přesně označil nádorovou tkáň. Měli jsme tak jistotu, že námi detekované markery jsou měřeny v nádorové resp. normální tkáni a izolovaná RNA není "kontaminována" RNA z druhého typu tkáně. Toto bylo zvláště důležité pro stanovení mikroRNA, která je narozdíl od fúzního genu přítomna i u normální, nenádorové tkáně. Také je třeba uvést, že pro praxi jsou samozřejmě vhodná stanovení markerů v periferní krvi nebo v moči. Abychom mohli vybrat vhodné markery pro provedení analýz v těchto tělních tekutinách, je nutné znát přesné údaje o jejich vztahu ke klinickým datům na základě stanovení v samotné nádorové tkáni.

Zjistili jsme, že přítomnost fúzního genu TMPRSS2:ERG v jednotlivých stádiích onemocnění koresponduje se závažností stádia onemocnění a se závažností gradingu. U stádia I onemocnění jsme při počtu 16 pacientů zaznamenali přítomnost fúzního genu pouze u jednoho z nich (tj. u 6% pacientů stádia I), u stádia II u 9,5% pacientů, a u stádia III u 21% pacientů.

Nejvíce nás zajímal vztah k přítomnosti fúzního genu TMPRSS2:ERG k nádorové tkáni k délce bezpříznakového období, v našem případě určeném na základě biochemické recidivy. Zaznamenali jsme tento vztah statisticky signifikantní ($p=0,002$). Pacienti, v jejichž nádorové tkáni došlo k přestavbě mezi geny TMPRSS2 a ERG, měli kratší

bezpříznakové období, recidiva onemocnění u nich nastala dříve. Z toho důvodu je dle našich výsledků z námi stanovených markerů pro identifikaci agresivních forem karcinomu prostaty fúzní gen TMPRSS2:ERG nejvhodnější. Je třeba přiznat, že vztah k DFI jsme zaznamenali také u hodnot předoperačního PSA ($p=0,0153$), ale z výsledků vyplývá, že pro detekci agresivnějších forem karcinomu prostaty je vhodnější TMPRSS2:ERG ($p=0,002$). Podobně se vyjádřili v diskusi ke svému článku "Comparative assessment of urinary prostate cancer antigen 3 and TMPRSS2:ERG gene fusion with the serum [-2]prostate-specific antigen-based prostate health index for detection of prostate cancer" jeho autor Carsten Stephan (2013).

Zajímavý výsledek ve vztahu k DFI přinesla kombinace markerů TMPRSS2:ERG a předoperačního PSA. Pacienti s přítomným fúzním genem v nádorové tkáni a vysokými před hladinami PSA vykazovali nejkratší bezpříznakové období (obr. poslední graf). Tento výsledek byl však získán u malého počtu pacientů.

6. Závěry

7.1 Závěry diplomové práce

- 1) Zaznamenali jsme statisticky významný vztah předoperační hladiny PSA a bezpříznakového období (DFI).
 - tento výsledek podporuje současné snahy hledání různých forem vyhodnocení PSA v periferní krvi pro získání co nejlepšího diagnostického výsledku (např. PHI).
- 2) Zaznamenali jsme statisticky významný vztah přítomnost genu TMPRSS2:ERG v nádorové tkáni k bezpříznakovému období ($p=0,0020$).
 - tento marker v rámci možností naší studie naplnil její cíl, schopnost odhalit agresivnější formy karcinomu prostaty
- 3) Statisticky signifikantně vyšší byly hodnoty exprese genu PCA3 v nádorové tkáni oproti nenádorové tkáni.
 - stanovení exprese genu PCA3 potvrdilo svůj diagnostický potenciál, spolehlivé odlišení nádorové prostaty od nenádorové tkáně.
- 4) Hladina miR221 byla statisticky signifikantně snižena v u nádorové tkáni oproti normální tkáni ($p < 0.0001$; resp. $p < 0.0005$).
 - vysvětlení důvodu snížené hladiny miR-221 v nádorové tkáni oproti nenádorové tkáni, vyžaduje další analýzy, protože se odlišuje od chování této mikroRNA u jiných solidních nádorů.

7.2 Závěry pro klinickou praxi

Na základě výsledků této práce je možno konstatovat, že pro klinickou praxi bude přínosné vytvoření rozsáhlejších studií stanovení fúzního genu TMPRSS2:ERG v moči pacientů s podezřením na karcinom prostaty pro potvrzení schopnosti tohoto markeru odhalit agresivnější formy karcinomu prostaty.

Dále je třeba konstatovat, že stanovení PSA nevyčerpalo svůj diagnosticko-prognostický potenciál.

8. Seznam použité literatury

- Abate-Shen C, Shen MM. 2002. Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet* (2002) 18(5):S1–5.
- Afar DE, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E. 2001. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res* 2001; 61: 1686-1692.
- Aharinejad S, Sioud M, Lucas T, Abraham D. 2009. Targeting stromal-cancer cell interactions with siRNAs. *Methods Mol Biol* 2009; 487: 243-266.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Základy buněčné biologie* (překlad z anglického originálu), Espero Publishing, Ústí n/Labem 2002.
- Antonarakis ES, Eisenberger MA. 2009. Is abiraterone acetate well tolerated and effective in the treatment of castration-resistant prostate cancer? *Nat Clin Pract Oncol*;6(1):12-3.
- Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D et al. 2009. Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 2009;69: 2912–2918.
- Babjuk M, Hora M, Katolická J, Kubecová M et al. 2013. Doporučené postupy pro hormonální léčbu karcinomu prostaty 2012. Výbor ČUS. Publikováno: 10.1.2013.
- Babjuk M., Matoušková M. 2011. Zhoubné nádory prostaty. Společné Doporučené postupy v uroonkologii ČUS, ČOS a SROBF. Dokumenty ČOS ČLS JEP, Česká urologická společnost ČLS JEP. 18. 10. 2011.
- Balaguer F, Link A, Lozano JJ, Cuatrecasas M et al. 2010. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 70(16):6609-6618.
- Balík M, Brod'ák M. 2011. Lokalizovaný karcinom prostaty - diagnostika a léčba. *Urol. praxi*, 2011; 12(2): 105-110.
- Bangma CH, Roemeling S, Schroder FH. 2007. Overdiagnosis and overtreatment of early detected prostate cancer. *World J Urol* 2007; 25:3-9.
- Basu A, Banerjee H, Rojas H, Martinez SR et al. 2011. Differential expression of peroxiredoxins in prostate cancer: consistent upregulation of PRDX3 and PRDX4. *Prostate*;71(7):755-65.
- Bhattachariya A, Dahan D, Turczynska KM, Swärd K et al. 2013. Expression of microRNAs is essential for arterial myogenic tone and pressure-induced activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Cardiovasc Res. PLoS One*. 2013; 8(9): e75885.
- Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H et al. 2011. SPCG-4 Investigators. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *Engl J Med*; 364 : 1708–1717.
- Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F et al. 2008. Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 2008; 111: 3498-3506.
- Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A. 2007. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*;28(7):1379-86.
- Bluemn EG, Nelson PS. 2012. The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 24(3):251–7.
- Body JJ. 1992. Metastatic bone disease: clinical and therapeutic aspects. *Bone* 13 Suppl 1: S57–62.
- Bohlander SK. 2005. ETV6: A versatile player in leukemogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 15:162–174.
- Bolla M, van Poppel H, Tombal B, Vekemans K et al. 2012. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: long-term results of a randomised controlled trial (EORTC trial 22911). EORTC and Genito-Urinary Groups. *Lancet*;380(9858):2018-27.
- Börno ST, Fischer A, Kerick M, Fälth M et al. 2012. Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2:ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation. *Cancer Discov.* 2012 Nov;2(11):1024-35.
- Bos JL. 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* 49 (17): 4682–9.
- Breivik J, Gaudernack G. 1999. Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 9: 245–254.
- Brethauer M, Kalager M. 2013. Principles, effectiveness and caveats in screening for cancer. *Br J Surg*; 100(1):55-65.
- British Medical Association (BMA). 1997. *Family Health Encyclopaedia*. London: BMA Books. Dorling Kindersley Publishers Ltd. 24. 4. 1997.
- Bunting PS. 2002. Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen: beware the biases. *Clin Chim Acta* 315:71-97 do diskse nebo zmizet.

- Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW et al. 1999. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*; 59: 5975–5979.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J et al. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392: 300–303.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R et al. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS* 99:13–18.
- Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Fernández-Serra A, López-Guerrero JA. 2012. Mi-RNA as biomarkers in prostate cancer. *Clin Transl Oncol Vol* 14, Nr 11, 803-811.
- Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. 1993. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA* 270(8):948.
- Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A et al. 2006. TMPRSS2-ERG gene fusion Causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia*, 8, 826–832.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV et al. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944-9.
- Cintra ML, Billis A. 1991. Histologic grading of prostatic adenocarcinoma. Intra-observer reproducibility of the Mostofi, Gleason, and Böcking grading systems. *Int Urol Nephrol* 1991; 23: 449–54.
- Clark J, Attard G, Jhavar S et al. 2008. Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene*;27:1993–2003.
- Clark JP, Cooper CS. 2009. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 6(8):429–39.
- Connolly JG. 1965. The Diagnosis of Early Carcinoma of the Prostate. *Can Med Assoc J*. 1965 Sept 25; 93(13): 704–706.
- Corner J. 2001. What is cancer? In: *Corner J, Bailey C (Editors), Cancer Nursing: Care in context*. Oxford: Blackwell Scientific.
- Crawford ED, DeAntoni EP, Etzioni R, Schaefer VC et al. 1996. Serum prostate-specific antigen and digital rectal examination for early detection of prostate cancer in a national community-based program. The Prostate Cancer Education Council. *Urology*;47(6):863.
- Cress AE, Rabinovitz I, Zhu W, Nagle RB. 1995. The $\alpha 6\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins in human prostate cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 14(3):219–28
- Cunha GR. 2008. Mesenchymal-epithelial interactions: past, present, and future. *Differentiation* 76(6):578–86.
- Cuzick J, Fisher G, Kattan MW, Berney D et al. 2006. Long-term outcome among men with conservatively treated localised prostate cancer. *Br J Cancer* 2006; 95:1186-94.
- Čihák R. 2002. Anatomie. 2. vydání. Praha: Grada, 2002. 488 pp. ISBN 80-247-0143-X.
- D'Amico AV, Chen M, Renshaw AA et al. 2008. Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer, a randomized trial. *JAMA*; 299: 289–295.
- da Silva HB, Amaral EP, Nolasco EL, de Victo NC et al. 2013. Dissecting major signaling pathways throughout the development of prostate cancer. *Prostate Cancer* 920612(10):29.
- D'Amico AV, Chen M, Roehl K, Catalona W. 2004. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med* 351 (2): 125–35.
- Daniel FI, Cherubini K, Yurgel LS, de Figueiredo MA, Salum FG. 2011. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. *Cancer* 117(4):677-687.
- de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW et al. 2002. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*; 62: 2695–2698.
- de la Taille A. 2007. Progens PCA3 test for prostate cancer detection. *Expert Rev Mol Diagn* 7(5): 491–7.
- De Luca S, Passera R, Bollito E, Milillo A et al. 2013. Biopsy and radical prostatectomy pathological patterns influence Prostate cancer gene 3 (PCA3) score. *Anticancer Res*;33(10):4657-62.
- De Marzo AM, Meecker AK, Epstein JI, Coffey DS. 1998. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol* 153(3):911–9.
- de Muga S, Hernandez S, Agell L, Salido M et al. 2010. Molecular alterations of EGFR and PTEN in prostate cancer: association with high-grade and advanced-stage carcinomas. *Mod Pathol* 23(5):703–12.
- Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O et al. 2007. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 26(31):4596–9.
- Deocampo ND, Huang H, Tindall DJ. 2003. The role of PTEN in the progression and survival of prostate cancer. *Minerva Endocrinol*. 28:145–153

- Dey BK, Gagan J, Yan Z, Dutta A. 2012. miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice. *Genes Dev.* 2012 Oct 1;26(19):2180-91.
- Dick, Frederick A., Rubin, Seth M. 2013. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2013;14(5):297-306.
- Dong B, Kim S, Hong S, Das Gupta J, Malathi K et al. 2007. An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:1655–1660.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B. 2001. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*; 344: 1031-7.
- Duffy MJ. 1996. PSA as a marker for prostate cancer: a critical rev. *Annals of Clin Biochemistry* 33: 511-519.
- Duncavage EJ, Goodgame B, Sezhiyan A, Pfeifer JD, Govindan R. 2010. MicroRNA Expression Levels to Predict Outcomes in Resected Stage I Non-small Cell Lung Cancer. *Jr of Thoracic Onc.* 2010;5(11):1755-63.
- Dušek L, Mužik J, Gelnarova J. 2010. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol* 2010; 23: 311–324.
- Dvořáček J. 2007. Karcinom prostaty – aktuální pohled. *Lékařské listy.* LL 19/2007
- Dvořáček J. 2008. Hormonální léčba karcinomu prostaty, její nová role a česká specialita. *Ces Urol* 2008; 12(3): 165–172.
- Egevad L, Allsbrook WC, Epstein JI. 2005. Current practice of Gleason grading among genitourinary pathologists. *Hum Pathol* 2005 Jan; 36(1):5-9.
- Ellett F, Kile BT, Lieschke GJ. 2009. The role of the ETS factor erg in zebrafish vasculogenesis. *Mech Dev* 2009; 126: 220-229.
- Ellwood-Yen K, Graeber TG, Wongvipat J, Iruela-Arispe ML et al. 2003. Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* 4(3):223–38.
- Epstein JI, Allsbrook WC jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee. 2005. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29(9):1228-42.
- Esgueva R, Perner S, LaFargue CJ, Scheble V et al. 2010. Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. *Mod Pathol* 23: 539-46.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. 2006. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259–269.
- Feldman BJ, Feldman D. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1:34–45.
- Felli N., Fontana L., Pelosi E., Botta R., Bonci D., Facchiano F et al. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *PNAS USA.* 102, 18081–18086.
- Fernández-Serra A, Rubio L, Calatrava A, Rubio-Briones J et al. 2013. Molecular Characterization and Clinical Impact of TMPRSS2-ERG Rearrangement on Prostate Cancer: Comparison between FISH and RT-PCR. *Biomed Res Int*; 2013: 465179.
- Filella X, Giménez N. 2013. Evaluation of [-2] proPSA and Prostate Health Index (phi) for the detection of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Apr;51(4):729-39.
- Foos G, Hauser CA. 2000. Altered Ets transcription factor activity in prostate tumor cells inhibits anchorage-independent growth, survival, and invasiveness. *Oncogene* 19: 5507–5516.
- Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A et al. 2008. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2008 Sep 25;27(43):5651-61.
- Foulds L. 1958. The natural history of cancer. *J Chronic Dis.* 1958 Jul;8(1):2-37.
- Frank SB, Miranti CK. 2013. Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development. *Front Oncol.* 2013 Oct 31;3:273.
- Freedland SJ. 2011. Screening, risk assessment, and the approach to therapy in patients with prostate cancer. *Cancer*;117(6):1123-35.
- Fu X., Wang Q., Chen J., Huang X et al. (2011). Clinical significance of miR-221 and its inverse correlation with p27(Kip1) in hepatocellular carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* 38, 3029–3035.
- Furusato B, Gao CL, Ravindranath L, Chen Y et al. 2008. Mapping of TMPRSS2-ERG fusions in the context of multi-focal prostate cancer. *Mod Pathol* 21(2):67–75.
- Gabriel JA et al. 2004. *The Biology of Cancer.* Whurr Publishers. London and Philadelphia. 200 pp.
- Galasko CS. 1981. Bone metastases studied in experimental animals. *Clin Orthop Relat Res*;(155):269–285.

- Geng J, Luo H, Pu Y, Zhou Z et al. 2012. Methylation mediated silencing of miR-23b expression and its role in glioma stem cells. *Neurosci Lett*;528(2):185-9.
- Gleason DF. 1977. The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In *Tannenbaum, M. Urologic Pathology: The Prostate. Philadelphia: Lea and Febiger.* pp. 171–198. ISBN 0-8121-0546-X.
- Goldstein AS, Huang J, Guo C, Garraway IP et al. 2010. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* 329(5991):568–71.
- Gordanpour A, Stanimirovic A, Nam RK, Moreno CS, Sherman C, Sugar L, Seth A. 2011. miR-221 Is down-regulated in TMPRSS2:ERG fusion-positive prostate cancer. *Anticancer Res.* 2011 Feb;31(2):403-10.
- Grad JM, Dai JL, Wu S, Burnstein KL. 1999. Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger rRNA. *Mol Endocrinol* 13(11):1896–911.
- Gray IC, Stewart LM, Phillips SM, Hamilton JA et al. 1998. Mutation and expression analysis of the putative prostate tumour-suppressor gene PTEN. *Br J Cancer* 78(10):1296–300.
- Groskopf J, Auhin SMJ, Deras IL et al. 2006. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*; 52: 1089–1095.
- Haese A, de la Taille A, van Poppel H et al. 2008. Clinical Utility of the PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy. *Eur Urol* 54 (5):1081.
- Hara M, Inorre T, Fukuyama T. 1971. Some physicochemical characteristics of gamma-seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma. *Jpn J Legal Med.* 1971;25:322-324.
- Harding MA, Theodorescu D. 2000. Prostate tumor progression and prognosis. Interplay of tumor and host factors. *Urol. Oncol.* 5: 258–264.
- He HC, Zhu JG, Chen XB, Chen SM et al. 2012. MicroRNA-23b downregulates peroxiredoxin III in human prostate cancer. *FEBS Lett*;586(16):2451-8.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E et al. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435 (7043): 828–33.
- Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. 1997. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations. *Urology* 50 (2): 239–43.
- Hes O, Michal M, Hora M. 2006. Histologické vyšetření prostaty zaměřené na adenokarcinom. *Lékařské listy* 5/2006. LF UK a FN v Plzni.
- Hessels D, Klein Gunnewiek JM et al. 2004. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003; 44: 8–16.
- Honn KV, Tang DG. 1992. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metastasis Rev* 11: 353–375.
- Hora M, Eret V, Janda V, Klečka J, Stránský P, Trávníček I, Ůrge T. 2013. Urologie pro studenty všeobecného lékařství. Urologická skripta LF UK v Plzni. Dostupné na <https://moodle.mefanet.cz>.
- Huang PW, Lee CH. 2009. Automatic classification for pathological prostate images based on fractal analysis. *IEEE Trans Med Imaging.* 2009 Jul; 28(7):1037-50.
- Huggins C. 1942. Effect of orchietomy and irradiation on cancer of the prostate. *Ann Surg*; 115: 1192–1200.
- Huggins C. 1947. Anti-androgenic Treatment of Prostatic Carcinoma in Man, Approaches to Tumor Chemotherapy. Washington, DC: Am Ass for the Adv of Sci 1947; 379–383.
- Huggins C. 1972. Endocrine-induced regression of cancers. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1963–1970. Amsterdam: Elsevier 1972; 235–247.
- Chai ZT, Kong J, Zhu XD, Zhang YY, Lu L, Zhou JM, et al. 2013. MicroRNA-26a Inhibits Angiogenesis by Down-Regulating VEGFA through the PIK3C2 α /Akt/HIF-1 α Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2013 Oct 23;8(10):e77957.
- Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR. 1982. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297 (5866): 479–83.
- Icli B, Wara AK, Moslehi J, Sun X et al. 2013. MicroRNA-26a Regulates Pathological and Physiological Angiogenesis by Targeting BMP/SMAD1 Signaling. *Circ Res.* 2013 Nov 8;113(11):1231-41.
- Iljin K, Wolf M, Edgren H, Gupta S et al. 2006. TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 66: 10242–10246.
- Ip S, Dahabreh IJ, Chung M, Yu WW et al. 2011. An evidence review of active surveillance in men with localized prostate cancer. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep).* 2011 Dec;(204):1-341.

- Isaacs JT, Coffey DS. 1989. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 2:33–50.
- Jacobs SC. 1983. Spread of prostatic cancer to bone. *Urology* 21(4):337–344.
- Jarolím L. 2005. Karcinom prostaty. *Postgraduální medicína PM* 5/2005.
- Jaworski T. 2006. Degradation and beyond: control of androgen receptor activity by the proteasome system. *CellMolBiolLett* 11(1):109–31.
- Jerónimo C, Bastian PJ, Bjartell A et al. 2011. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. *Eur Urol* 2011; 60(4):753–66.
- Joerger AC, Fersht AR. 2007. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* 26(15):2226–42.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):635–47.
- Johnston D, Terris MK. 2011. PSA velocity may not be of value in prostate cancer detection. *Asian J Androl*; 13(4): 616–617.
- Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. 2000. Cancer genetics. *In: Schmitt W (ed.), Medical Genetics*, 2nd edn. St Louis: Mosby, pp. 221–238.
- Jost M, Day JR, Slaughter R, Koreckij TD et al. 2010. Molecular assays for the detection of prostate tumor derived nucleic acids in peripheral blood. *Mol Cancer*;9:174.
- Kanwal R, Gupta S. 2012. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 81(4):303–311.
- Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S et al. 2005. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2005;96(2):111–5.
- Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 4/1997, 386, 627, 761–763.
- Klečka J, Holubec L, Pešta M, Topolčan O et al. 2010b. Differential display code 3 (DD3/PCA3) in prostate cancer diagnosis. *Anticancer Res*; 30(2):665–70.
- Klečka J, Hora M, Holubec L, Pešta M et al. 2010a. [Expresse DD3^{PCA3} (Differential Display Code 3) mRNA ve tkáni prostaty u pacientů s karcinomem prostaty a benigní hyperplazií prostaty.] *Ces Urol* 2010 [Article in Czech];14(1): 39–47.
- Klener P, Klener P jr. 2010. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. Grada Publishing a.s., 2010. 232 pp.
- Knudson AG. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (4): 820–823.
- Knudson AG. 2002. Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*. červenec 2002, roč. 111, čís. 1, s. 96–102
- Koh CM, Bieberich CJ, Dang CV, Nelson WG et al. 2010. MYC and prostate cancer. *Genes Cancer* 1(6):617–28.
- Kovar H. 2005. Context matters: The hen or egg problem in Ewing's sarcoma. *Semin. Cancer Biol*. 15:189–196.
- Král M, Rosinská V, Študent V, Grepl M, Hrabec M, Bouchal J. 2010. Genetic determinants of prostate cancer: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*. 2011 Mar;155(1):3–9.
- Král M, Študent V, Hrabec M. 2008. Predikční nomogramy u karcinomu prostaty. *Urolog. pro Praxi*; 9(1):33–36.
- Kumar A, Goel AS, Hill TM, Mikolajczyk SD et al. 1996. Expression of human glandular kallikrein, hK2, in mammalian cells. *Cancer Research* 56, 5397–5402.
- Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. 2008. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8(7):497–511.
- Lamb LE, Knudsen BS, Miranti CK. 2010. E-cadherin-mediated survival of androgen-receptor-expressing secretory prostate epithelial cells derived from a stratified in vitro differentiation model. *J Cell Sci* 123 (Pt 2):266–76.
- Lamb LE, Zarif JC, Miranti CK. 2011. The androgen receptor induces integrin alpha6beta1 to promote prostate tumor cell survival via NF-kappaB and Bcl-xL Independently of PI3K signaling. *Cancer Res* 71(7):2739–49.
- Lang SH, Clarke NW, George NJ, Allen TD et al. 1998. Interaction of prostate epithelial cells from benign and malignant tumor tissue with bone-marrow stroma. *Prostate*;34(3):203–213.
- Lang SH, Clarke NW, George NJ, Testa NG. 1997. Primary prostatic epithelial cell binding to human bone marrow stroma and the role of alpha2beta1 integrin. *Clin Exp Metastasis*;15(3):218–227.
- Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K et al. 2007. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 67(18):8504–10.
- Laxman B, Morris DS, Yu J et al. 2008. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*. 68 (3): 645–9.

- Leinonen J, Zhang WM, Stenman UH. 1996. Complex formation between PSA isoenzymes and protease inhibitors. *Journal of Urology*. 155, 1099-1103.
- LePrince D, Geggion A, Coll J, De Taisne C et al. 1983. A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306 (5941): 395–397.
- Li TS, Beling CG. 1973. Isolation and characterization of two specific antigens of human seminal plasma. *Fertil Steril*. Feb 1973;24(2):134-44.
- Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S et al. 1999. Prostate localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res* 59: 4180–4184.
- Lin HK, Hu YC, Lee DK, Chang C. 2004. Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 18(10):2409–23.
- Liu W, Laitinen S, Khan S et al. 2009. Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med*;15:559–565.
- Liu W, Zabirnyk O, Wang H, Shiao YH et al. 2010. miR-23b targets proline oxidase, a novel tumor suppressor protein in renal cancer. *Oncogene*;29(35):4914-24.
- Loeb LA. 1994. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Research* 54: 5059–5063.
- Lovgren J, Rajakoski K, Karp M, Lundwall A, Lilja H. 1997. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 238, 549-555.
- Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. 2007. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*. 67:6031-6043.
- Lukacs RU, Lawson DA, Xin L, Zong Y. 2008. Epithelial stem cells of the prostate and their role in cancer progression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;73:491-502.
- Lukeš M. 2013. Karcinom prostaty. In: *Heráček J, Urban M et al. Urologie pro studenty [online], [cit. 09.11.2013]. Androgeos, [2013]. Dostupný z WWW: <http://www.urologieprostudenty.cz>. Verze 2.0 [2013], ISBN 978-80-254-1859-8.*
- Lupini L, Bassi C, Ferracin M, Bartonicek N et al. 2013. miR-221 affects multiple cancer pathways by modulating the level of hundreds messenger RNAs. *Front Genet*. 2013 Apr 25;4:64.
- Mackinnon AC, Yan BC, Joseph LJ, Al-Ahmadie HA. 2009. Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer: an update. *Arch Pathol Lab Med*;133(7):1033-40.
- Madersbacher S, Schatzl G, Brössner C, Dreikorn K. 2005. [Phytotherapy for BPS. Which products can still be prescribed?]. [Article in German] *Urologe A*. 44(5):513-20.
- Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. 2011. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology*. 2011 May;77(5):1265.e9-16.
- Majid S, Dar AA, Saini S, Arora S et al. 2012. MicroRNA-23b represses proto-oncogene Src kinase, functions as a methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer. *Cancer Res*. 2012 Oct 16.
- Mao X, Boyd LK, Yáñez-Muñoz RJ, Chaplin T et al. 2011. Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. *Am J Cancer Res*. 2011;1(5):604-17.
- Masopust J, Bartůňková J, Goetz P, Chromý V et al. 2003. *Patobiochemie buňky*. Univerzita Karlova v Praze. 2. lékařská fakulta. Praha 2003.
- Mazzone M, Selfors LM, Albeck J, Overholtzer M et al. 2010. Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to Notch pathway activation in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(11):5012–7.
- McLeod DG, Iversen P, See WA et al. 2005. Bicalutamid 150 mg plus standard care vs. standard care alone for early prostate cancer. *BJU*; 97: 247–254.
- McNeal JE. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* (1981) 2(1):35–49.
- Mehra R, Han B, Tomlins SA et al. 2007. Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res* 2007;67:7991–7995.
- Mehra R, Tomlins SA, Yu J et al. 2008. Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. *Cancer Res*;68:3584–3590.
- Mehrotra J, Varde S, Wang H, Chiu H et al. 2008. Quantitative, spatial resolution of the epigenetic field effect in prostate cancer. *Prostate*;68(2):152-60.
- Meigs JB, Barry MJ, Oesterling JE, Jacobsen SJ. 1996. Interpreting results of prostate-specific antigen testing for early detection of prostate cancer. *J Gen Intern Med*;11(9):505.
- Mikhail AA, Orvieto MA, Billatos ES et al. 2006. Robotic assisted laparoscopic prostatectomy: first 100 patients with one year of followup. *Urology* 2006; 68: 1275-9.

- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 233-45.
- MKN-O-3 (Mezinárodní statistická klasifikace nemocí pro onkologii 2004), ÚZIS ČR. 3. vydání (česká verze) ISBN: 80-7280-373-5, 29. Červen 2005
- Montironi R, Mazzuccheli R, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, Fellegara G, Algaba F. 2005. Gleason grading of prostate cancer in needle biopsies or radical prostatectomy specimens: contemporary approach, current clinical significance and sources of pathology discrepancies. *BJU Int.* 2005 Jun; 95(8):1146-52.
- Mortensen RD, Serra M, Steitz JA, Vasudevan S. 2011. Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(20):8281-6.
- Moyer V. 2012. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*; 157: 120–134.
- Nam RK, Sugar L, Yang W et al. 2007. Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(12):1690-5.
- Negrini M, Ferracin M, Sabbioni S, Croce CM. 2007. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci.* 120 (Pt 11): 1833–40.
- Novotvary 2009. ÚZIS ČR, NOR ČR, 2012. Publikace. Zdravotnická statistika. Česká republika. ISBN: 978-80-7280-975-2.
- Novotvary 2010. ÚZIS ČR, NOR ČR, 2013. Publikace. Zdravotnická statistika. Česká republika. ISBN 978-80-7472-034-5.
- Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH. 1983. Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306 (5941): 391–395.
- O'Dowd GJ, Veltri RW, Miller MC, Strum SB. 2001. The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostatic cancer Aggressiveness on Biopsy. Prostatic cancer Research Institute: PCRI Insights, vol. 4, no.1, pp. 1-5.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435 (7043): 839–43.
- Oliveira IS, Pontes-Junior J, Abe DK, Crippa A et al. 2010. Undergrading and understaging in patients with clinically insignificant prostate cancer who underwent radical prostatectomy. *Int Braz J Urol*;36(3):292-9.
- Özdamar SO, Sarikaya S, Yildiz L et al. 1996. Intra-observer and interobserver reproducibility of WHO and Gleason histologic grading systems in prostatic adenocarcinomas. *Int Urol Nephrol* 1996; 28: 73–7
- Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, Pflueger D et al. 2010. Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med* 16(7):793–8.
- Pang Y, Young CY, Yuan H. 2010. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*; 42(6):363-9.
- Paoloni-Giacobino A, Chen H, Peitsch MC, Rossier C, Antonarakis SE. 1997. Cloning of the TMPRSS2 gene, which encodes a novel serine protease with transmembrane, LDLRA, and SRCR domains and maps to 21q22.3. *Genomics* 1997; 44: 309-320.
- Pedersen EA, Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. 2012. The prostate cancer bone marrow niche: more than just 'fertile soil'. *Asian J Androl*;14(3):423-7.
- Peraldo-Neia C, Migliardi G, Mello-Grand M, Montemurro F et al. 2011. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation analysis, gene expression profiling and EGFR protein expression in primary prostate cancer. *BMC Cancer* (2011) 11:31.
- Perkel JM. 2013. Visiting "Noncodarnia". *BioTechniques* 54 (6): 301–304.
- Perner S, Demichelis F, Beroukhir R, Schmidt FH et al. 2006. TMPRSS2:ERG Fusion-Associated Deletions Provide Insight into the Heterogeneity of Prostate Cancer. *Cancer Res* 66, 8337-41.
- Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD et al. 2007. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol* 31(6):882–8. 75.
- Pesta M, Topolcan O, Kulda V, Hes O, Klecka J, Hora K. (2014 - nepublikováno). DD3/PCA3 (Differential Display Code 3) in Prostate Cancer Diagnosis (Experience from Czech Republic)
- Pešta M, Kulda V. 2012 v 10. kap. *In: Ondřej Slabý, Marek Svoboda et al. MikroRNA v onkologii.* 1. vyd. Praha: Galén, 2012, 324 pp.
- Petruželka L, Konopásek B et al. 2003. *Klinická onkologie.* 1. vydání. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0395-0.
- Pflueger D, Rickman DS, Sboner A, Perner S et al. 2009. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is fused to ERG in prostate cancer. *Neoplasia*; 11: 804-11.

- Pflueger D, Terry S, Sboner A, Habegger L et al. 2011. Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res* 21: 56-67. *Genome Res.* 2011 Jan;21(1):56-67
- Phillips C. 2011. PSA Velocity Does Not Improve Prostate Cancer Detection. *NCI Cancer Bulletin*, 8/5.
- Pienta KJ, Abate-Shen C, Agus DB, Attar RM et al. 2008. The current state of preclinical prostate cancer animal models. *Prostate* 68(6):629–39.
- Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL et al. 2007. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67:6130–5.
- Prajapati A, Gupta S, Mistry B, Gupta S. 2013. Prostate stem cells in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer: emerging role and concepts. *Biomed Res Int.* 2013:107954.
- Prensner JR, Chinnaiyan AM. 2009. Oncogenic gene fusions in epithelial carcinomas. *Curr Opin Genet Dev* 19: 82–91.
- ProgenSA PCA3 test - Gen-probe. [dostupné online] <http://www.gen-probe.com/products-services/progenSA-pca-assay> 26. 11. 2013.
- Qian J et al. 2011. The role of microRNAs in the formation of cancer stem cells: Future directions for miRNAs. *Hypothesis* 2011, 9(1).
- Quintavalle C., Garofalo M., Zanca C., Romano G et al. (2012). miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPmu. *Oncogene* 31, 858–868.
- Racek J et al. 2006. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2006.329 pp.
- Ribeiro FR, Paulo P, Costa VL, Barros-Silva JD. 2011. Cysteine-rich secretory protein-3 (CRISP3) is strongly upregulated in prostate carcinomas with the TMPRSS2-ERG fusion gene. *PLoS One.* 2011;6(7):e22317.
- Rokhlin OW, Cohen MB. 1995. Expression of cellular adhesion molecules on human prostate tumor cell lines. *Prostate* 26: 205–212.
- Rubio-Briones J, Fernández-Serra A, Ramírez M, Rubio L et al. 2011. [Resultados del uso expandido del PCA3 score en una población española con sospecha de cáncer de próstata.] [Article in Spanish] *Act Urol Esp* 35:589–596.
- Ryan BM, Robles AI, Harris CC. 2010. Genetic variation in microRNA. *Nat Rev Cancer* 10:389–402
- Saini S, Majid S, Dahiya R. 2010. Diet, microRNAs and prostate cancer. *Pharm Res* 27:1014–1026.
- Salagierski M, Mulders P, Schalken JA. 2013. Predicting prostate biopsy outcome using a PCA3-based nomogram in a Polish cohort. *Anticancer Res*;33(2):553-7.
- Salagierski M, Schalken JA. 2012. Molecular diagnosis of prostate cancer: PCA3 and TMPRSS2:ERG gene fusion. *J Urol* 187:795–801.
- Salvi A, Arici B, Portolani N, Giulini SM et al. 2007. In vitro c-met inhibition by antisense RNA and plasmid-based RNAi down-modulates migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*;31(2):451-60.
- Salvi A, Sabelli C, Moncini S, Venturin M et al. 2009. MicroRNA-23b mediates urokinase and c-met downmodulation and a decreased migration of human hepatocellular carcinoma cells. *FEBS J*;276(11):2966-82.
- Sashida G, Bazzoli E, Menendez S, Liu Y, Nimer SD. 2010. The oncogenic role of the ETS transcription factors MEF and ERG. *Cell Cycle* 2010; 9: 3457-3459.
- Scott LJ, Clarke NW, George NJ, Shanks JH et al. 2001. Interactions of human prostatic epithelial cells with bone marrow endothelium: binding and invasion. *Br J Cancer*;84(10):1417-23.
- Sensabaugh GF. 1978. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci.* Jan 1978;23(1):106-15.
- Shah RB, Chinnaiyan AM. 2009. The discovery of common recurrent transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)-erythroblastosis virus E26 transforming sequence (ETS) gene fusions in prostate cancer: significance and clinical implications. *Adv Anat Pathol* 2009; 16(3):145-53.
- Shand RL, Gelmann EP. 2006. Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol* 2006; 16(3):123-31.
- Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH et al. 2007. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;104(50):19983-8.
- Shridhar P. 1979. The lymphatics of the prostate gland and their role in the spread of prostatic carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl.* 1979 March; 61(2): 114–122.
- Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I et al. 2010. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International journal of cancer.* *J Int Cancer*;126:1166–76.

- Schalken JA, van Leenders G. 2003. Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology* 62(5 Suppl 1):11–20.
- Schneiderka P et al. 2004. *Kapitoly z klinické biochemie*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0678-X.
- Schröder FH, van der Crujisen-Koeter I, de Koning HJ, Vis AN et al. 2000. Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *J Urol* 163:806-812.
- Silberstein T, Silberstein E, Saphier O. 2013. [Lycopene and tomatoes--their effect on prevention of prostatic cancer]. [Article in Hebrew]. *Harefuah*;152(8):461-3, 499.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. 1953. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963–8.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch (Editors). 2009. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th ed. Wiley-Blackwell, Oxford 2009. 310 pp.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch (Editors). 2009. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th ed. Český překlad Novák J et al. Zpracoval ÚZIS ČR, Praha 2011.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S et al. 2007. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*; 448: 561-6.
- Soligo D, Shiro R, Luksch R, Mannara G. et al. 1990. Expression of integrins in human bone marrow. *Br J Haematol* 76: 323–332.
- Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(5):283–96.
- Soumarová R, Perková H, Blažek T, Homola L S et al. 2012. Možnosti radioterapie karcinomu prostaty. (Options of radiotherapy for prostate cancer). *Urol. praxi*, 2012; 13(5): 192-198.
- Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Stenger N et al. Expression of microRNA-221 is progressively reduced in aggressive prostate cancer and metastasis and predicts clinical recurrence. *Int J Cancer*. 2010 Jul 15;127(2):394-403.
- Stamey TA, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. 1988. Morphometric and clinical studies on 68 consecutive radical prostatectomies. *J Urol* 1988; 139: 1235-41
- Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE et al. 1987. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 317:909-916.
- Stenman UH. 1997. Prostate-specific antigen, clinical use and staging: overview. *British Journal of Urology*. 79, (Suppl 1) 53-60.
- Stephan C1, Jung K, Semjonow A, Schulze-Forster K, Cammann H, Hu X, Meyer HA, Bögemann M, Miller K, Friedersdorff F. 2013. Comparative assessment of urinary prostate cancer antigen 3 and TMPRSS2:ERG gene fusion with the serum [-2]prostate-specific antigen-based prostate health index for detection of prostate cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):280-8.
- Sun C, Dobi A, Mohamed A, Li H et al. 2008. TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene* 27(40):5348–53.
- Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI et al. 2001. AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am. J. Pathol.* 159:431–437
- Sun QP, Li LY, Chen Z et al. 2010. Detection of TMPRSS2-ETS fusions by a multiprobe fluorescence in situ hybridization assay for the early diagnosis of prostate cancer: a pilot study. *J Mol Diagn*;12(5):718–724.
- Sun T, Yang M, Chen S, Balk S et al. 2012. The altered expression of MiR-221/-222 and MiR-23b/-27b is associated with the development of human castration resistant prostate cancer. *Prostate*;72(10):1093-103.
- Svensson MA, LaFargue CJ, MacDonald TY, Pflueger D et al. 2011. Testing mutual exclusivity of ETS rearranged prostate cancer. *Lab Invest*. Mar;91(3):404-12.
- Štern P, Vranovský K, Šafarčík K. 2008. Karcinom prostaty – molekulární podstata, diagnostika a ekonomika prevence. *Klin Biochem Metab*, 16 (37), No. 1, 19–26.
- Tacklind J, Macdonald R, Rutks I, Stanke JU, Wilt TJ. 2012. *Serenoa repens* for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev*;12:CD001423.
- Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A et al. 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18(1):11–22.
- Thiery JP, Acloque H, Huang YJR, Nieto MA. 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139 (5): 871–890.
- Tian L, Fang YX, Xue JL, Chen JZ. 2013. Four MicroRNAs Promote Prostate Cell Proliferation with Regulation of PTEN and Its Downstream Signals In Vitro. *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9):e75885.

- Tkachuk V, Stepanova V, Little PJ, Bobik A. 1996. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*;23(9):759-65.
- Todd R, Wong DT. 1999. Oncogenes. *Anticancer Res*. 19 (6A): 4729-46.
- Tokar EJ, Ancrile BB, Cunha GR, Webber MM. 2005. Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer. *Differentiation* 73(9-10):463-73.
- Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G et al. 2009. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol* 56(2):275-86.
- Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, et al. 2007b. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 448: 595-599.
- Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X et al. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10: 177-188.
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L et al. 2007a. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *NatGenet* 39: 41-51.
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR et al. 2006. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 66: 3396-3400.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM et al. 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310: 644-648.
- Tsang DP, Cheng AS. 2011. Epigenetic regulation of signaling pathways in cancer: role of the histone methyltransferase EZH2. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(1):19-27.
- Tsao CK, Small AC, Galsky MD, Oh WK. 2012. Overcoming castration resistance in prostate cancer. *Curr Opin Urol* 22(3):167-74.
- Vacek Z. 1996. Histologie a histologická technika. Díl 2, Histologická technika. 1. vydání. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. 184 pp. ISBN 80-7013-202-7.
- Valík D, Zima T, Topolčan O, et al. 2008. Doporučení České společnosti klinické biochemie (ČSKB ČLS JEP), České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP) a České společnosti nukleární medicíny (ČSNM ČLS JEP) k využití nádorových markerů v klinické praxi [online]. ©2008. Poslední revize 2008-09-09, [cit. 2. 12. 2013]. <<http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--tumorove-markery>>.
- Valkenburg KC, Williams BO. 2011. Mouse models of prostate cancer. *Prostate Cancer* 2011:895238.
- van Leenders G, van Balken B, Aalders T, Hulsbergen-van de Kaa C et al. 2002. Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion. *Prostate* 51(2):98-107.
- Verger A, Duterque-Coquillaud M. 2002. When Ets transcription factors meet their partners. *Bioessays* 24(4): 362-70.
- Verhagen AP, Ramaekers FC, Aalders TW, Schaafsma HE et al. 1992. Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. *Cancer Res* 52(22):6182-7.
- Veselský Z, Višňovský P. 2005. Farmakologické a patofyziologické aspekty použití inhibitorů alfa-1 adrenergických receptorů a dlouhodobé subinhibiční léčby močovými antiseptiky u nemocných po odstranění subvesikální obstrukce. *Interní medicína pro praxi* 2005, 7/1, 29-31. ISSN 1212-7299.
- Veselský Z. 2004. Etiologie benigní hyperplazie prostaty. *Čs Ger Rev*. 2004; 2; 36-39. ISSN 1214-0732.
- Vickers AJ, Till C, Tangen CM, Thompson LM. 2011. An Empirical Evaluation of Guidelines on Prostate-specific Antigen Velocity in Prostate Cancer Detection. *J Natl Cancer Inst*; 103(6): 462-469.
- Vlaeminck-Guillem V, Ruffion A, Andre J. 2008. [Value of urinary PCA3 test for prostate cancer diagnosis]. [Article in French] *Prog. Urol.* 18 (5): 259-65.
- Vyzula R. et al. 2011. Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění. 13. vydání. Masarykův onkologický ústav. Brno 2011.
- Walsh PC, Lepor H, Eggleston JC. 1983. Radical prostatectomy with preservation of sexual function: anatomical and pathological considerations. *Prostate*;4(5):473-85.
- Walter J. 1977. Radiation hazards and protection: Cytotoxic chemotherapy. In: *Walter J (ed.), Cancer and Radiotherapy: A short guide for nurses and medical students*. London: Churchill Livingstone.
- Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T. 2012. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 360(1-2):38-43.
- Wang J, Cai Y, Yu W, Ren C et al. 2008. Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2/ERG fusion gene transcripts. *Cancer Res* 68(20):8516-24.
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP. 1979. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol. Sep* 1979;17(2):159-63.
- Whitman EJ, Groskopf J, Ali A et al. 2008. PCA3 Score Before Radical Prostatectomy Predicts Extracapsular Extension and Tumor Volume. *J. Urol.* 180 (5): 1975.

- Wikipedia 1. Wikipedia contributors. Carcinogenesis [online]. Last revision: 2013-08-05. Dostupné na: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Carcinogenesis&oldid=567223697>. *Wikipedia, The Free Encyclopedia*. [citováno 2013-09-18].
- Wikiskripta 1. (CC BY 3.0 CZ) Biologie onkogeneze [online]. Dostupné na: <http://www.wikiskripta.eu/article-1175>. WikiSkripta, projekt sítě lékařských fakult MEFANET. ISSN 1804-6517 [citováno 2013-09-18].
- Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ et al. 2012. Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial (PIVOT) Study Group. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *NEnglJMed*; 367: 203–213.
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J et al. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007 Nov 16;318(5853):1108-13.
- Wu M, Pastora-Pareja JC, Xu T. 2010. Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature* [online]. 2010, vol. 463, no. 7280, s. 545-8.
- Wu Z, He B, He J, Mao X. 2013. Upregulation of miR-153 promotes cell proliferation via downregulation of the PTEN tumor suppressor gene in human prostate cancer. *Prostate*;73(6):596-604.
- Xie B, Xing R, Chen P, Gou Y et al. 2010. Down-regulation of c-Met expression inhibits human HCC cells growth and invasion by RNA interference. *J Surg Res*;162(2):231-8.
- Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E et al. 2011. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol*. 2011 Jun;32(3):583-8.
- Young HH. 1940. *Hugh Young: A Surgeons Autobiography*. Harcourt, Brace and Company, New York, 1940, pp. 76.
- Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ et al. 2010. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 17(5):443–54.
- Yu SL, Chen HY, Chang GC, Chen CY et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):48-57.
- Yuan JM. 2013. Cancer prevention by green tea: evidence from epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*; 98(6):1676S-81S.
- Zemřelí 2011. ÚZIS ČR, 2012. Publikace. Zdravotnická statistika. Česká republika ISBN: 978-80-7472-003-1.
- Zetter BR. 1990. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N Engl J Med* 322: 605–612.
- Zvolský M. 2013. ÚZIS ČR. Incidence zhoubných novotvarů v ČR v roce 2010, 18. 3. 2013. Aktuální informace č. 5/2013.

9. Přílohy

9.1 TNM-09 klinická klasifikace karcinomu prostaty

9.2 Získaná data a naměřené hodnoty

9.1 TNM-09 klinická klasifikace karcinomu prostaty

TNM KLINICKÁ KLASIFIKACE

T - Primární nádor

TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
T1	klinicky nezjistitelný nádor, ani palpačně, ani zobrazovacími vyšetřovacími metodami
T1a	nádor zjištěn náhodně histologicky v 5% nebo méně resekované tkáni
T1b	nádor zjištěn náhodně histologicky ve více než 5 % resekované tkáni
T1c	nádor zjištěn při punkční biopsii (např. při zvýšené sérové hladině prostatického specifického antigenu /PSA/)
T2	nádor omezen na prostatu ¹⁾
T2a	nádor postihuje polovinu jednoho laloku nebo méně
T2b	nádor postihuje více než jednu polovinu jednoho laloku, ne však oba laloky
T2c	nádor postihuje oba laloky

T3	nádor se šíří přes pouzdro prostaty ²⁾
T3a	extrakapsulární šíření (jednostranné nebo oboustranné) včetně mikroskopického poškození hrdla močového měchýře
T3b	nádor infiltruje semenný váček (váčky)
T4	nádor je fixován nebo postihuje okolní struktury jiné než semenné váčky: zevní sfinkter, rektum, mm. levatores a/nebo stěnu pánve

Poznámka:

- ¹⁾ Nádor nalezený v jednom či obou lalocích punkční biopsií, avšak nezjistitelný palpačně, ani spolehlivě patrný zobrazovacími vyšetřovacími metodami, je klasifikován jako T1c.
- ²⁾ Invaze do apexu prostaty nebo do pouzdra prostaty (ne však přes pouzdro) se neklasifikuje jako T3, nýbrž jako T2.

N - Regionální mízní uzliny

NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	metastázy v regionálních mízních uzlinách

M - Vzdálené metastázy¹⁾

MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit (viz Úvod strana 21)
M0	bez vzdálených metastáz
M1	vzdálené metastázy
M1a	jiná než regionální mízní uzlina (uzliny)
M1b	kost(i)
M1c	jiná (jiné) lokalizace

Poznámka:

- ¹⁾ Je-li přítomna více než jedna metastatická lokalizace, používá se kategorie nejpokročilejší (pM1c).

G - HISTOPATOLOGICKÝ GRADING

GX	stupeň diferenciaci nelze hodnotit
G1	dobře diferencovaný (lehká anaplazie) (Gleason 2–4)
G2	středně diferencovaný (střední anaplazie) (Gleason 5–6)
G3–4	nizce diferencovaný/nediferencovaný (výrazná anaplazie) (Gleason 7–10)

ROZDĚLENÍ DO STADIÍ

Stadium I	T1, T2a	N0	M0
Stadium II	T2b, T2c	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
Stadium IV	T4	N0	M0
	jakékoliv T	N1	M0
	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

Zdroj: TNM klasifikace, český překlad ÚZIS ČR, 2011.

9.2 Tabulka zjištěných klinických dat a stanovených hodnot

Pacient	Datum narození	Datum operace	Věk v době operace	0-55,00	55,01-65,00	65,01-75,00	Gleason skóre	a+b	a+b-2	a+b-3	a+b-4	a+b-5	a+b-6	a+b-7	a+b-8	a+b-9	a+b-10	a	a=1	a=2	a=3	a=4	a=5	b	b=1	b=2	b=3	b=4	b=5	Předoperační PSA (ng/ml)	Tumor (pT)	TNM09	Stadium I	Stadium II						
74	26.9.1941	14.2.2012	70.43	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
74																																								
75	1.8.1944	16.2.2012	67.59	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
75																																								
76	28.4.1953	13.2.2012	58.84	0	1	0	8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
76																																								
77	17.8.1942	20.2.2012	69.56	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
77																																								
78	9.5.1946	27.2.2012	65.85	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
78																																								
79	7.3.1955	22.2.2012	57.00	0	1	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
79																																								
80	23.2.1946	29.2.2012	66.06	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
80																																								
81	24.3.1962	1.3.2012	49.97	1	0	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
81																																								
82	8.5.1949	6.3.2012	62.87	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
82																																								
83	16.4.1953	10.4.2012	59.02	0	1	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0			
83																																								
84	1.10.1946	11.4.2012	65.57	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
84																																								
85	4.9.1941	17.4.2012	70.67	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
85																																								
86	1.7.1947	26.4.2012	64.87	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
86																																								
87	26.4.1940	26.4.2012	72.05	0	0	1	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0			
87																																								
88	27.5.1945	24.4.2012	66.96	0	0	1	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
88																																								
89	25.2.1952	16.4.2012	60.18	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
89																																								
90	6.10.1956	25.4.2012	55.59	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
90																																								
91	4.4.1944	24.4.2012	68.10	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
91																																								
92	1.3.1949	27.3.2012	63.12	0	1	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0			
92																																								
93	5.1.1952	13.3.2012	60.23	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
93																																								
94	1.3.1949	27.3.2012	63.12	0	1	0	9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0			
94																																								
95	4.4.1944	24.4.2012	68.10	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
95																																								
96	6.10.1956	25.4.2012	55.59	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
96																																								
97	25.2.1952	16.4.2012	60.18	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
97																																								
98	27.5.1945	24.4.2012	66.96	0	0	1	6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
98																																								
99	24.12.1946	14.3.2012	65.27	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
99																																								
100	20.9.1945	3.4.2012	66.58	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
100																																								
101	30.9.1952	2.4.2012	59.55	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
101																																								
102	5.4.1953	26.3.2012	59.01	0	1	0	7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	3	0	0	0	1												

ID	Stadium III	Stadium IV	miRNA												mRNA								
			Nenormalizované hodnoty						Normalizované hodnoty						PSA	DD3	DD3/PSA	TMPRSS2-ERG					
			PTZc	pT3a	pT3b	pT3c	pT4	Datum úmrtí	Poslední kontrola zdraví	První kontrola recidiva	Číslo vzorku	Typ tkáně Tumor/DT /kontrola (Z)	UGRNA Ct	miR-26a Ct					miR-221 Ct	miR-23b Ct	miR-26a/UGRNA	miR-221/UGRNA	miR-23b/UGRNA
1	0	0	0	0	není	12.9.2011	5.10.2011	1Z	Z	27.670	23.670	24.485	24.500	16.000	9.095	9.000	30.935	41.260	0.000780				
								1T	T	27.730	24.355	25.865	25.800	10.375	3.643	3.811	29.080	33.535	0.045594	0			
0	0	0	0	0	není	31.8.2012	není	2Z	Z	27.145	23.920	24.460	23.895	9.350	6.431	9.514	25.485	37.445	0.000251				
								2T	T	26.010	23.775	25.050	24.405	4.708	1.945	3.042	22.850	30.395	0.005355	0			
0	0	1	0	0	není	3.10.2012	není	3Z	Z	27.740	22.705	24.875	24.250	32.786	7.285	11.236	32.070	38.205	0.014229				
								3T	T	28.785	24.645	26.035	25.175	17.630	6.727	12.210	35.405	není Ct	0.000000	0			
1	0	0	0	0	není	27.4.2011	8.6.2011	4Z	Z	26.645	22.170	22.865	23.225	22.239	13.737	10.703	29.965	38.750	0.002267				
								4T	T	28.915	24.385	27.065	25.370	23.103	3.605	11.672	33.170	40.990	0.004425	0			
1	0	0	0	0	není	25.10.2012	není	5Z	Z	26.035	23.005	24.595	23.995	8.168	2.713	4.112	24.180	34.570	0.000745				
								5T	T	25.565	23.200	24.565	23.655	5.152	2.000	3.758	23.740	29.850	0.014478	0			
1	0	0	0	0	není	25.10.2012	není	6Z	Z	26.215	23.760	23.885	24.310	5.483	5.028	3.745	23.375	35.125	0.000290				
								6T	T	25.815	22.675	24.585	23.250	8.815	2.346	5.918	22.385	30.515	0.003570	1			
1	0	0	0	0	není	16.11.2012	není	7Z	Z	25.795	22.080	24.090	22.795	13.132	3.260	8.000	24.800	32.775	0.003975				
								7T	T	26.105	23.415	24.285	23.965	6.453	3.531	4.408	25.255	32.285	0.007652	0			
0	1	0	0	0	není	15.9.2012	není	8Z	Z	25.285	23.035	23.125	23.215	4.757	4.469	4.199	24.940	33.005	0.003734				
								8T	T	25.735	23.710	24.955	24.070	4.070	1.717	3.171	22.490	27.065	0.041955	0			
1	0	0	0	0	není	8.11.2012	není	9Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	28.820	37.740	0.002064				
								9T	T	25.185	21.135	23.700	22.640	16.564	2.799	5.836	26.930	37.335	0.000738	0			
1	0	0	0	0	není	7.1.2013	není	10Z	Z	26.610	22.680	23.440	22.870	15.242	9.000	13.361	32.615	40.900	0.003206				
								10T	T	26.285	21.555	26.175	24.385	26.538	1.079	3.732	34.875	36.425	0.341510	0			
1	0	0	0	0	není	15.6.2013	není	11Z	Z	25.855	22.715	24.030	23.090	8.815	3.543	6.797	22.790	30.850	0.003747				
								11T	T	37.095	31.130	36.170	35.585	62.466	1.899	2.848	22.345	29.395	0.007546	0			
0	0	0	0	0	není	15.9.2012	není	12Z	Z	26.520	21.380	23.720	22.475	35.261	6.964	16.507	28.080	38.390	0.000788				
								12T	T	27.765	24.020	25.715	24.725	13.408	4.141	8.225	29.720	36.215	0.011087	0			
1	0	0	0	0	není	11.7.2013	není	13Z	Z	29.095	23.785	25.815	26.375	39.671	9.714	6.589	33.360	36.425	0.119493				
								13T	T	27.400	23.315	24.365	24.325	16.971	8.196	8.427	30.735	34.455	0.075887	0			
1	0	0	0	0	není	27.7.2012	není	14Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	34.155	40.440	0.012824				
								14T	T	27.550	22.570	24.530	24.543	31.559	8.112	8.042	31.480	37.650	0.013888	0			
1	0	0	0	0	není	12.2.2013	není	15Z	Z	30.395	26.105	27.230	26.738	19.562	8.969	12.619	34.025	není Ct	0.000000				
								15T	T	27.510	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	36.895	není Ct	0.000000	0			
0	1	0	0	0	není	15.5.2013	není	16Z	Z	26.105	22.655	23.775	22.978	10.928	5.028	8.739	23.530	36.310	0.000142				
								16T	T	29.650	25.165	28.555	26.328	22.393	2.136	10.004	26.465	35.255	0.002259	0			
0	0	0	0	0	není	15.4.2013	není	17Z	Z	26.230	23.615	23.670	23.253	6.126	5.897	7.876	20.960	37.340	0.000012				
								17T	T	26.255	22.735	23.830	22.688	11.472	5.370	11.856	21.160	29.830	0.002455	0			
0	0	0	0	0	není	10.12.2012	není	18Z	Z	26.680	22.560	23.860	22.968	17.388	7.062	13.109	28.615	37.655	0.001900				
								18T	T	27.670	24.020	25.755	24.778	12.553	3.771	7.426	31.070	38.160	0.007340	0			
0	1	0	0	0	není	15.7.2013	není	19Z	Z	26.960	23.130	24.120	23.243	14.221	7.160	13.155	24.090	33.450	0.001522				
								19T	T	28.865	25.340	26.180	27.548	11.511	6.431	2.492	27.270	není Ct	0.000000	0			
0	0	0	0	0	není	16.10.2012	není	20Z	Z	27.315	21.745	22.625	22.538	47.505	25.813	27.427	26.850	35.450	0.002577				
								20T	T	26.575	24.260	26.735	26.183	4.976	0.895	1.313	24.795	27.880	0.117848	0			
1	0	0	0	0	není	15.6.2013	není	21Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	30.100	40.830	0.000589				
								21T	T	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	32.255	32.920	0.630689	1			
0	0	0	0	0	není	16.1.2013	není	22Z	Z	26.315	24.135	25.665	23.738	4.532	1.569	5.969	22.730	32.980	0.000821				
								22T	T	26.490	24.380	32.845	25.588	4.317	0.012	1.869	25.630	32.265	0.010662	0			
1	0	0	0	0	není	15.1.2013	není	23Z	Z	25.555	22.120	26.330	23.358	10.815	0.584	4.587	22.365	33.155	0.000565				
								23T	T	není Ct	24.770	27.970	25.468	není Ct	není Ct	není Ct	24.565	32.460	0.004201	0			
1	0	0	0	0	není	15.8.2012	není	24Z	Z	26.025	22.375	24.720	22.843	12.553	2.471	9.079	22.275	35.610	0.000097				
								24T	T	25.715	22.590	25.280	23.778	8.724	1.352	3.830	22.890	27.955	0.029873	0			
0	0	0	0	0	není	24.3.2011	15.5.2011	25Z	Z	26.845	22.320	24.603	23.713	10.267	2.110	3.911	26.505	37.955	0.000357				
								25T	T	26.845	22.840	25.868	23.943	16.056	1.969	7.477	28.790	34.890	0.014579	0			
1	0	0	0	0	není	25.10.2012	není	26Z	Z	26.220	22.345	23.248	22.888	14.672	7.849	10.074	22.400	29.700	0.006346				
								26T	T	26.430	23.045	23.448	24.218	10.447	7.904	4.635	23.860	27.740	0.067921	0			
0	0	0	0	0	není	5.2.2013	není	27Z	Z	26.475	22.420	24.353	23.533	16.622	4.354	7.687	25.050	36.355	0.000395				
								27T	T	27.165	22.965	24.703	23.638	18.379	5.512	11.531	29.120	31.955	0.140146	1			
1	0	0	0	0	není	15.2.2013	není	28Z	Z	25.890	21.475	22.433	21.513	21.333	10.985	20.785	25.410	30.760	0.024518				
								28T	T	26.755	23.170	24.553	25.058	12.000	4.603	3.243	24.840	27.845	0.124568	0			
0	0	0	0	0	není	19.12.2012	není	29Z	Z	26.400	22.225	24.953	23.393	18.063	2.727	8.042	21.980	28.750	0.009163				
								29T	T	26.405	21.685	24.063	22.748	26.355	5.072	12.619	22.425	26.935	0.043889	0			
1	0	0	0	0	není	15.10.2012	není	30Z	Z	27.245	24.690	25.943	25.103	5.877	2.467	4.415	24.275	32.495	0.003354				
								30T	T	27.215	23.040	24.863	24.758	18.063	5.107	5.493	22.045	29.515	0.005640	0			
1	0	0	0	0	není	23.7.2013	není	31Z	Z	27.315	22.055	23.638	22.788	38.319	12.795	23.063	26.190	31.355	0.027873				
								31T	T	26.035	23.285	24.263	24.268	6.727	3.416	3.405	22.205	27.270	0.029873	0			
1	0	0	0	0	není	29.5.2012	není	32Z	Z	25.580	23.255	23.443	23.358	5.011	4.400	4.667	24.845	32.400	0.005318				
								32T	T	27.755	24.715	25.528	25.903	8.225	4.683	3.611	28.050	33.380	0.024861	0			
1	0	0	0	0	není	15.12.2012	není	33Z	Z	25.380	23.295	23.918	23.438	4.243	2.756	3.844	21.610	32.190	0.000653				
								33T	T	24.580	22.935	24.143	23.958	3.127	1.354	1.540	21.455	27.175	0.018972	1			
1	0	0	0	0	není	5.6.2012	není	34Z	Z	25.235	22.855	23.778	23.408	5.205	2.746	3.549	23.295	30.955	0.0049				

Stadium III	Stadium IV	miRNA											mRNA									
		Normalizované hodnoty											Normalizované hodnoty									
		PTZc	pT3a	pT3b	pT3c	pT4	Datum úmrtí	Poslední kontrola zdraví	První kontrola recidiva	Číslo vzorku	Typ tkáně Tumor/DT /kontrola (Z)	UGRNA Ct	miR-26a Ct	miR-221 Ct	miR-23b Ct	miR-26a/UGRNA	miR-221/UGRNA	miR-23b/UGRNA	PSA	DD3	DD3/PSA	TMPRSS2:ERG
1	0	0	0	0	není	26.2.2013	není	37T	T	27.005	23.575	24.693	24.323	10.778	4.967	6.420	29.370	31.005	0.321970	0		
								38Z	Z	27.160	22.955	24.433	24.333	18.443	6.623	7.098	23.685	33.120	0.001445			
								38T	T	25.980	23.165	24.593	24.263	7.037	2.616	3.289	23.870	29.800	0.016402	0		
0	0	1	0	0	není	28.2.2012	16.5.2013	39Z	Z	29.280	24.430	26.948	26.003	28.840	5.037	9.697	32.720	36.430	0.076415			
								39T	T	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	34.175	34.355	0.882703	0		
1	0	0	0	0	není	15.11.2012	není	40Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	32.040	38.855	0.008881			
								40T	T	není Ct	není Ct	není Ct	27.238	není Ct	není Ct	není Ct	29.905	35.605	0.019237	0		
0	0	1	0	0	není	2.1.2013	není	41Z	Z	25.950	22.905	23.353	23.508	8.253	6.052	5.436	22.030	35.855	0.000069			
								41T	T	25.310	21.960	23.713	22.878	10.196	3.026	5.398	23.300	27.520	0.053660	0		
1	0	0	0	0	není	7.12.2012	není	42Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	23.710	30.795	0.007366			
								42T	T	25.840	23.835	25.988	není Ct	4.014	0.903	není Ct	21.075	25.780	0.038340	0		
1	0	0	0	0	není	19.10.2012	není	43Z	Z	26.875	22.725	23.748	23.983	17.753	8.739	7.426	23.915	31.175	0.006524			
								43T	T	26.575	22.640	23.523	23.968	15.295	8.296	6.094	22.760	28.120	0.024349	0		
1	0	0	0	0	není	15.11.2012	není	44Z	Z	26.760	22.680	25.348	24.618	16.912	2.662	4.415	21.625	25.975	0.049037			
								44T	T	25.825	22.810	24.913	24.108	8.084	1.882	3.289	22.115	26.800	0.038875	0		
1	0	0	0	0	není	9.11.2012	není	45Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	36.730	41.285	0.042541			
								45T	T	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	34.280	není Ct	0.000000	0		
1	0	0	0	0	není	7.5.2012	není	46Z	Z	25.265	27.185	není Ct	26.248	0.264	není Ct	0.506	29.945	36.135	0.013697			
								46T	T	není Ct	není Ct	25.933	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	25.925	31.540	0.020404	0		
1	0	0	0	0	není	18.7.2012	není	47Z	Z	26.715	22.380	22.848	24.153	20.182	14.596	5.907	30.525	37.065	0.010746			
								47T	T	27.430	23.055	24.923	24.388	20.749	5.686	8.239	32.815	34.695	0.271684	0		
1	0	0	0	0	není	30.1.2013	není	48Z	Z	25.645	22.620	23.403	23.373	8.140	4.732	4.832	22.530	30.425	0.004201			
								48T	T	25.905	21.680	23.373	23.778	18.700	5.786	4.370	24.435	31.140	0.009585	0		
1	0	0	0	0	není	15.2.2012	není	49Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	36.600	41.580	0.031686			
								49T	T	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	31.675	není Ct	0.000000	0		
1	0	0	0	0	není	14.1.2013	není	50Z	Z	27.230	23.290	24.548	24.128	15.348	6.420	8.589	23.770	33.100	0.001554			
								50T	T	26.575	23.090	24.178	23.883	11.197	5.269	6.464	23.820	31.770	0.004044	0		
0	1	0	0	0	není	mezi 16/11/11 a 20/3/12	20.3.2012	51Z	Z	27.320	24.295	25.158	25.373	8.140	4.477	3.857	32.000	33.075	0.474671			
								51T	T	26.720	21.790	23.438	23.508	30.484	9.730	9.270	31.885	35.960	0.059334	1		
0	0	1	0	0	není	7.2.2013	není	52Z	Z	25.005	22.565	23.408	23.558	5.426	3.026	2.727	23.940	37.215	0.000101			
								52T	T	26.230	23.490	25.243	24.128	6.681	1.983	4.295	25.740	32.865	0.007164	0		
1	0	0	0	0	není	není	není	53Z	Z	25.885	22.115	23.098	22.083	13.642	6.904	13.953	25.210	30.985	0.018262			
								53T	T	25.740	22.455	23.573	23.178	9.747	4.492	5.907	23.780	28.925	0.028262	0		
1	0	0	0	0	není	20.2.2013	není	54Z	Z	26.665	22.370	22.973	22.568	19.630	12.929	17.119	26.115	39.455	0.000096			
								54T	T	26.570	21.630	21.258	22.423	30.696	39.739	17.722	25.065	29.000	0.065380	0		
0	0	1	0	0	není	12.7.2012	není	55Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	37.570	není Ct	0.000000			
								55T	T	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	37.480	není Ct	0.000000	1		
1	0	0	0	0	není	15.3.2012	není	56Z	Z	26.780	27.085	25.483	26.998	0.809	2.458	0.860	28.535	34.410	0.017039			
								56T	T	26.905	26.080	26.408	26.838	1.772	1.412	1.048	30.075	35.660	0.020833	0		
1	0	0	0	0	není	12.1.2012	15.7.2012	57Z	Z	26.110	25.900	24.948	25.863	1.157	2.238	1.187	24.805	32.585	0.004550			
								57T	T	26.250	26.840	23.373	27.928	0.664	7.349	0.313	24.610	28.775	0.055746	1		
1	0	0	0	0	není	15.12.2012	není	58Z	Z	27.350	25.990	24.983	27.593	2.567	5.160	0.845	33.830	39.385	0.021271			
								58T	T	27.145	26.380	24.233	26.928	1.699	7.529	1.163	28.205	31.855	0.079660	0		
0	1	0	0	0	není	30.11.2012	není	59Z	Z	26.450	25.170	22.238	27.098	2.428	18.539	0.638	22.920	28.250	0.024861			
								59T	T	není Ct	27.105	23.228	28.183	není Ct	není Ct	není Ct	24.450	33.385	0.002043	1		
0	1	0	0	0	není	1.7.2013	není	60Z	Z	27.450	26.735	23.153	27.643	1.641	19.664	0.875	25.555	31.675	0.014378			
								60T	T	27.595	26.265	22.613	27.198	2.514	31.614	1.317	23.260	26.935	0.078292	0		
1	0	0	0	0	není	7.1.2013	není	61Z	Z	26.975	26.235	23.813	27.958	1.670	8.954	0.506	24.945	31.720	0.009131			
								61T	T	29.430	28.050	23.288	29.838	2.603	70.644	0.754	33.790	36.855	0.119493	0		
1	0	0	0	0	není	21.1.2013	není	62Z	Z	26.035	27.470	25.333	27.088	0.370	1.627	0.482	23.975	34.580	0.000642			
								62T	T	25.555	24.325	23.188	25.828	2.346	5.160	0.828	25.980	29.670	0.077482	0		
0	0	0	0	0	není	7.12.2012	není	63Z	Z	25.805	24.605	23.403	26.378	2.297	5.287	0.672	20.890	31.760	0.000534			
								63T	T	26.200	25.700	25.033	28.113	1.414	2.246	0.266	22.745	26.655	0.066523	0		
0	0	0	0	0	není	15.4.2012	není	64Z	Z	26.875	25.215	23.018	26.633	3.160	14.495	1.183	23.575	34.895	0.000391			
								64T	T	25.075	23.550	23.203	26.408	2.878	3.662	0.397	20.375	26.760	0.011965	0		
0	0	1	0	0	není	28.11.2012	není	65Z	Z	26.805	26.620	22.993	29.418	1.137	14.050	0.164	25.265	32.270	0.007785			
								65T	T	26.655	28.995	21.258	29.563	0.198	42.151	0.133	26.455	31.950	0.022174	0		
0	0	0	0	0	není	5.12.2012	není	66Z	Z	26.220	25.560	25.573	27.383	1.580	1.566	0.447	21.780	35.210	0.000091			
								66T	T	25.695	26.850	25.803	29.418	0.449	0.928	0.076	21.355	27.465	0.014478	0		
0	0	0	0	0	není	mezi 30/11/11 a 1/7/12	17.7.2012	67Z	Z	27.275	27.010	27.468	27.643	1.202	0.875	0.775	29.075	34.280	0.027111			
								67T	T	26.710	25.740	27.378	27.513	1.959	0.630	0.573	24.445	30.620	0.013840	0		
1	0	0	0	0	není	15.2.2013	8.3.2012	68Z	Z	26.320	26.785	27.188	26.953	0.724	0.548	0.645	22.720	31.940	0.001677			
								68T	T	26.015	24.580	25.293	25.438	2.704	1.650	1.492	24.770	29.290	0.043586	1		
0	0	0	0	0	není	11.12.2012	není	69Z	Z	26.255	26.890	26.523	27.348	0.644	0.831	0.469	24.615	32.805	0.003424			
								69T	T	26.070	26.470	26.518	27.313	0.758	0.733	0.423	24.270	33.105	0.002190	0		
0	1	0	0	0	není	8.12.2011	20.1.2012	70Z	Z	26.805	26.580	26.263	26.843	1.169	1.456	0.974	24.420	31.950	0.005411			
								70T	T	26.995	26.590	26.793	26.818	1.324	1.151	1.131	23.590	29.240	0.019915	0		
1	0	0	0	0	není	15.1.2013	není	71Z	Z	27.025	25.445	25.413	26.078	2.990	3.058	1.929	28.195	35.045	0.008669	</		

ID	Přítomnost	Stadium III	Stadium IV	Datum úmrtí	Poslední kontrola zdraví	První kontrola recidiva	Číslo vzorku	Typ tkáně Tumor/DT /kontrola (Z)	miRNA								mRNA			
									UGRNA Ct	miR-26a Ct	miR-221 Ct	miR-23b Ct	Normalizované hodnoty			PSA	DD3	DD3/PSA	TMPRSS2:ERG	
													Normalizované hodnoty							
													miR-26a/UGRNA	miR-221/UGRNA	miR-23b/UGRNA					
0	1	0	0	není	25.10.2012	není	74Z	Z	29.390	27.090	25.943	26.953	4.925	10.909	5.417	34.840	není Ct	0.000000		
							74T	T	32.850	28.020	29.303	28.203	28.443	11.692	25.063	38.370	není Ct	0.000000	0	
1	0	0	0	není	15.12.2012	není	75Z	Z	26.050	25.860	25.488	25.558	1.141	1.477	1.407	30.020	38.150	0.003570	0	
							75T	T	25.765	24.310	23.913	25.148	2.742	3.611	1.534	23.180	27.460	0.051474	0	
0	0	1	0	není	13.9.2012	není	76Z	Z	27.025	22.100	23.305	22.713	30.379	13.177	19.870	27.525	36.660	0.001779	0	
							76T	T	26.510	22.930	24.195	23.033	11.959	4.976	11.139	26.295	29.790	0.088695	0	
0	1	0	0	není	7.9.2012	není	77Z	Z	25.870	24.945	25.345	25.178	1.899	1.439	1.616	29.015	35.700	0.009719	0	
							77T	T	25.005	25.575	27.825	25.233	0.674	0.142	0.854	24.655	31.095	0.011518	0	
0	1	0	0	není	11.4.2012	21.11.2012	78Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	26.590	34.545	0.004030		
							78T	T	26.505	25.030	25.200	24.878	2.780	2.471	3.090	25.520	27.295	0.292194	0	
1	0	0	0	není	25.1.2013	není	79Z	Z	25.425	24.405	25.225	26.868	2.028	1.149	0.368	22.060	30.240	0.003448		
							79T	T	26.815	28.055	28.145	28.248	0.423	0.398	0.370	22.550	26.430	0.067921	0	
1	0	0	0	není	15.12.2012	není	80Z	Z	27.850	22.480	23.380	24.318	41.355	22.162	11.571	35.360	39.470	0.057912		
							80T	T	26.800	21.995	27.605	28.868	27.954	0.572	0.239	37.900	40.050	0.225313	0	
0	0	1	0	není	1.3.2012	13.4.2012	81Z	Z	27.465	27.315	22.655	23.643	1.110	28.051	14.148	35.675	není Ct	0.000000		
							81T	T	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	35.270	39.300	0.061214	0	
1	0	0	0	není	13.9.2012	není	82Z	Z	25.655	21.060	23.250	22.683	24.168	5.296	7.849	27.235	32.000	0.036778		
							82T	T	32.790	26.490	27.245	27.303	78.793	46.689	44.864	26.500	29.900	0.094732	0	
0	0	1	0	není	13.7.2012	není	83Z	Z	26.155	24.175	26.380	25.008	3.945	0.856	2.215	23.180	36.440	0.001012		
							83T	T	25.410	23.295	26.550	24.958	4.332	0.454	1.368	23.310	39.310	0.000015	0	
1	0	0	0	není	2.7.2012	není	84Z	Z	25.305	22.405	25.495	24.093	7.464	0.877	2.317	23.155	30.470	0.006280		
							84T	T	25.175	22.405	25.360	24.903	6.821	0.880	1.208	23.255	28.210	0.037034	1	
0	1	0	0	není	25.11.2012	není	85Z	Z	24.840	21.155	24.020	23.858	12.862	1.765	1.976	24.385	30.705	0.012517		
							85T	T	25.615	22.100	24.120	24.093	11.432	2.819	2.873	23.190	28.970	0.018199	0	
1	0	0	0	není	není	není	86Z	Z	25.960	20.075	21.665	22.218	59.096	19.630	13.385	31.540	42.190	0.000622		
							86T	T	26.965	21.100	22.280	23.243	58.283	25.723	13.200	38.145	38.270	0.917004	0	
0	0	0	0	není	12.2.2013	není	87Z	Z	26.190	21.920	24.495	23.978	19.293	3.238	4.635	24.525	32.880	0.003054		
							87T	T	25.735	23.350	25.845	25.018	5.223	0.927	1.644	23.505	28.755	0.026278	0	
1	0	0	0	není	15.1.2013	není	88Z	Z	25.500	21.920	23.825	24.707	11.959	3.193	1.733	24.305	35.170	0.000536		
							88T	T	25.275	21.650	25.805	24.097	12.338	0.693	2.263	23.195	29.310	0.014428	0	
1	0	0	0	není	2.7.2012	není	89Z	Z	25.245	20.870	23.245	23.842	20.749	4.000	2.645	24.805	33.630	0.002205		
							89T	T	25.415	21.100	23.440	22.627	19.904	3.931	6.907	27.855	31.860	0.062284	0	
1	0	0	0	není	23.1.2013	není	90Z	Z	27.080	22.780	23.980	24.537	19.698	8.574	5.828	34.660	38.125	0.090559		
							90T	T	28.095	23.590	25.305	26.587	22.706	6.916	2.844	36.390	35.335	2.077718	0	
0	1	0	0	není	24.4.2012	1.6.2012	91Z	Z	27.665	21.700	24.915	26.302	62.466	6.727	2.572	34.140	není Ct	0.000000		
							91T	T	25.440	21.610	24.400	24.237	14.221	2.056	2.302	24.735	28.530	0.072043	1	
0	1	0	0	není	2.11.2012	není	92Z	Z	25.755	22.435	23.240	26.637	9.987	5.716	0.543	26.635	32.625	0.015734		
							92T	T	25.560	22.225	24.785	24.447	10.091	1.711	2.163	23.580	29.180	0.020617	0	
0	1	0	0	není	22.1.2013	není	93Z	Z	26.040	22.180	23.670	24.772	14.520	5.169	2.408	27.290	32.405	0.028856		
							93T	T	26.805	22.330	24.385	25.937	22.239	5.352	1.825	31.745	34.865	0.115023	0	
0	1	0	0	není	2.11.2012	není	94Z	Z	25.860	21.845	23.125	25.922	16.167	6.658	0.958	25.770	32.695	0.008229		
							94T	T	25.375	21.795	23.815	24.467	11.959	2.949	1.876	21.740	26.925	0.027489	1	
0	1	0	0	není	24.4.2012	1.6.2012	95Z	Z	27.980	22.565	24.840	26.732	42.666	8.815	2.375	37.500	40.760	0.104386		
							95T	T	26.220	21.460	23.815	24.582	27.096	5.296	3.112	27.040	28.960	0.264255	1	
1	0	0	0	není	23.1.2013	není	96Z	Z	30.670	26.925	26.930	27.332	13.408	13.361	10.112	39.810	není Ct	0.000000		
							96T	T	28.410	24.055	26.025	25.197	20.464	5.223	9.273	36.980	39.280	0.203063	0	
1	0	0	0	není	2.7.2012	není	97Z	Z	24.515	20.270	23.320	21.587	18.961	2.289	7.611	26.600	33.860	0.006524		
							97T	T	25.495	21.790	23.410	22.397	13.041	4.243	8.562	31.765	32.890	0.458502	0	
1	0	0	0	není	15.1.2013	není	98Z	Z	25.410	21.645	24.355	24.467	13.595	2.078	1.923	25.745	34.150	0.002950		
							98T	T	26.750	22.805	29.795	27.452	15.402	0.121	0.615	23.390	29.060	0.019641	0	
1	0	0	0	není	15.11.2012	není	99Z	Z	25.835	22.355	24.495	24.182	11.158	2.532	3.145	25.365	30.110	0.037292		
							99T	T	25.410	22.240	25.765	23.282	9.000	0.782	4.371	25.010	29.795	0.036272	0	
0	0	0	0	není	11.9.2012	není	100Z	Z	25.490	23.440	25.425	25.822	4.141	1.046	0.794	23.825	29.355	0.021642		
							100T	T	26.475	22.325	25.075	23.212	17.753	2.639	9.600	23.695	29.145	0.022876	0	
1	0	0	0	není	15.12.2012	není	101Z	Z	25.790	21.725	23.300	26.607	16.737	5.618	0.568	23.680	29.225	0.021418		
							101T	T	25.190	22.540	24.365	24.602	6.277	1.772	1.503	23.500	26.605	0.116226	0	
0	1	0	0	není	7.12.2012	není	102Z	Z	25.190	21.405	23.305	23.977	13.785	3.694	2.318	27.670	29.130	0.363493		
							102T	T	25.255	22.130	23.705	23.432	8.724	2.928	3.538	26.760	28.600	0.279322	0	
1	0	0	0	není	1.3.2013	není	103Z	Z	25.340	21.690	23.195	24.077	12.553	4.423	2.400	25.285	32.145	0.008609		
							103T	T	25.545	24.115	24.910	26.402	2.694	1.553	0.552	25.955	30.930	0.031796	0	
1	0	0	0	není	17.9.2012	není	104Z	Z	25.270	21.455	22.290	24.992	14.074	7.890	1.213	26.160	31.805	0.019984		
							104T	T	25.770	22.850	24.450	24.732	7.568	2.497	2.053	25.845	30.685	0.034915	0	
1	0	0	0	není	5.4.2013	není	105Z	Z	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	31.020	38.475	0.005699		
							105T	T	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	není Ct	31.795	34.430	0.160985	0	
0	0	1	0	není	24.8.2012	není	106Z	Z	26.070	23.075	24.220	24.107	7.972	3.605	3.899	24.630	26.905	0.206613		
							106T	T	25.135	22.510	24.635	24.277	6.169	1.414	1.813	24.685	28.185	0.088388	0	
0	0	1	0	není	27.9.2012	není	107Z	Z	26.130	22.685	22.930	23.892	10.891	9.190	4.717	28.035	30.700	0.157672		
							107T	T	29.720	26.250	26.260	28.472	11.081	11.004	2.375	35.990	37.740	0.297302	0	
0	0	0	0	není	5.10.2012	není	108Z	Z	25.615	22.660	23.690	26.447	7.754	3.797	0.562	33.365	39.600	0.013276		
							108T	T	27.780	26.305	27.485									