

Sérové onkomarkery karcinomu prostaty

Serum oncomarkers for prostate cancer

Jakub Řezáč, Otakar Čapoun, Viktor Soukup

Urologická klinika VFN a 1. LF UK v Praze

Došlo: 7. 9. 2021

Přijato: 15. 11. 2021

Kontaktní adresa:

MUDr. Jakub Řezáč

Urologická klinika VFN a 1. LF UK

Ke Karlovu 6, 120 00 Praha 2

e-mail: jakub.rezac@vfn.cz

Střet zájmů: Žádný.

Prohlášení o podpoře: Práce byla podpořena projektem MZ ČR RVO–VFN64165.

Hlavní stanovisko práce: Nedílnou součástí určení diagnózy nebo prognózy karcinomu prostaty jsou onkomarkery, které stanovujeme z krevního séra, moči, popřípadě tkáně. V této práci podáváme stručný přehled aktuálně využívaných a experimentálních sérových onkomarkerů karcinomu prostaty.

Major statement: Detection of oncomarkers in blood serum, urine and tissue samples is an integral part of the diagnostic process for prostate cancer. The aim of this article is to show a brief overview of currently used and experimental prostate cancer serum oncomarkers.

SOUHRN

Řezáč J, Čapoun O, Soukup V. Sérové onkomarkery karcinomu prostaty.

Karcinom prostaty (KP) je jedním z nejčastěji diagnostikovaných onkologických onemocnění. Nedílnou součástí určení diagnózy nebo prognózy KP jsou onkomarkery, které stanovujeme z krevního séra, moči, popřípadě tkáně. V klinické praxi se setkáváme nejčastěji se sérovými onkomarkery v čele s prostatickým specifickým antigenem (PSA) případně s jeho deriváty – volným PSA, zdvojnásobením časem PSA, PSA rychlostí a PSA hustotou. Pro zpřesnění indikace biopsie prostaty pak můžeme využít další testy, například Prostate Health Index (PHI). Další komerčně dostupnou alternativou je panel čtyř kalikreinů (4 K skóre). Mezi nejnovější markery patří, ve Spojených státech již schválené, cirkulující nádorové buňky (CTC), případně zatím experimentální mikro RNA (miRNA). V této práci podáváme stručný přehled aktuálně využívaných a experimentálních sérových prediktivních a prognostických onkomarkerů KP.

KLÍČOVÁ SLOVA

Onkomarkery, biomarkery, karcinom prostaty.

SUMMARY

Řezáč J, Čapoun O, Soukup V. Serum oncomarkers for prostate cancer.

Prostate cancer (PC) is one of the most diagnosed oncological diseases. An integral part of the diagnostic process is detection of oncomarkers, which we measure in blood serum, urine, or tissue samples. In clinical practice, we most often utilize serum oncomarkers, especially Prostate Specific Antigen (PSA) or its derivatives free PSA,

PSA Doubling Time, PSA Velocity and PSA Density. To make the indication of a prostate biopsy more accurate, we can use other tests, such as Prostate Health Index (PHI). Another commercially available alternative is Four-kallikrein Panel (4K). Among the latest markers, we list, in the United States already approved, Circulating Tumor Cells (CTC), as well as for now experimental microRNA (miRNA). The aim of this article is to show a brief overview of currently used and experimental serum oncomarkers of PC.

KEY WORDS

Oncomarkers, biomarkers, prostate cancer.

.....

ÚVOD

Karcinom prostaty (KP) je jedním z nejčastěji diagnostikovaných maligních onemocnění. Aktuálně představuje přibližně 15 % všech diagnostikovaných tumorů a jeho incidence nadále vzrůstá (1). I přes výrazné pokroky v léčbě zůstává v Evropě třetí nejčastější příčinou úmrtnosti na nádorové onemocnění u mužů (2). Ve Spojených státech se dokonce v incidenci řadí u mužů na první místo mezi všemi onkologickými onemocněními s téměř 180 tisíci novými případy ročně a úmrtností 32 tisíc ročně (3).

Základem diagnostiky KP je vyšetření per rektum (Digital Rectal Examination – DRE). I přesto, že se většina KP vyskytuje v periferní zóně prostaty, vede toto vyšetření samotné k diagnóze pouze

přibližně v 18 % případů (4). Prvním popsáním biomarkerem KP byla prostatická kyselá fosfatáza (PAP) a to již v třicátých letech minulého století (5). Zlom v diagnostice představoval rok 1970 a objevení glykoproteinového enzymu prostatického specifického antigenu (PSA). Jeho zavedení do praxe znamenalo revoluci v detekci, léčbě i sledování pacientů s KP (6). Definitivní diagnóza se odvíjí od histopatologického výsledku biopsie prostaty (BP). Odběr PSA však mimo jiné napomáhá k selekci pacientů vhodných k biopsii.

Americký National Cancer Institute (NCI) definuje biomarker jako biologickou molekulu nacházející se v krvi, či jiné tělní tekutině, případně ve tkáni, která může být objektivně měřena a hodnocena jako známka normálního/abnormálního biologického procesu a patogenetického stavu. Ideální diagnostický molekulární nádorový biomarker by měl být přítomen výhradně v nádorové tkáni a nejlépe by měl být produkován přímo nádorovými buňkami. Jeho měření by mělo být realizovatelné metodami dostupnými pro klinickou praxi a analyzovaný biologický materiál by mělo být možné získat za použití co nejméně invazivních technik (7). Biomarker může být využit ke screeningu, diagnostice, stanovení prognózy a ke sledování odpovědi onemocnění na léčbu (8).

Zavedení PSA mezi screeningová vyšetření vedlo k výraznému vzestupu zachytu KP v časných stádiích. Samotný PSA má však jako onkomarker řadu úskalí. Jedná se o orgánově specifický marker, není však nádorově specifický, a proto může být zvýšen i u benigní hyperplazie prostaty (BHP), prostatitidy a dalších nezhoubných onemocnění.

Tab. 1. Výčet v textu uvedených onkomarkerů

Tab. 1. List of oncomarkers mentioned in the text

Název markeru	Materiál	Využití markeru	Schváleno*
PSA	sérum	prediktivní/prognostický	FDA, EAU
PHI	sérum	prediktivní/prognostický	FDA, EAU
4K	sérum	prediktivní/prognostický	FDA, EAU
miRNA	sérum	prediktivní	-
CTC	sérum	prognostický	FDA

PSA – prostatický specifický antigen, PHI – Prostate Health Index, 4K – panel 4 kalikreinů, miRNA – MicroRNA, CTC – cirkulující nádorové buňky, FDA – Food and Drug Administration, EAU – European Association of Urology

* v případě EAU se jedná o doporučení

I tak zůstává PSA sám o sobě lepším prediktorem KP než DRE či transrektální ultrasonografie (TRUS) (9).

Dalším problémem využití PSA v široké praxi je častý nález indolentního nádoru, tj. onemocnění nízkého rizika (10). Mnohdy diagnostikujeme KP u pacientů, kterým by neléčený KP ani nezkrátil život, ani nezhoršil jeho kvalitu (11). Recentně tak vznikl nový epidemiologický termín tzv. nadbytečná diagnóza (overdiagnosis). Předpokládá se, že na základě testu PSA je v současné době nadbytečně diagnostikováno 23–42 % případů KP. Nadbytečná diagnóza pak může vést k tzv. nadbytečné léčbě (overtreatment), tj. k léčbě i u pacientů, které by jejich nesignifikantní KP nijak neohrozil, a naopak by profitovali z prostého sledování bez nežádoucích účinků, ať již pooperačních, poradiačních, či socio-ekonomických.

Markery dělíme dle účelu na prediktivní a prognostické a dále dle měřeného materiálu na markery v krevním séru, moči, či tkáni. Cílem této práce je podat přehled aktuálně využívaných, případně experimentálních, sérových onkomarkerů karcinomu prostaty.

PSA

Prostatický specifický antigen je kalikreinová proteáza produkovaná epitelovými buňkami prostatické žlázy (11). Nachází se v prostatickém sekretu a její koncentrace je často zvýšena u KP (12). Po zavedení do praxe v 80. letech minulého století signifikantně zlepšila diagnostiku a léčbu KP včetně přežití (13). Rozšíření PSA s sebou však nese množství úskalí. Jak již bylo uvedeno, není to marker nádorově specifický. K elevaci dochází i u jiných onemocnění, jako například BHP, močová retence, prostatitida, uroinfekce, či po cystoskopii, kolonoskopii nebo pochopitelně také po BP. Sporný je naopak vliv vyšetření per rektum, traumatizace prostaty jízdou na kole či ejakulace (14).

Dle doporučení Evropské urologické společnosti (EAU) neexistují žádné standardní hodnoty PSA (15). Jedná se o kontinuální parametr, kde vyš-

ší hodnoty indikují vyšší riziko KP. Dříve stanovená horní hranice 4 ng/ml pro PSA již dávno neplatí, neboť až 25 % pacientů s nově diagnostikovaným KP může mít hodnotu PSA pod touto mezí (16). Doporučení EAU zmiňují výskyt středně a vysoce rizikového KP (Gleasonovo skóre [GS] ≥ 7) také u nízkých hladin PSA (tabulka 2).

Specifickými jednotkami jsou PSA denzita (PSA-D), velocita (PSA-V) a zdvojnovací čas (PSA-DT). Jedná se o výpočtové jednotky. Denzita PSA je rovna podílu PSA a objemu prostaty (změřeného sonograficky nebo pomocí magnetické rezonance). Vyšší hodnoty PSA-D znamenají rovněž vyšší riziko signifikantního KP (18).

Pokud jde o kinetiku PSA, hovoříme o „doubling time“ PSA-DT a PSA-V. Prvním rozumíme čas do zdvojení PSA v měsících nebo letech, druhým pak absolutní hodnotu ročního nárůstu. Jejich hodnota je především prognostická, využití v diagnostice je omezené, i vzhledem k vlivu BHP, nejednotným intervalům mezi odběry PSA a možné akceleraci/deceleraci PSA-DT a PSA-V v čase (19). Zatímco PSA-V a PSA-DT přesvědčivě specifitu konvenčního testu PSA nezlepšily (20), PSA-D prokazatelně zpřesňuje diagnostiku klinicky signifikantního KP. Hraniční hodnoty pro rutinní klinické používání však zatím stanoveny nebyly (19). Využití našla PSA-D i v protokolech aktivního sledování, například v protokolu Prostate cancer Research International: Active Surveillance (PRIAS) je vstupní hranicí hodnota $< 0,2$ (21).

Mimo PSA formy vázané na inhibitory sérové proteázy se v krvi vyskytuje rovněž jeho volná forma (fPSA), která tvoří přibližně 5–35 % celkového

Tab. 2. Riziko KP ve vztahu k nízkým hodnotám PSA
Tab. 2. Prostate cancer risk in relation to low PSA values

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

PSA – prostatický specifický antigen, KP – karcinom prostaty

PSA. Poměr fPSA k celkovému PSA (f/t) bývá nižší u KP (22, 23). Musí být vždy užito opatrně, neboť může být nepříznivě ovlivněn několika klinickými a před-analytickými faktory, jako např. nestabilitou volného PSA při různých teplotách, variabilní charakteristikou testu a BHP (24). Systematický přehled zahrnující 14 studií zjistil, že při celkové hodnotě PSA > 10 ng/ml nemá již fPSA klinické využití ani při diagnostice, ani u sledování již známých karcinomů. U pacientů s hodnotami PSA 4–10 ng/ml je pak senzitivita vyšetření 70 %. Poměr f/t nad 20 % svědčí pro BHP, 15–20 % je šedá zóna a pod 15 % svědčí pro KP (25).

Vyšetření PSA je vhodné nabídnout informovaným pacientům ve věku nad 50 let. V případě onkologické rodinné anamnézy a u Afroameričanů již od 45 let, s ohledem na jejich celkový zdravotní stav. U mužů s BRCA2 (Breast cancer 2) mutací dokonce již od 40 let. Další testování závisí na primární hodnotě, při nízkých hodnotách obvykle vyšetření opakujeme každé dva roky. Při iniciálních hodnotách nad 10 ng/ml odběr opakujeme a následně indikujeme BP. Při hodnotách 2–10 ng/ml přihlídneme k hodnotě fPSA a dále doplňujeme další vyšetření – např. pomocí jiného onkomarkeru, nomogramu, či zobrazovacích metod. Časnou diagnostiku KP ukončujeme u mužů s předpokládanou dobou dožití kratší než 15 let (18).

PHI

V tuzemském prostředí se již několik let v klinické praxi setkáváme s dalším onkomarkerem, tzv. proPSA, případně z něj vypočtené hodnoty Prostate Health Index (PHI, Index zdraví prostaty) (26).

ProPSA je jedním z prekurzorů PSA. V krvi se nachází v několika izoformách [-2]proPSA, [-4]proPSA, [-5]proPSA a [-7]proPSA. Jednotlivé formy se od sebe liší počtem aminokyselin v původní peptidové sekvenci (27). Prekurzory jsou dále konvertovány na aktivní formu pomocí enzymu Human Kallikrein-2 (hK2). Experimentálně bylo prokázáno, že [-2]proPSA je produkován především periferní zónou prostaty. Předpokladem

tedy je, že [-2]proPSA je produkován ve větší míře u pacientů s KP než s BHP. Podobně jako PSA je i proPSA získáván z krevního séra.

Z hodnoty [-2]proPSA počítáme hodnotu PHI vzorcem $([-2]proPSA / fPSA) \times \sqrt{PSA}$. Výpočet byl vyvinut v Brea ve Spojených státech společností Beckman Coulter a schválen Food and Drug Administration (FDA) v roce 2012 a v současnosti je uveden i v Guidelines Evropské urologické společnosti (EAU). Jeho účelem bylo lépe odlišit pacienty v riziku signifikantního KP, konkrétně u pacientů ve věku nad 50 let, PSA 4–10 ng/ml a s nesuspektním DRE. Dle studií publikovaných Lazzeri et al. PHI signifikantně zlepšuje přesnost predikce KP (28, 29, 30). Při 95% senzitivitě testu je specifita PHI v porovnání s PSA výrazně vyšší (16 % oproti 8,4 %) (31). Hraniční hodnoty testu nejsou přesně stanoveny, obvykle však za suspektní považujeme hodnoty PHI nad 30–40. Výsledky dále potvrdila metaanalýza provedená Bruzzen et al., kde byl zároveň na velkém počtu pacientů potvrzen vyšší záchyt KP u PHI oproti PSA a fPSA.

4 K SKÓRE

Panel 4 kalikreinů – celkového PSA, fPSA, intaktního PSA a human kallikrein-2 (hK2) dohromady vytváří tzv. 4 K skóre. Podobně jako předchozí testy ho provádíme z krevního séra. Dle řady studií prokázalo 4 K skóre vyšší přesnost predikce KP než modely založené na PSA (32, 33, 34).

Stejně jako předchozí markery je i 4 K skóre uvedeno v Guidelines EAU. Tento test je komerčně dostupný a schválený, včetně americké FDA. Vickers a Lilja vytvořili v roce 2010 model predikce záchytu KP z BP založený na 4 K skóre vztaženém k věku, DRE a předchozím BP. Cílem testu bylo snížit počet zbytečných BP u mužů testovaných na PSA. Výrazné vylepšení oproti PSA představuje u 4 K skóre menší ovlivnění výsledku velikostí prostaty u BHP (35). Několik prospektivních multicentrických studií prokázalo, že jak PHI, tak i 4 K skóre mají lepší účinnost než samotný f/t PSA v detekci KP u mužů s PSA 2–10 ng/mL (36). Pro-

spektivní multicentrická americká studie z roku 2015 potvrdila předchozí výsledky. Při hraniční hodnotě 4 K skóre 6 % byl počet BP snížen o 30 % a pouze 1,3 % high risk tumorů nebylo zachyceno (37). V přímém srovnání vykazaly oba testy (phi a 4 K) obdobné výsledky (38).

Dle doporučení National Comprehensive Cancer Network (NCCN) nebyly do současné doby stanoveny hraniční hodnoty umožňující využití 4 K skóre v klinické praxi (39).

Nadějnou se zdá i kombinace PHI a 4 K skóre. Nordstrom v roce 2015 publikoval výsledky studie s 513 pacienty indikovanými k primobiopsii prostaty. Při autorem definovaných hraničních hodnotách (10 % u 4 K skóre a PHI 39) by bylo možno neprovést až 29 % BP, avšak nezachytilo by se 10 % high grade (HG) KP (40).

miRNA

MicroRNA (miRNA) jsou malé (17–22 nukleotidů) nekódující sekvence RNA s důležitou úlohou v regulaci genové exprese na posttranskripční úrovni (41). Byly identifikovány u řady onkologických diagnóz včetně KP (42). Počet identifikovaných miRNA se postupně zvyšuje od roku 1993, kdy byla první miRNA popsána u hlístice *Caenorhabditis elegans*. V současné době je počet miRNA popsáných podle databáze mirbase.org téměř 40 tisíc, z nichž se však jen několik tisíc nachází u lidí.

Počet studií, které hodnotí jejich užitečnost jako biomarkerů, roste od roku 2008, kdy Lawrie et al. (43) navrhli využití cirkulujících miRNA jako diagnostického nástroje u pacientů s B-buněčným lymfomem. Ačkoli je miRNA dostatečně stabilní v plazmě a séru, existují aktuálně velké rozdíly v kvalitě vzorků a jejich zpracování a k využití v praxi je nutná další optimalizace a standardizace postupů (44).

Mitchell et al. jako první prokázali přítomnost miRNA v plazmě pacientů s KP (45). Zároveň prokázali signifikantně vyšší výskyt konkrétní sekvence miR-141, u pacientů s pokročilým KP oproti zdravým jedincům. Exprese aberantní miRNA byla dále prokázána u KP v iniciaci, vývoji i progresi

karcinomu (46). Následně byl výzkum zaměřen na panely o desítkách sekvencí, např. Mihelich et al. popsali 14 miRNA, které přesně odlišily pacienty s HG a low grade (LG) KP (47). Využití by tedy mohlo být v predikci signifikantního KP. Využití miRNA v moči je v současné době nejasné. I přesto, že bylo zkoumáno řadou autorů a některé výsledky jsou nadějně (48), jednalo se vždy o malé kohorty pacientů a je třeba dalšího výzkumu. EAU Guidelines jej neuvádějí (18).

CIRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ BUŇKY

Dalším markerem získávaným z krve by mohly být cirkulující nádorové buňky (Circulating Tumour Cells – CTC). Buňky KP lze dle řady studií detekovat v krvi a kostní dřeni (49). Díky zlepšujícím se metodám sekvenování a citlivějším metodám detekce je tzv. „tekutá biopsie“ nadějnou metodou detekce KP i dalších onkologických onemocnění. Jedná se o minimálně invazivní možnost sledování nádorové nálože i genomové nebo biologické povahy tumoru.

Prvním dostupným je CellSearch™ (Jansen Diagnostics, Raritan, NJ, USA). Jedná se o prognostickou platformu schválenou FDA. Je nezávislým prediktorem celkového přežití u pacientů s metastatickým KP (50). Bono et al. provedli analýzu u 276 pacientů s nálezem vyšší prediktivní hodnoty k celkovému přežití pacientů než u PSA. V současné době je snaha o využití CTC jako prognostického biomarkeru KP. Molekulární analýza CTC se zdá být srovnatelnou s primární biopsií nádorové tkáně či metastázy (51). Tekutá biopsie tedy může KP sledovat minimálně invazivně a v reálném čase.

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

ZÁVĚR

Karcinom prostaty je velmi časté onkologické onemocnění. V posledních letech bylo nalezeno velké množství nových, nadějných markerů KP v séru, moči i v tkáni.

Nové biomarkery napomáhají rozlišení mezi agresivní a neagresivní formou KP a přesnější diagnostice klinicky významného KP. Předpokladem pro zavedení nového markeru do klinické praxe bude kromě jeho diagnostické přesnosti přede-

vším finanční a technická náročnost, zohlednění invazivity a reprodukovatelnosti metody. Právě z těchto důvodů zůstávají nadále nejvíce využívanými sérové onkomarkery KP.

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

LITERATURA

1. Bray F, Ferlay J, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394–424.
2. OECD (2017), *Health at a Glance 2017: OECD Indicators*, OECD Publishing, Paris. [online] 2017 [cit. 16-8-2021] Dostupné z: https://doi.org/10.1787/health_glance-2017-en.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 66: 7–30.
4. Richie JP, Catalona WJ, Ahmann FR, et al. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostatespecific antigen and digital rectal examination. *Urology* 1993; 42: 365.
5. Lowe FC, Trauzzi SJ. Prostatic acid phosphatase in 1993. Its limited clinical utility. *Urol Clin North Am* 1993; 20: 589–595.
6. Klečka J, Běhounek P, Hora M. Současné postavení PSA v diagnostice karcinomu prostaty. *Urol. praxi* 2008; 9(4): 187–189.
7. Svoboda M. Identifikace a studium molekulárních biomarkerů z hlediska individualizace léčebně-preventivních strategií v onkologii. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D. – habilitační práce, komentovaný soubor prací. [online] 2013 [cit. 16-8-2021] Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/habilitace/1411/Svoboda/habilitace/Marek_Svoboda_-_habilitacni_prace.doc?i.
8. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature* 2008; 452: 548–552.
9. Catalona, WJ, Richie JP, Ahmann FR, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994; 151: 1283.
10. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of followup. *Lancet* 2014; 384: 2027–2035.
11. Romero Otero J, Garcia Gomez B, Campos Juanatey F, Touijer KA. Prostate cancer biomarkers: an update. *Urol Oncol* 2014; 32: 252–260.
12. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 268–278.
13. Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol* 2016; 39(2): 97–106.
14. Veselý Š. Současné klinické využití markerů karcinomu prostaty. *Onkologie* 2019; 13(2): 78–82.
15. Semjonow A, Brandt B, Oberpenning F, et al. Discordance of assay methods creates pitfalls for the interpretation of prostatespecific antigen values. *Prostate Suppl* 1996; 7: 3.
16. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004; 350: 2239.

17. **EAU Guidelines: Prostate Cancer.** [online] 2021 [cit. 16-8-2021]. Dostupné z: <https://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/>.
18. **Nordström T, Akre O, Aly M, Grönberg H, Eklund M.** Prostate-specific antigen (PSA) density in the diagnostic algorithm of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic, Dis.* 2018; 21(1): 57–63.
19. **Arlen, PM, Bianco F, Dahut WL, et al.** Prostate Specific Antigen Working Group guidelines on prostate specific antigen doubling time. *J Urol.* 2008; 179: 2181.
20. **Vickers AJ, Savage C, O'Brien MF, et al.** Systematic review of pretreatment prostatespecific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 398–403.
21. **PRIAS Project [online].** 2021 [cit.16-8-2021]. Dostupné z: <https://prias-project.org/modules/articles/article.php?id=1>.
22. **Christensson A, Bjork T, Nilsson O, et al.** Serum prostate specific antigen complexed to alpha 1 antichymotrypsin as an indicator of prostate cancer. *J Urol.* 1993; 150: 100–105.
23. **Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al.** Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998; 279(19): 1542–1547.
24. **Stephan C, Lein M, Jung K, et al.** The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. *Cancer* 1997; 79: 104.
25. **Huang Y, Li ZZ, Huang YL, et al.** Value of free/total prostate-specific antigen (f/t PSA) ratios for prostate cancer detection in patients with total serum prostate-specific antigen between 4 and 10 ng/mL: A metaanalysis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: 0249.
26. **Fiala V, Hanuš T, Čapoun O, et al.** Zkušenosti s použitím indexu zdraví prostaty v klinické praxi. *Ces Urol* 2017; 21(4): 284–288.
27. **Le BV, Griffin CR, Loeb S, et al.** [-2] Proenzyme prostate specific antigen is more accurate than total and free prostate specific antigen in differentiating prostate cancer from benign disease in a prospective prostate cancer screening study. *J Urol.* 2010; 183: 1355–1359.
28. **Lazzeri M, Haese A, Abrate A, et al.** Clinical performance of serum prostate specific antigen isoform [-2]proPSA (p2PSA) and its derivatives %p2PSA and the prostate health index (phi) in men with a family history of prostate cancer: results from a multicenter European study, the PROMetheuS project. *BJU Int* 2013; 112: 313–321.
29. **Ryšánková K, Bartoš V, Krhut J, et al.** (-2)proPSA a Index zdravé prostaty (PHI) v predikci výskytu karcinomu prostaty v transrektálních biopsiích. *Ces Urol* 2018; 22(1): 40–47.
30. **Fuchsová R, Topolčan O, Hora M, et al.** Přínos stanovení [-2]proPSA v diferenciální diagnostice karcinomu prostaty. *Ces Urol* 2014; 18(1): 21–25.
31. **Catalona W, Partin A, Bangma C, et al.** A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J Urol* 2011; 185: 1650–1655.
32. **Haese A, Graefen M, Steuber T, et al.** Human glandular kallikrein 2 levels in serum for discrimination of pathologically organconfined from locally-advanced prostate cancer in total PSA-levels below 10 ng/ml. *Prostate* 2001; 49(2): 101–109.
33. **Gupta A, Roobol MJ, Savage CJ, et al.** A four-kallikrein panel for the prediction of repeat prostate biopsy: data from the European Randomized Study of Prostate Cancer screening in Rotterdam, Netherlands. *Br J Cancer* 2010; 103(5): 708–714.
34. **Novák V, Veselý Š.** PSA a jeho izoformy jako moderní markery karcinomu prostaty. *Ces Urol* 2019; 23(3): 194–202.

35. Carlsson, SV, Vickers AJ, Lilja H, et al. Can one blood draw replace transrectal ultrasonography-estimated prostate volume to predict prostate cancer risk? *BJU Int* 2013; 112: 602–609.
36. Catalona, WJ, Partin AW, Sanda MG, et al. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J Urol* 2011; 185: 1650.
37. Parekh, DJ, Punnen S, Sjöberg DD, et al. A Multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4 K score accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol* 2015; 68: 464–470.
38. Nordstrom T, Vickers A, Assel M, et al. Comparison Between the Four-kallikrein Panel and Prostate Health Index for Predicting Prostate Cancer. *Eur Urol* 2015; 68: 139.
39. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2017. Prostate Cancer Early Detection [online]. 2018 [cit.2-4-2021] Dostupné z: www.nccn.org.
40. Nordström T, Vickers A, Assel M, et al. Comparison Between the Four-kallikrein Panel and Prostate Health Index for Predicting Prostate Cancer. *Eur Urol* 2015; 68(1): 139–46.
41. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281–297.
42. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Fernandez-Serra A, Lopez-Guerrero JA. miRNAs as biomarkers in prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 2012; 14(11): 803–811.
43. Lawrie, CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 672–675.
44. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015; 61: 56–63.
45. Lucarelli G, Ditonno P, Bettocchi C, et al. Serum sarcosine is a risk factor for progression and survival in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Future Oncol* 2013; 9(6): 899–907.
46. Ferro M, Lucarelli G, Bruzzese D, et al. Improving the prediction of pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy: the value of prostate cancer antigen 3 (PCA3), prostate health index (phi) and sarcosine. *Anticancer Res* 2015; 35(2): 1017–1023.
47. Mihelich BL, Maranville JC, Nolley R, et al. Elevated serum microRNA levels associate with absence of high-grade prostate cancer in a retrospective cohort. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0124245.
48. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, et al. Upm3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 2004; 64: 311–315.
49. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early – and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra24.
50. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6302–6309.
51. Punnoose EA, Ferraldeschi R, Szafer-Glusman E, et al. Pten loss in circulating tumour cells correlates with pten loss in fresh tumour tissue from castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 2015; 113: 1225–1233.